MILENA TELLES

RELAÇÃO ENTRE SISTEMA COLINÉRGICO E FORMAÇÃO DE RESERVA COGNITIVA APÓS TREINO DE ATENÇÃO SEMANAL EM CAMUNDONGOS INFUNDIDOS CRONICAMENTE COM PEPTÍDEO B-AMILOIDE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MILENA TELLES

RELAÇÃO ENTRE SISTEMA COLINÉRGICO E FORMAÇÃO DE RESERVA COGNITIVA APÓS TREINO DE ATENÇÃO SEMANAL EM CAMUNDONGOS INFUNDIDOS CRONICAMENTE COM PEPTÍDEO B-AMILOIDE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel

Versão original:

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Telles, Milena.
Relação entre sistema colinérgico e formação de reserva cognitiva após treino semanal de atenção em camundongos infundidos cronicamente com peptideo B-amiloide / Milena Telles. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Sistema Colinérgico.

Versão do título para o inglês: Role of cholinergic system in formation of cognitive reserve, after attetion trainning of mice chronically infused with amyloid-beta peptide.

1. Doença de Alzheimer 2. Sistema colinérgico 3. Treino atenção 4. Resiliência cerebral I. Viel, Profa. Dra. Tânia Araújo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB082/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Milena Telles.

Título da Dissertação: Relação entre sistema colinérgico e formação de reserva cognitiva após treino semanal de atenção em camundongos infundidos cronicamente com peptídeo B-amiloide.

Orientador(a): Profa. Dra. Tânia Araújo Viel.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **164** nas fls. **143** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Tânia Araújo Viel**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Avaliação do papel do sistema colinérgico e da neurotrofina BDNF de camundongos submetidos a treino de atenção"* do qual participam o(s) aluno(s), **Milene Telles, Natália Mendes Schöwe, Marilia Silvia de Albuquerque, Gabriela Cipolli** e o pesquisador **Hudson de Sousa Buck,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23.04.13, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

A Sheila, minha terapeuta,
aquela que me guiou entre a dor e a felicidade,
rompendo padrões, estabelecendo medidas e
buscando possibilidades para uma vida melhor.

AGRADECIMENTOS

Sai da graduação com um saco de cimento e alguns tijolos e a intenção de construir a minha “casa”, a profissão que iria exercer. O mestrado foi a escolha pra começar essa construção, com meus poucos recursos entrei nessa empreitada que só foi possível pelos envolvidos que me ensinaram a construir.

Primeiramente agradeço “a mestre de obras”, Prof (a). Dra. Tânia Araújo Viel aquela que guiou brilhantemente todos os meus passos, sempre próxima e sensível. A única pessoa que tenho medo de decepcionar por toda admiração que tenho. Esse trabalho conta com uma assistência igualmente competente, Prof. Dr. Hudson de Sousa Buck, que me ensinou na prática e na teoria a melhor forma de construir.

Agradeço com todo o carinho a “encarregada” dessa obra e também grande amiga Natália Mendes Schöwe, cada passo só foi possível porque você me levantou do engatinhar e me ensinou a caminhar.

As minhas “pedreiras” do coração, Marília Albuquerque, toda pequena obra é baseada em grandes construções, você é poesia viva, brilhante e inspiradora, aquele olhar cheio de brilho essencial a qualquer construção. Laura Coelho que desempenhou o papel por completo, tantas vezes destruiu minhas paredes tortas sem medo de ofender, mas sempre arregaçou as mangas para ajudar a levantar. Aos melhores ajudantes, Danilo Mourelle que dividiu a mão na massa e trabalho duro comigo, com parceria e graça. Ticiana Baraldi com sua competência inspiradora, prestativa e conselheira. Karis Dong sempre com as palavras certas, o bom humor e a massagem que levanta qualquer um. Marielza nossa eterna inspiração, simples e sincera.

Aos meus amigos do laboratório, Marcia, Nelson, Ariadiny e Elena. E ao Sr. Martinho e a Eva por todo esforço e parceria.

À Mônica Nunes secretaria do programa de pós-graduação, seu trabalho, cuidado e orientação foram cruciais em todas as etapas desse projeto.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) e a todos os docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, por disponibilizarem o espaço e condições laboratoriais para a execução desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Só há graça em construir essa casa, se tenho com quem compartilhar esse lar:

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que meu deu todas as ferramentas necessárias.

A minha filha Giovanna, agradeço todo o sentido que você deu a minha vida e peço perdão pela minha ausência. Ser mãe é escolher entre erros e acertos, escolhi te deixar o exemplo da construção e do merecimento e não o peso da desistência pela dificuldade. Uma amiga me ensinou que independente da correnteza o importante é não afogar na travessia, sem dúvida desde o dia que você entrou no meu barco afogar nunca mais foi uma opção, mesmo passando por grandes tsunamis. Você é o meu melhor e sempre será.

Aos meus pais, José Carlos e Odete, aos meus irmãos e a toda a minha família, alicerce e origem de tudo o que eu sou. Em especial, ao meu irmão Javali que facilitou o processo de todas as maneiras possíveis.

Agradeço também ao meu amor, Neto, que de forma especial e carinhosa reinventou a possibilidade de amar na minha vida.

Ao João Gabriel, pai da minha filha e parceiro por toda força nos momentos de dificuldades e por suprir brilhantemente o papel materno que muitas vezes eu não consegui desempenhar. E ao Max e a Maria por todo cuidado de avós coruja com a Gi.

A todos os meus amigos, Paula, Thábata, Daiane, Tamiles, Renata, Carla, Dayane, Nathália, Jonas, Vanessa, Gabriele, Caio e Isabel, pela leveza e alegria que acrescentaram nessa jornada.

Confesso que muitas vezes abandonei essa construção, pensei em morar de aluguel ou até mesmo voltar para casa dos meus pais. Mas também trabalhei com muita empolgação, amor e alegria. O que realmente importa é que sempre retomei, varri a poeira e voltei a empilhar esses tijolos. Hoje minha casa ainda está sem teto, com algumas janelas sem vidro e longe de ser o lar que eu quero morar na minha profissão. Mas sem dúvida não estou mais sem lugar no mundo, mesmo com uma estrutura frágil tenho para onde voltar, me encontrar e ser feliz, essa pra mim é a maior conquista.

Raízes não são âncoras...
"Na vida, nós devemos ter raízes, e não âncoras. Raiz alimenta, âncora imobiliza. Quem tem âncoras vive apenas a nostalgia e não a saudade. Nostalgia é uma lembrança que dói, saudade é uma lembrança que alegra"

Mário Sergio Cortella

RESUMO

TELLES, M. **Relação entre sistema colinérgico e formação de reserva cognitiva após treino de atenção semanal em camundongos infundidos cronicamente com peptídeo β-amiloide.** 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O sistema colinérgico está sabidamente envolvido com processos cognitivos. Em trabalho recente mostramos que a infusão do peptídeo βA promoveu neurodegeneração e redução da memória de ratos. O treino semanal dos animais em equipamento de esquiva ativa recuperou o desempenho na tarefa e aumentou a densidade de receptores nicotínicos α7 em áreas relacionadas à memória. No presente trabalho, o antagonismo de α7 com metilicaconitina (MLA), em camundongos, promoveu perda cognitiva, porém a recuperação com o treino foi parcial. A infusão conjunta de βA e MLA causou perda da memória, mas essa não foi revertida com o treino semanal. Os animais com MLA apresentaram aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e aumento de BDNF, que poderia ser relacionado à resiliência a injúrias. Porém, animais com βA e MLA apresentaram aumento da atividade da AChE e redução de BDNF, sugerindo perda dos mecanismos de neuroproteção deflagrados por α7. Com isso, sugere-se que α7 tenha um papel determinante na recuperação da memória e resiliência tecidual, frente à neurodegeneração.

Palavras-chave: Sistema colinérgico. Neurodegeneração. Treino semanal. Resiliência cerebral.

ABSTRACT

TELLES, M. **Role of cholinergic system in formation of cognitive reserve, after attetion trainning of mice chronically infused with amyloid- beta peptide.** 2015. 58 p. Masters thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cholinergic system plays an important role in cognitive processes. In a recent work we showed that infusion of Aβ promoted neurodegeneration and reduction of memory of rats. Week training of animals in active avoidance shuttle box recovered their performance and increased the density of α7 nicotinic receptors in brain areas related to memory. In the present work, infusion of the α7 antagonist methyllycaconitine (MLA), in mice, caused cognitive impairment, but memory recover with week training was partial. Infusion of βA together with MLA promoted memory loss, but this was not recovered with the week training. MLA infused mice presented increase in acetylcholinesterase (AChE) activity and increase in BDNF, which could be related to resilience to tissue injuries. However, animals infused with βA and MLA showed increase in AChE activity and reduction of BDNF, suggesting loss of neuroprotection mechanisms triggered by α7. It is suggested that α7 has a determinant role in memory recover and brain resilience, in neurodegenerative processes.

Keywords: Cholinergic system. Neurodegeneration. Attention training. Brain resilience.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - A VIA AMILOIDOGÊNICA E NÃO AMILOIDOGÊNICA DA CLIVAGEM DA APP..... 17
FIGURA 2 - PROTOCOLO COMPORTAMENTAL..... 28
FIGURA 3 - APRIMORAMENTO DO PROTOCOLO COMPORTAMENTAL EM ESQUIVA ATIVA..... 31
FIGURA 4 - DEAMBULAÇÃO DE CAMUNDONGOS..... 32
FIGURA 5 - EXPLORAÇÃO VERTICAL DE CAMUNDONGOS 33
FIGURA 6 - RESPOSTAS CONDICIONADAS DE CAMUNDONGOS EM ESQUIVA ATIVA..... 35
FIGURA 7 - ANÁLISE SEMANAL DAS RESPOSTAS CONDICIONADAS EM ESQUIVA ATIVA..... 40
FIGURA 8 - A,B,C - ANÁLISE DA DOSAGEM DA DENSIDADE BDNF..... 40
FIGURA 9 - ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE..... 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13
1.1 FORMAÇÃO DA MEMÓRIA.....13
1.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER.....15
1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E O SISTEMA COLINÉRGIO.....18
1.4 FORMAÇÃO DA RESERVA COGNITIVA PARA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA 18
1.5 OBJETIVO.....21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....22
2.1 ANIMAIS.....22
2.2 LISTAS DE SAIS E REAGENTES.....22
2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS E SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....23
2.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DAS MINI-BOMBAS.....25
2.5 DOSAGEM DA DENSIDADE DE BDNF LIVRE TOTAL.....26
2.6 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE).....28
2.7 DESENHO EXPERIMENTAL….....28
2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS….....29
3 RESULTADOS.....30
3.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....30
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA.....31
3.3 EFEITO DO TREINO SEMANAL E DOS TRATAMENTOS POR INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR NA MEMÓRIA.....33
3.4 ANÁLISE, SEMANA A SEMANA, DO COMPORTAMENTO DOS DIFERENTES GRUPOS.....35
3.5 PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE ELISA.....38
3.6 DOSAGEM DE BDNF.....38
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERASE (AChE)….....41
4 DISCUSSÃO.....43
5 CONCLUSÕES.....51
REFERÊNCIAS*.....53

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas observou-se o aumento da longevidade da população em geral causado, dentre outros fatores, pela melhoria da qualidade de vida. A qualidade de vida é um conceito subjetivo e multidimensional, pois cada indivíduo possui seus parâmetros acerca do que lhe traz satisfação. Além disso, trata-se de considerar a percepção da pessoa sobre o seu estado de saúde e sobre os aspectos subjetivos do seu contexto de vida (SEIDL; ZANNON, 2004).

Dentro dessa perspectiva, as doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), acarretam a perda da capacidade cognitiva e a redução da autonomia, inviabilizando a realização das tarefas diárias e, dessa forma, influenciando diretamente a qualidade de vida do idoso e de seus familiares. A DA é a quarta causa mais frequente de morte em países como o Brasil. Sua prevalência aumenta com a idade, pois dobra a cada cinco anos em pessoas com idades entre 65 e 85 anos (GREEN, 2001). Dessa forma, atinge, aproximadamente, 20% da população com idade acima de 80 anos.

Consequentemente, essa doença se tornou alvo de muitas pesquisas e investimentos, com o intuito de entender sua etiologia e progressão e minimizar suas consequências individuais e globais relacionadas ao sistema de saúde. Nesse contexto, entender os mecanismos relacionados à memória é fundamental para realizar estudos e intervenções nessa área.

1.1 FORMAÇÃO DA MÉMORIA

A memória ocorre a partir de experiências e é caracterizada pela aquisição, armazenamento e evocação de informações. Além disso, é dividida em diferentes tipos, como a memória operacional, declarativa e de procedimento.

A formação da memória não depende de uma estrutura nervosa isolada, mas sim, da intensa inervação de muitas estruturas (IZQUIERDO, 2004). Para isso, ocorrem alterações morfológicas nas sinapses como a formação de novas conexões e o aumento na força de associação entre neurônios, ou seja, requer plasticidade neuronal (LYNCH, 2004). Essa plasticidade é a capacidade dos neurônios de transformar e adaptar o seu funcionamento e sua estrutura de acordo com

exigências externas e internas (KAPCZINSKI, et al., 2004). A plasticidade neural está presente em todas as etapas da ontogenia, durante todo o envelhecimento e a sua construção ocorre a partir de interações do indivíduo com o ambiente, está associada aos aspectos comportamentais, estruturais e aos processos de aprendizagem e memória (OLIVEIRA et al., 2000). Em suma, a plasticidade neural é caracterizada pela capacidade de mudança morfológica e funcional de redes complexas do sistema nervoso central, essas modificações ocorrem constantemente permitindo aos organismos capacidade de armazenar informações e adaptar o seu comportamento as mudanças do ambiente (TURRIGIANO, 2012).

Uma das formas de plasticidade amplamente aceita como a base para a formação de alguns tipos de memória é a potenciação de longa duração (LTP), trata-se de uma alteração eletrofisiológica que ocorre no hipocampo e em outras áreas cerebrais, onde as alterações sinápticas são mantidas por um longo período de tempo após transcrição gênica e síntese de novas proteínas neuronais, resultando em aumento da eficácia da transmissão sináptica (IZQUIERDO, 2008; KANDEL, 2001; PANG; LU, 2004). Ou seja, a LTP age na melhora da transmissão do sinal por meio do aumento de neurotransmissores liberados na sinapse, pela melhora da sensibilidade e pelo aumento da atividade e do número dos receptores póssinápticos que recebem esses neurotransmissores. Desde que foi descrita, a LTP é a forma de plasticidade sináptica mais aceita para se explicar a memória de longa duração e, dessa forma, é o mecanismo que fundamenta a duração da memória.

A formação da memória é modulada por vários sistemas de neurotransmissores, entre eles o sistema colinérgico. A ação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) é devida à interação com receptores denominados receptores metabotrópicos muscarínicos e receptores ionotrópicos nicotínicos. Essa classificação foi baseada nos subtipos de receptores colinérgicos capazes de se ligar à muscarina e à nicotina, respectivamente (DALE, 1914). Os receptores muscarínicos são acoplados à proteína G e estão envolvidos na transmissão autonômica parassimpática e também possuem atuação no sistema nervoso central. Os receptores nicotínicos fazem parte da superfamília de canais iônicos ativados por ligante. São expressos no músculo, no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico. Experimentos farmacológicos com agonistas

e antagonistas nicotínicos têm ajudado a elucidar a função da acetilcolina e de seus receptores no sistema nervoso central e periférico (CHANGEUX, 2000).

A ACh é sintetizada no corpo celular dos neurônios a partir da colina recaptada dos terminais axônicos. A formação da acetilcolina ocorre como resultado da reação entre a acetil-coenzima e a colina que é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (CAT), isso ocorre quando a colina é acetilada pela CAT que transfere o grupo acetil da molécula de acetil-coenzima A (HEBB, 1970). A ACh é posteriormente transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) e essas vesículas se tornam responsivas às mudanças na concentração intracelular de cálcio, quando um potencial de ação atinge o terminal nervoso, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos liberando, por exocitose, a acetilcolina (CASTRO, 2006).

Uma das hipóteses para a etiologia da DA é a que envolve o sistema colinérgico. Essa hipótese surgiu a partir de exames post-mortem de tecidos cerebrais de pacientes com DA, no qual foi verificado uma redução significativa na atividade da enzima colina acetiltransferase que sintetiza a acetilcolina, e aumento da acetilcolinesterase (AChE), que degrada a acetilcolina (SERINIKI; VITAL, 2008). Há ainda, evidências de que os prejuízos cognitivos característicos dessa doença, como a perda da memória recente, estavam relacionados à alteração da densidade de receptores colinérgicos e, ainda, diminuição da captação de colina e liberação de acetilcolina (SIVAPRAKASAM, 2006), além da perda de neurônios colinérgicos (GARCÍAAYLLÓN et al., 2008).

Uma vez que a acetilcolina executa um papel essencial na formação e manutenção da memória, para evitar sua falta no caso de doenças neurodegenerativas como a DA são utilizados fármacos anticolinesterásicos no tratamento de seus sintomas (FARLOW; HAKE, 2001; HOGAN; PATTERSON, 2002), com o intuito de minimizar a degradação de acetilcolina mantendo-a ativa por mais tempo na fenda sináptica.

1.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é a demência mais frequente em todo o mundo, representando 70% das doenças demenciais (HERRERA et al., 2002). Possui etiologia multifatorial e é

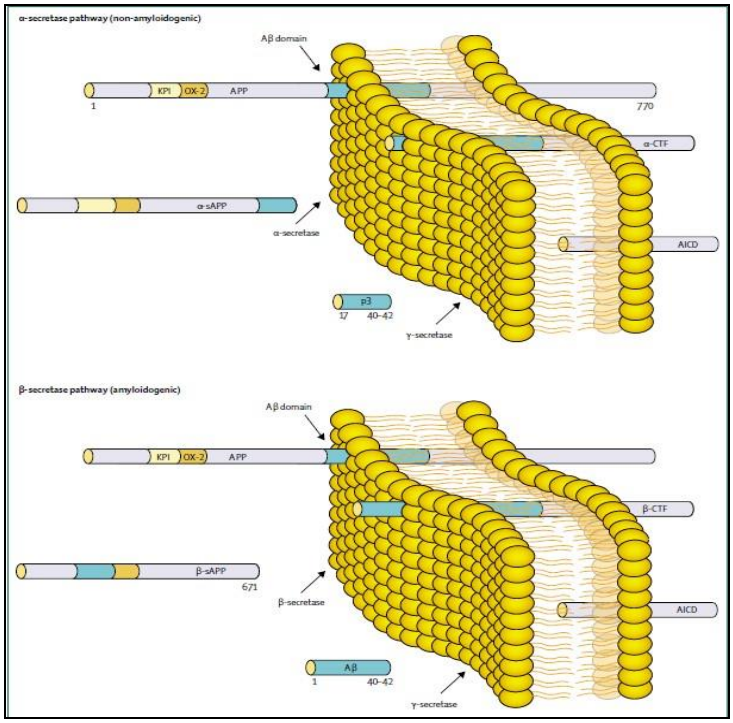
descrita na literatura como uma demência progressiva e irreversível, caracterizada, dentre outros fatores, pela presença de grande número de placas senis e novelos neurofibrilares (SMITH, 1999). Como consequência, ocorre a perda de neurônios em regiões do cérebro que regulam o comportamento de aprendizagem e memória, levando à falha progressiva na memória de fatos recentes e à perda de outras funções cognitivas. Em geral, a DA de acometimento tardio, de incidência ao redor de 60 anos de idade, ocorre de forma esporádica, enquanto que a DA de acometimento precoce, de incidência ao redor de 40 anos, mostra recorrência familiar (SMITH, 1999).

Nesse contexto, ocorre perda característica de neurônios, além da presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (BALLARD et al., 2011), sendo o córtex e o hipocampo as regiões mais vulneráveis (ZHANG et al., 2011).

O depósito de peptídeo β-amiloide acarreta a formação dessas placas e o gene que codifica a proteína PPA (proteína precursora amiloide) localiza-se no braço longo do cromossomo 21 e apresenta 18 exons (parte do gene que vai codificar para uma proteína). No entanto, pode haver uma alteração dessa forma com a retirada dos exons 7, 8 e 15, gerando transcritos diferentes. Isso ocorre durante os cortes realizados na molécula de DNA para o processamento do mRNA. Esses transcritos modificados são transportados para a superfície celular, sendo clivados por uma α-secretase (dando origem a um produto não-amiloidogênico) ou por uma β-secretase e γ-secretase, originando um produto amiloidogênico (SAMAIA, 2000). A ocorrência dessa clivagem no resíduo 712/713 do terminal carboxi origina um peptídeo de 40 aminoácidos, pouco tóxico e produzido em pequena quantidade.

Por outro lado, a clivagem na posição 714 dará origem a um peptídeo com 42-43 aminoácidos, amiloidogênica, muito tóxico e produzido em grande quantidade, ou seja, possibilita maior depósito extracelular por ser um peptídeo insolúvel e com maior tendência de agregação (SANDBRIK, 1996, figura 1). Isso ocorre porque, uma vez livres, esses peptídeos vão se agrupando e formando protofibrilas e, como dito anteriormente, formam agregados insolúveis que estão diretamente relacionadas à patogênese da doença. Esses depósitos situados no meio extracelular dificultam a transmissão da mensagem entre os neurônios, pois atrapalham a atividade dos neurotransmissores.

FIGURA 1 - A VIA AMILOIDOGÊNICA E NÃO AMILOIDOGÊNICA CLIVAGEM DA APP.



A clivagem da APP pode ocorrer, por duas enzimas: a α- e a β-secretase. A α-secretase age dentro do domínio βA, dividindo-o, em seguida, o domínio restante da APP é clivado pela ɣ-secretase e ocorre a liberação de um segundo peptídeo, menor, o p3. Esta é a via não amiloidogênica do processamento da APP. A β-secretase age em um sítio de clivagem anterior ao domínio βA, liberando, assim, o peptídeo solúvel. Quando a ɣ-secretase cliva o fragmento restante, o domínio βA é liberado inteiro, podendo ter 40 ou 42 aminoácidos, que são os peptídeos βA1-40 e βA1-42, respectivamente. Estes peptídeos, principalmente o βA1-42, têm alta capacidade de agregação e formação das placas senis. Por isso, essa é a chamada via amiloidogênica do processamento da APP (BLENNOW, 2006)

Outro mecanismo diretamente relacionado à patogênese da DA é a formação de aglomerados neurofibrilares intraneuronais oriundos de filamentos de uma forma fosforilada de uma proteína associada ao microtúbulo, a Tau. Assim, os emaranhados se formam quando ocorre a agregação errada dessa proteína nativa, prejudicando sua função normal de estabilizar os microtúbulos neuronais (SERENIKI; VITAL, 2008).

É valido ressaltar que apesar desses mecanismos estarem diretamente relacionados à DA eles também ocorrem no processo normal de envelhecimento, ainda que de forma menos frequente e severa. Gellerstedt (1933) descreveu que 80% dos indivíduos idosos no processo de envelhecimento sem demência apresentam algum grau de depósito (placas senis ou de emaranhados

neurofibrilares). No entanto, em indivíduos que apresentam os sinais clínicos da doença o cérebro está, provavelmente, mais susceptível aos processos neurodegenerativos que evoluem progressivamente e comprometem a memória, a comunicação e as atividades diárias.

1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E SISTEMA COLINÉRGIO

A maioria das eferências colinérgicas parte do prosencéfalo basal, área formada por centenas de neurônios localizados nos núcleos septal medial, banda diagonal, *substantia innominata* e núcleo basal de *Meynert* (JACKSONVILLE; MCKINNEY, 2005). Esses neurônios projetam-se para o hipocampo, neocortex, partes do córtex límbico e amígdala e modulam as funções cognitivas.

Muitos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas estão relacionados aos receptores nicotínicos. No sistema nervoso central os subtipos de receptores nicotínicos encontrados com maior frequência são α7 e α4β2. Com relação aos receptores α7, é válido ressaltar que receptores situados no terminal pré-sináptico aumentam a liberação de outros neurotransmissores, já os receptores localizados na região pós-sináptica estão relacionados a uma rápida transmissão excitatória (BERTRAND; DANI, 2007; WONNACOT et al., 2006;).

Com relação ao tratamento farmacológico da doença, os inibidores de acetilcolinesterase, como dito anteriormente, são amplamente utilizados. Como exemplo, são descritos a tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina. O uso desses medicamentos leva ao aumento da função colinérgica central, pela inibição das enzimas que degradam o neurotransmissor ACh. Consequentemente, a ACh tem maior disponibilidade, aumentando sua capacidade de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (GROSSBERG, 2003).

1.4 FORMAÇÃO DE RESERVA COGNITIVA PARA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA

A literatura vem mostrando que a manutenção da função cognitiva durante a velhice depende da formação de reservas cognitivas e estruturais (NILSSON; PEKNY, 2007; PETROSINI et al., 2009), o que serviria para a construção de uma resiliência cognitiva, que pode ser entendida como uma forma de resistência a possíveis injúrias. Essas reservas são construídas a partir 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.

Do ponto de vista biológico, essas reservas se traduzem no aumento da expressão de proteínas (neurotrofinas) ou aumento da funcionalidade de sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação da memória. Recentemente, nosso grupo de pesquisa vem focando o interesse no aumento da funcionalidade do sistema colinérgico, que sabidamente está envolvido com a modulação da memória de longo prazo e a relação desse sistema com a neurotrofina BDNF (do inglês "brain-derived neurotrophi factor", que significa fator neurotrófico derivado do cérebro).

Uma das estratégias muito utilizadas para promover a formação de reserva cognitiva é a manutenção de animais em ambiente enriquecido. Nesse sentido, em trabalho recente mostramos que a estimulação cognitiva de camundongos mantidos em ambiente enriquecido durante a velhice produziu efeitos tão benéficos quanto à mesma estimulação feita ao longo de toda a vida. Além disso, foi demonstrado o aumento da densidade de receptores colinérgicos nicotínicos α7, aumento da enzima colina acetiltransferase e aumento da densidade de BDNF (BARALDI et al., 2013).

Sabe-se que a BDNF influencia a expressão de receptores colinérgicos α7, uma vez que aparentemente essa neurotrofina sustenta a função colinérgica de longo prazo. Neurotrofinas são famílias de proteínas que são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios. A BDNF é a neurotrofina mais distribuída pelo SNC (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2008*)*. Ela aparece em grande concentração no hipocampo, córtex cerebral e amígdala (MURER et al., 2001), seus efeitos estão relacionados a vários processos nessas áreas, incluindo plasticidade sináptica, diferenciação e sobrevivência neuronal, neuroproteção, resiliência neuronal e recuperação contra vários danos celulares (HU ; RUSSEK, 2008).

Além disso, BDNF está envolvida na regulação de receptores α7 no hipocampo e em neurônios parassimpáticos (MASSEY et al., 2006; ZHOU et al., 2004). Com esses dados, pudemos inferir um aumento na funcionalidade do sistema

colinérgico como um modulador da potenciação de longa duração e, consequentemente, da formação da memória de longa duração (BARALDI et al., 2013).

A presente proposta de pesquisa foi baseada em mais um trabalho recente de nosso grupo em que observamos que treinar a atenção de ratos submetidos a um modelo de neurodegeneração em equipamento de esquiva ativa melhorou a memória dos animais e aumentou a densidade de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) α7 em áreas relacionadas à atenção, memória e emoções (VIEL et al., 2012). Dessa forma, o treino, seria semelhante a uma estratégia de formação de reserva cognitiva e manutenção da memória, por meio da melhora da transmissão colinérgica nesse contexto.

Dando continuidade ao estudo do envolvimento do receptor α7 com a recuperação da memória em um modelo de neurodegeneração, no presente projeto novamente elegemos o treino em esquiva ativa, aplicado semanalmente, como estratégia para a formação da reserva cognitiva e manutenção da memória de camundongos infundidos cronicamente com o peptídeo β-amiloide. Esse projeto também é continuidade do projeto de iniciação científica, recentemente apoiado pela FAPESP (processo nº 2011/ 07365-9, beneficiária: Milena Telles).

1.5 OBJETIVO

O objetivo geral desse projeto foi investigar os efeitos do treino semanal em esquiva ativa para a manutenção da memória frente a um processo neurodegenerativo e verificar o envolvimento do sistema colinérgico nesse contexto. Para isso, os objetivos específicos foram:

1. Avaliar os efeitos do treino semanal para a memória de animais infundidos com o peptídeo β-amiloide na ausência e presença do antagonista nicotínico metilicaconitina (MLA);
2. Avaliar os níveis da neurotrofina BDNF e atividade da enzima acetilcolinesterase, no cérebro e sangue dos animais, como possíveis indicadores de formação de reserva cognitiva;

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, de 3 a 4 meses de idade (com peso aproximado de 30g), fornecidos pelo Biotério do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em caixas de dimensões 40 cm x 34 cm x 17 cm (em um número de aproximadamente cinco animais por caixa), e os experimentos foram iniciados somente após um período mínimo de habituação ao biotério de sete dias.

As caixas foram forradas por serragem de sabugo de milho e renovadas de dois em dois dias. Além disso, os animais tiveram livre acesso à água e ração para roedores (NutriLab). A condição ambiental do biotério envolveu um rigoroso controle de temperatura (22 ± 1 ºC) e ciclo claro-escuro de 12 h (luz a partir das 07:00 h).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os "princípios éticos para uso de animais de laboratório" descritos pela Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL, antigo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA) e de acordo com a Lei Arouca, aprovada em 2008.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do ICB/USP (nº164 nas fls. 143 do livro 02).

2.2 LISTAS DE SAIS E REAGENTES

- Tampão HEPES (4 mM, pH7)

- Peptídeo β-amiloide (1-42): Sigma (#A9810)

- E-64: Sigma (#E3132) diluído em água destilada

- Metililcacotinina : Sigma(#M168) diluída em água destilada

- kit BDNF Emax ® ImmunoAssay System (PROMEGA/ref G7611)

-kit Acetylcholinesterase Assay (ab138871)

-Tampão Tris (molaridade 20 mM pH 7,4)

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para participarem do protocolo, os animais foram selecionados de acordo com a capacidade para aprender e memorizar uma tarefa. Para isso, foi utilizado o equipamento de esquiva ativa, um instrumento de aprendizado no qual a memorização está relacionada a uma resposta operante do animal no equipamento.

O equipamento possui dois compartimentos intercomunicados por uma passagem na parede divisória. O chão é formado por barras metálicas, que permitem a passagem de uma corrente elétrica com intensidade controlável. A porção superior da caixa contém uma campainha e uma lâmpada fixadas. Cada animal foi colocado individualmente no equipamento e teve 5 minutos de habituação antes de cada sessão. O animal foi então submetido a 50 provas de condicionamento (teste de aquisição), com 20 segundos de intervalo entre cada uma. Após as primeiras 25 provas, o camundongo foi deixado no equipamento em uma pausa de 5 min - para promover a reconsolidação da memória (ROSSATO et al., 2007)- seguida das 25 provas restantes. Cada prova foi constituída de um estímulo condicionado (EC) de 2 s (campainha de 70 dB, 760 Hz e lâmpada acesa) seguido de um estímulo não-condicionado (ENC) de 4 s (choque de 0,5 mA). Em cada sessão foi registrado o número de vezes em que o animal passou de um lado para outro da caixa durante o EC, ou seja, o número de respostas condicionadas (RC). As sessões foram conduzidas sempre no mesmo período do dia (entre 9h e 16h). De acordo com a experiência prévia do grupo (AMARAL et al, 2010, VIEL et al., 2008, 2012), parte dos animais não aprende a tarefa, pois não consegue fazer a conexão entre os estímulos condicionado e não-condicionado. Dessa forma, os animais passaram por sessões repetidas do protocolo, onde duas sessões foram

realizadas 24 e 48 horas após a sessão de aquisição, seguindo o mesmo protocolo experimental. No 3º dia de observação, aqueles animais que apresentaram 30 a 70% de respostas condicionadas (ou seja, que conseguiram relacionar os estímulos luminoso e sonoro ao perigo iminente do choque) foram considerados capazes de aprender a tarefa (VIEL et al., 2008). Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais e submetidos posteriormente a uma cirurgia estereotáxica para implante de minibombas osmóticas.

Nesse sentido, em trabalho publicado recentemente (VIEL et al., 2012) mostramos que a submissão semanal dos animais a esse protocolo experimental de EA causou alteração da densidade de proteínas no córtex frontal (área sabidamente relacionada à atenção), no hipocampo e na amígdala (áreas envolvidas com memórias relacionadas a estímulos aversivos ou carregados de emoções). Dessa forma, esse protocolo foi aceito na literatura como um treino relacionado a atenção e ao estimulo aversivo e foi usado no presente trabalho como uma estratégia para manutenção da memória dos animais.

Para certificarmos que as respostas comportamentais não foram devidas a alterações na locomoção, todos os animais passaram por um teste de atividade motora. Para isso, foi utilizado um equipamento (modelo 7430, Ugo Basile, Comério, Itália) constituído por uma caixa acrílica transparente (35 cm x 23 cm x 20 cm) equipada com um conjunto de sensores de infra-vermelho horizontais para registrar a atividade locomotora e um conjunto de sensores verticais para registrar a exploração vertical.

Após a seleção, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais.

Grupo 1: Controle- animais infundidos com veículo, n = 16 animais;

Grupo 2: βA - animais infundidos com o peptídeo β-amiloide, n = 18 animais;

Grupo 3: βA e MLA - animais infundidos com o peptídeo β-amiloide e com o antagonista nicotínico de α7 metilicaconitina, n = 12 animais;

Grupo 4: MLA - animais infundidos com o antagonista nicotínico de α7 metililcaconitina, n = 11 animais.

2.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DAS MINI-BOMBAS

Os animais selecionados foram submetidos à cirurgia para implante de minibombas osmóticas (Alzet, modelo 1004, Cupertino, CA, EUA), seguindo método descrito anteriormente (FRAUTSCHY et al., 1998) e já validado por nosso grupo (AMARAL et al., 2010; VIEL et al., 2008, 2012). As minibombas foram preenchidas com veículo (4 mM HEPES, pH 8.0 - Grupo 1), peptídeo β-amiloide (0,46 nmol com 0,22 nmol de E-64, um inibidor de cisteíno proteinases - Grupo 2), peptídeo βamiloide juntamente com MLA 256 nmol (e 0,22 nmol de E-64 - Grupo 3), MLA (256 nmol - Grupo 4). A proteína β-amiloide foi identificada como um dos principais componentes dos depósitos de amiloide cerebral característicos da DA (JARRET et al., 1993). O Aβ (1-42) é muito mais amiloidogênico, oligomeriza e forma fibrilas com mais facilidade (HARPER; LANSBURY, 1997). O trans-(epoxysuccinyl)-l-leucylamino-4guanidinobutane (E-64) utilizado, extraído da *Aspergillus japonicus* é um inibidor de cisteíno-proteases irreversível, potente e altamente seletivo. As cisteíno-proteases estão implicadas em vários processos de regulação e de degradação em células animais e vegetais. Muitas das proteases são fortemente inibidas pelo E-64 (GROVRIN; LEVINE, 1999). O fármaco metilicacotinina (MLA) é uma toxina natural e foi investigada anteriormente pela capacidade de antagonizar diferentes subtipos de respostas nicotínicas neuronais em várias tipos de receptores nicotínicos (DRASDO et al., 1992).

Após a anestesia com 10mg/ml de cetamina e 0,46mg/ml xilazina a cabeça do animal foi imobilizada e uma cânula de aço inoxidável (Brain kit 3, Alzet, Cupertino, CA, EUA) foi implantada no ventrículo lateral do animal usando um instrumento de estereotaxia seguindo as coordenadas: 0,8 mm ântero-posterior,1,0 mm mediolateral em relação ao bregma e 2,0 mm na direção dorsoventral ao crânio (FRANKLIN; PAXINOS, 2007). A outra extremidade da cânula foi conectada a um catéter de polivinilcloreto (DE = 1,14 mm, DI = 0,69 mm) ligado a uma mini-bomba osmótica que foi implantada na região subcutânea, no pescoço do animal. O conteúdo da mini-bomba osmótica foi liberado em um fluxo de 0,11 µL/ h durante 28 dias (volume total de 100 µL/ 73,92 µL infundido), de acordo com as instruções do fabricante. Após cinco semanas, os animais foram anestesiados com inalação de

isoflurano e, em seguida, decapitados. O cérebro e sangue dos animais foram extraídos.

As amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante e, após 30 minutos em temperatura ambiente, foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4 ºC para coleta do soro. Os cérebros foram imediatamente congelados em dimetilbutano a -50 ºC. Ambos foram armazenadas a -80 ºC para serem futuramente utilizados.

2.5 DOSAGEM DA DENSIDADE DE BDNF LIVRE TOTAL

As áreas cerebrais relacionadas à memória (córtex e hipocampo) foram separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1%Triton X-100 e um tablete de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, a 4 ºC e os sobrenadantes foram separados e armazenados a 80 ºC. A a dosagem da concentração de proteínas, tanto no cérebro quanto no soro, foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976).

Para a dosagem da concentração de BDNF nas amostras de soro, córtex e hipocampo, foi utilizado um kit de ELISA sanduíche (enzyme-linked immunosorbent assay - BDNF Emax ® ImmunoAssay System (PROMEGA / ref G7611), para detecção sensível e específica de BDNF maduro, livre nas amostras. As amostras foram diluídas em tampão debloqueio (“block and sample 1x”, fornecido pelo kit). Inicialmente, uma placa de 96 poços de fundo plano foi revestida com anticorpo anti-BDNF monoclonal (mAb) para ligar aa BDNF solúvel ao fundo da placa. Após essa incubação a placa foi preenchida como o tampão de bloqueio para bloquear ligações não específicas. Em seguida, com o padrão de BDNF fornecido pelo kit uma curva-padrão foi preparada (com concentrações variando entre 7,8 e 500 pg/mL). Após aplicar os volumes relacionados à curva-padrão e as amostras teciduais à placa, o anticorpo policlonal de BDNF (pAb) foi adicionado. Em seguida, a placa foi lavada, o anticorpo anti-IgY foi adicionado seguido do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). A quantidade de BDNF na solução de ensaio é proporcional à intensidade da cor gerada na reação de oxidação-redução.

Ao final, a reação foi interrompida com ácido clorídrico 1N e a leitura foi feita na leitora de placa Biotek Eon, com software Gen 5 2.0, a 450nm.

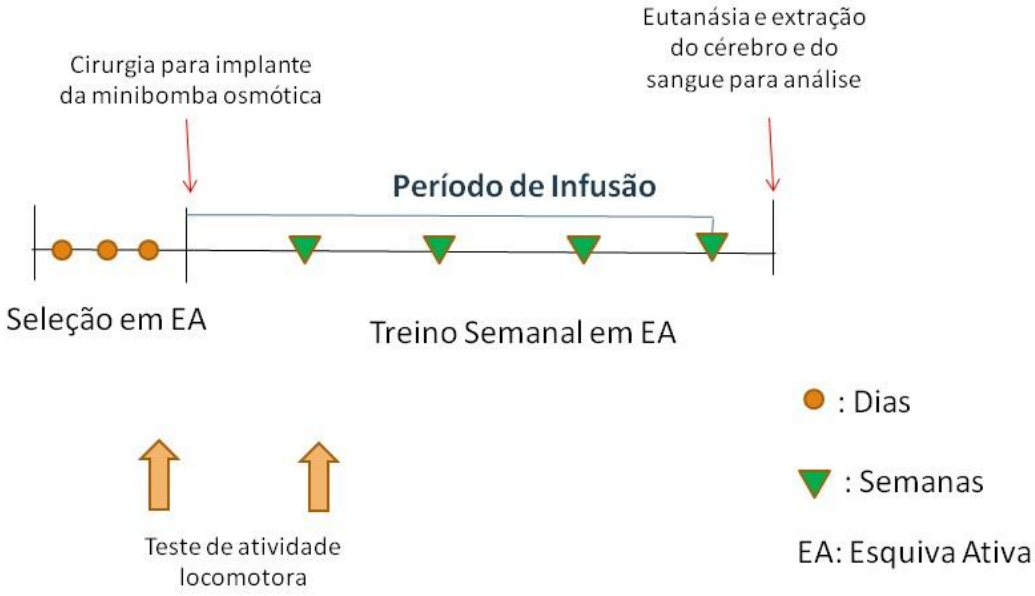
2.6 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

Para dosagem de AChE foi utilizado o método de ELISA (Abcam - ab138871) com homogenatos de cérebro e hipocampo e amostras de soro obtidos como descrito no item anterior. O método se baseia na detecção da atividade da AChE que ocorre pela ligação do reagente de Ellman (DTNB) com a tiocolina. Essa é produzida pela hidrólise da acetilcolina pela enzima AChE.

Amostras de soro, córtex e hipocampo foram diluídas em tampão Tris 20 mM (pH 7.4). Em uma placa de 96 poços e fundo plano foram adicionadas concentrações crescentes de AChE (1 - 1000 mU/mL) para a formação de uma curva-padrão, juntamente com as amostras teciduais diluídas. Em seguida, uma solução de acetiltilcolina e DTNB foi adicionada a todos os poços. Após incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, a leitura da atividade da AChE foi feita em leitora de placas a 410 nm.

2.7 DESENHO EXPERIMENTAL

FIGURA 2 - PROTOCOLO COMPORTAMENTAL



Protocolo comportamental utilizado para o treino de atenção sustentada, em equipamento de esquiva ativa. Inicialmente, os animais foram selecionados em três dias consecutivos em equipamento de esquiva ativa. Em seguida, os animais que apresentaram respostas condicionadas entre 30-70% foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de minibomba osmótica. O período de infusão foi de 28 dias, durante o qual os animais foram submetidos a quatro treinos semanais no mesmo equipamento (uma vez por semana). Após o treino, os animais foram eutanasiados. Os animais também passaram por dois testes de atividade locomotora, antes e após a cirurgia.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como médias ± erro-padrão das médias. Para a seleção dos animais, foram comparadas as respostas condicionadas do primeiro e terceiro dias, utilizando-se o teste t de Student para dados pareados, no programa Graph Pad Prism 5.0. Os dados obtidos semanalmente em esquiva ativa foram analisados utilizando-se Análise de Variância de duas vias para medidas repetidas, seguida do pós teste de Bonferroni. Foram considerados como fatores a indução de neurodegeneração e o bloqueio do receptor α7 com MLA. O terceiro dia de observação, denominado “Confirmação do Aprendizado”, foi utilizado como referência para comparação. Para essa análise, foi utilizado o programa Statistica (versão7/2004).

Os dados da análise semanal do comportamento foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário, dentro de cada grupo experimental. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

Os dados obtidos nas análises de ELISA foram expressos como médias ± erro padrão e analisados utilizando-se o programa Prisma. Foi feita ANOVA de duas vias, seguida do pós teste de Bonferroni, considerando a neurodegeneração e bloqueio do receptor como fatores.

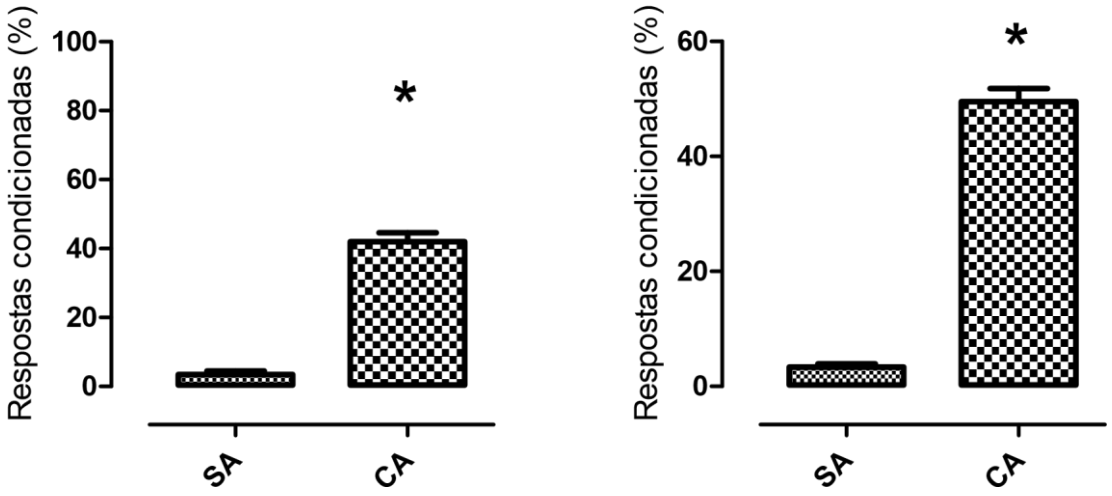
3 RESULTADOS

3.1 SELEÇAO DOS ANIMAIS

Na primeira seleção dos animais, durante o primeiro contato com o equipamento de esquiva ativa (sessão de aquisição - SA), os animais apresentaram média de respostas condicionadas correspondente a 2,4 ± 0,5%. Após três dias consecutivos de exposição ao equipamento (prova denominada Confirmação do Aprendizado - CA), os mesmo animais apresentaram um aumento significante das respostas condicionadas de 10 vezes (24,2 ± 2,8 %, $P < 0,01$), o que mostrou que os animais aprenderam a tarefa. Ainda, 42,5% do total de animais apresentou pelo menos 30% de respostas condicionadas (Figura 3A). Esses camundongos foram selecionados para serem submetidos à cirurgia estereotáxica.

Alguns meses depois, o protocolo de seleção foi aprimorado com a inclusão de uma pausa de 5 minutos após a 25ª prova no equipamento de esquiva ativa. Na SA os animais apresentaram 2,6 ± 0,4% de repostas condicionadas, não sendo diferente do protocolo anterior. Por outro lado, após três dias, na CA foi observado um aumento de 14 vezes (36,4 ± 2,6%) nas respostas condicionadas. Dessa forma, 66,2% dos animais foram selecionados (Figura 3B) e submetidos à cirurgia estereotáxica.

FIGURA 3 - APRIMORAMENTO DO PROTOCOLO COMPORTAMENTAL EM ESQUIVA ATIVA



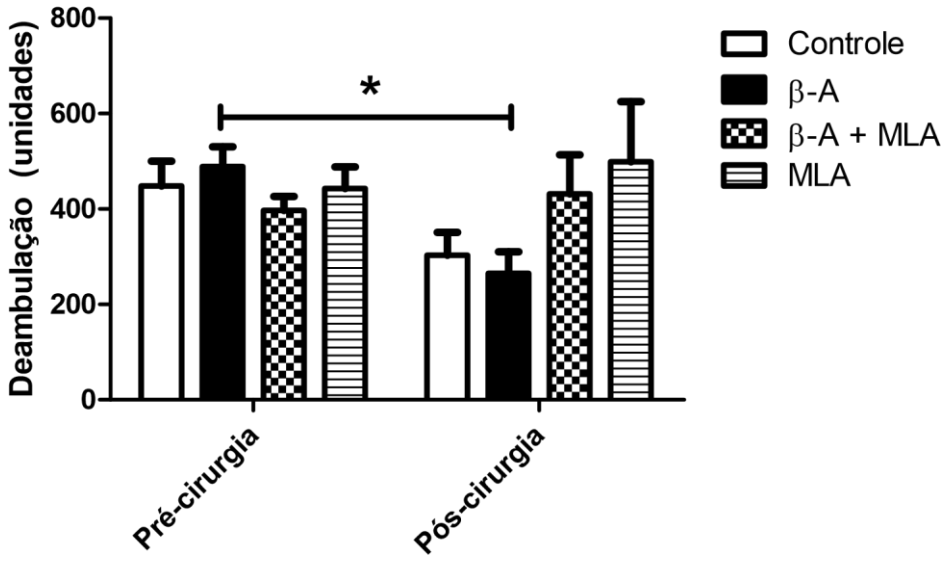
Respostas condicionadas (em %) de camundongos submetidos ao equipamento de esquiva ativa. A confirmação do aprendizado (CA) foi realizada após três dias de submissão diária dos animais ao equipamento. A) Protocolo inicial, sem pausa de 5 minutos. B) Protocolo com a pausa de 5 minutos. SA: sessão de aquisição (primeiro contato dos animais com o equipamento). Os símbolos são as as médias ± erros-padrão das respostas condicionadas, em porcentagem, dos animais com desempenho acima de 30% selecionados antes (A, n = 47) e após (B, n = 77) a inclusão da pausa. *: P < 0,0001.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA

A avaliação da atividade locomotora foi realizada antes e após a cirurgia de implante das mini-bombas osmóticas. Na avaliação da deambulação realizada antes da cirurgia, não houve diferença estatística entre os animais distribuídos nos diferentes grupos (Controle: 448,0 ± 52,2 unidades; βA: 489,1 ± 41,3 unidades; βA + MLA: 397,0 ± 29,5 unidades; MLA: 442,8 ± 45,3 unidades, Figura 3). Após a cirurgia, porém, o grupo βA apresentou redução significativa da deambulação (265,1 ± 45,2 unidades, P < 0,05, Figura 4).

-

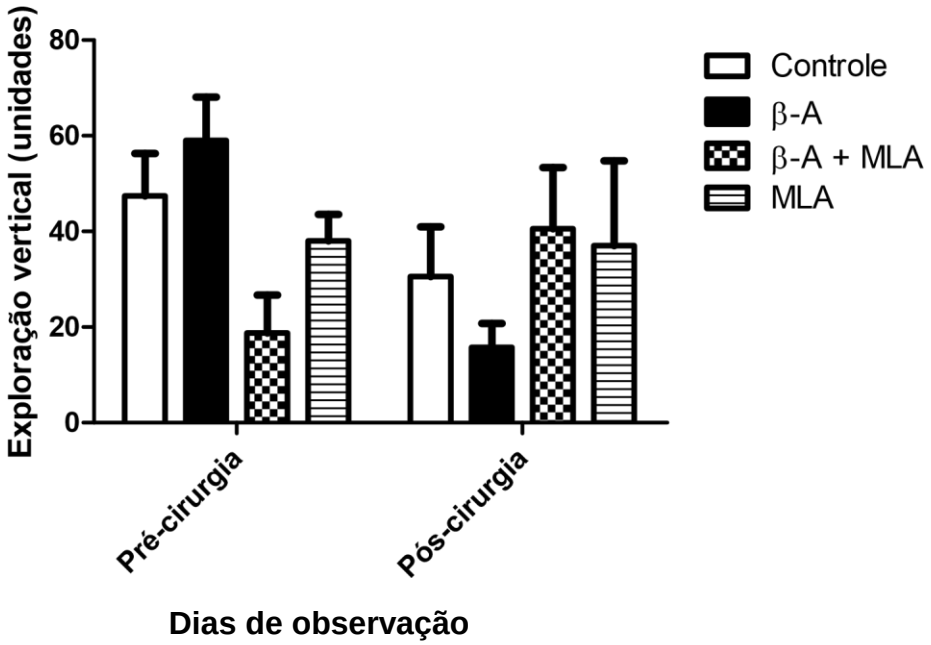
FIGURA 4 - DEAMBULAÇÃO DE CAMUNDONGOS.



Deambulação de camundongos antes e após a cirurgia de implante da mini-bomba osmótica Grupo Controle (n= 14), Grupo βA (n= 16), Grupo βA + MLA (n= 10), Grupo MLA (n= 8). Os histogramas representam as médias ± erros-padrão das médias. *: P < 0,05.

Com relação à exploração vertical, não houve diferença estatística entre os grupos na observação realizada antes da cirurgia (Controle: 47,4 ± 8,9 unidades; βA: 59,0 ± 9,1 unidades; βA + MLA: 18,8 ± 7,9 unidades; MLA: 38,0 ± 5,5 unidades). Da mesma forma, após a cirurgia, os animais não apresentaram diferença estatística dentro de cada grupo ou entre si (Figura 5).

FIGURA 5 - EXPLORAÇÃO VERTICAL DE CAMUNDONGOS



Exploração vertical de camundongos antes e após a cirurgia de implante da mini-bomba osmótica Grupo Controle (n= 14), Grupo βA (n= 16), Grupo βA + MLA (n= 10), MLA (n= 8). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os histogramas representam as médias ± erros-padrão das médias.

3.3 EFEITO DO TREINO SEMANAL E DOS TRATAMENTOS POR INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR NA MEMÓRIA.

Para avaliar os efeitos do treino de atenção juntamente com a infusão crônica do veículo, de βA, βA + MLA e MLA na memória dos camundongos, todos os grupos foram submetidos semanalmente ao equipamento de esquiva ativa. As avaliações comportamentais foram feitas até a 3ª semana após a cirurgia pois, entre a 3ª e a 4ª semanas vários animais arrancaram as inserções das minibombas osmóticas, deixando a dúvida sobre a continuidade do tratamento. Dessa forma, os dados relacionados ao comportamento da 4ª semana não foram considerados.

Após o terceiro dia de aprendizado da tarefa, a porcentagem de respostas condicionadas (RC) de todos os animais selecionados foi semelhante, com média de

-

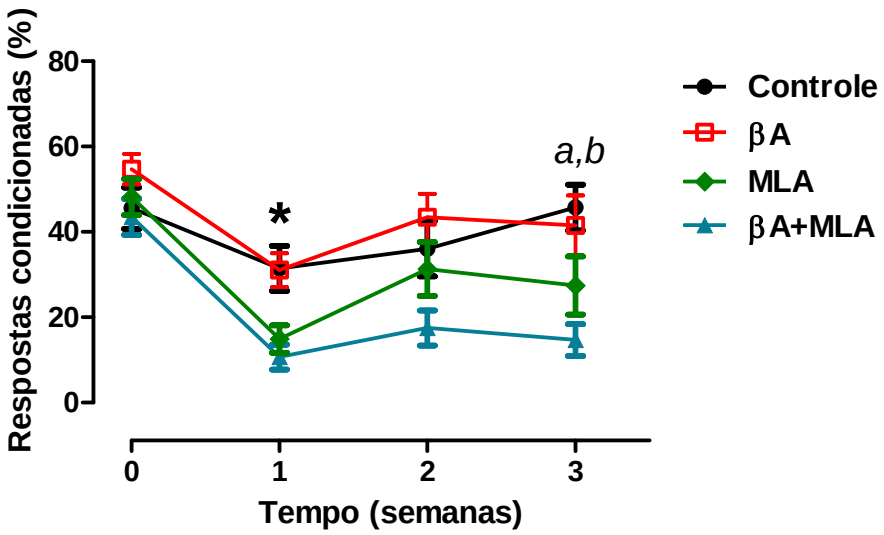
48,0 ± 2,1%. Essa foi considerada a semana zero, pois a partir dessa semana começou a infusão crônica com os fármacos e o treino semanal de atenção (Figura 6).

Na análise geral do experimento foi verificada uma interação significativa [$F_{(3,46)}$ = 3,8644, P < 0,05] entre os fatores tempo e tratamento, sendo o efeito principal dessa interação a presença do antagonista nicotínico MLA. Dessa forma, após uma semana de cirurgia, o grupo Controle não apresentou diferença estatística nas RC (31,4 ± 5,2%), mostrando que a cirurgia não alterou a memória dos animais. Além disso, após três semanas de treino semanal, as RC (45,7 ± 5,3%) desse grupo foram semelhantes àquelas observadas na semana zero, o que sugere que a cirurgia e a infusão crônica do veículo não interferiram com a memória dos animais.

Por outro lado, uma semana após a cirurgia, os animais dos grupos βA, βA + MLA e MLA apresentaram redução significativa das RC em relação à semana zero (33,1 ± 4,0%, P < 0,01; 10,7 ± 2,9%, P < 0,001 e 14,9 ± 3,2%, P < 0,001, respectivamente, Figura 6).

Após duas semanas de treino semanal, os grupos βA e MLA apresentaram reversão da perda de memória, pois as RC tornaram-se comparáveis àquelas obtidas na semana zero de observação (41,5 ± 7,0% e 27,4 ± 6,8%, respectivamente). Entretanto, os animais do grupo βA + MLA não apresentaram reversão da perda da memória, pois a redução significativa das RC em relação à semana zero de observação foi mantida na terceira semana (14,7 ± 3,8%, P < 0,001). Além disso, foi observado que a resposta comportamental dos animais infundidos com βA + MLA foi 32,2% menor (P < 0,01) do que a resposta do grupo Controle e 35,4% menor (P < 0,001) do que a resposta do grupo infundido somente com o peptídeo βA (Figura 6).

FIGURA 6 - RESPOSTAS CONDICIONADAS DE CAMUNDONGOS EM ESQUIVA ATIVA



Respostas condicionadas de camundongos (em %) obtidas em equipamento de esquiva ativa durante o período de treino semanal em esquiva ativa. os símbolos e barras verticais correspondem às médias ± erros-padrão. *: $p < 0,001$ em relação à semana zero de observação para os grupos βa, βa + mla e mla. a: $p < 0,01$ entre os grupos controle e βa + mla; b: $p < 0,001$ entre os grupos βa e βa + mla (controle: n = 16, βa: n = 18, βa + mla: n = 12, mla: n = 11).

3.4 ANÁLISE, SEMANA A SEMANA, DO COMPORTAMENTO DOS DIFERENTES GRUPOS.

A análise, semana a semana, dos grupos estimulados teve o objetivo de entender melhor o comportamento dos animais submetidos ao treino de atenção semanal. Para isso, em cada semana de observação, a porcentagem de RC de cada grupo foi analisada e comparada a cada 10 provas, em um total de 50 provas, observadas a cada dia de treinamento semanal, como descrito anteriormente (VIEL et al., 2012). Dessa forma, o histograma relacionado às 10 primeiras provas (histogramas brancos), em todos os gráficos e para todos os grupos, representa a média da memória que os animais retiveram da tarefa em relação à última exposição ao equipamento (na semana anterior). Os histogramas seguintes representam quanto o animal conseguiu reaprender ou relembrar a tarefa ao longo das outras 40 provas.

-

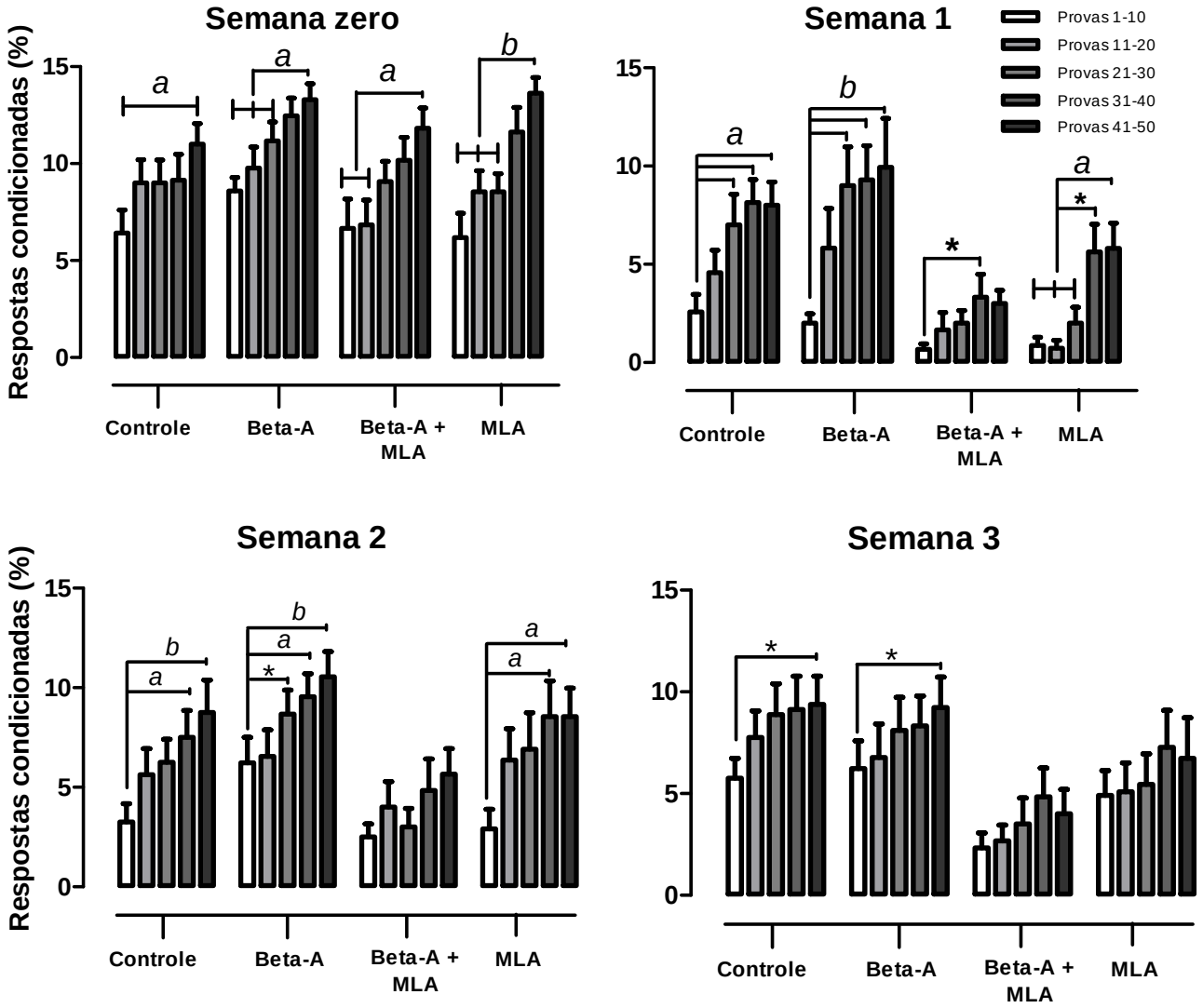
Na semana zero, os animais de todos os grupos apresentaram diferença significativa (P < 0,01 e P < 0,001) de RC ao longo das quartas e quintas sessões de provas, mostrando que inicialmente não conheciam a tarefa mas, ao longo das 50 provas, aprenderam a mesma (Figura 7, Semana zero).

Uma semana após a cirurgia todos os grupos aparentaram não se lembrar da tarefa, pois as RC nas provas 1-10 foram inferiores a 5% (Figura 7, Semana 1). Porém, os grupos Controle e βA, ao longo das 50 provas, mostraram aumento crescente e significante das RC (P < 0,01 e P < 0,001, respectivamente), mostrando a capacidade de reaprender ou de relembrar da tarefa. No grupo βA + MLA foi verificado aumento significante nas RC (P < 0,05) somente após 30 provas, o que mostrou uma dificuldade em recuperar a memória da tarefa. No grupo MLA, todavia, foi observado aumento das RC ao longo das provas, porém menos significante (P < 0,05 e P < 0,01) do que o observado na semana zero, i.e., antes da cirurgia (Figura 7, Semana 1).

Na semana 2, assim como na semana anterior, os grupos também apresentaram RC nas provas 1-10 ao redor de 5%, o que demonstrou novamente que os animais não se lembraram da tarefa que fizeram na semana anterior. Ao longo das demais provas, entretanto, a resposta foi aumentando de forma significativa nos grupos Controle (P < 0,01 e P < 0,001), βA (P < 0,05; P < 0,01; P < 0,001) e MLA (P < 0,01), mostrando que os animais foram capazes de relembrar a tarefa. Por outro lado, o grupo βA + MLA não apresentou alteração significativa das RC ao longo das 50 provas no equipamento de esquiva ativa, mostrando que não recuperou a memória da tarefa (Figura 7, Semana 2).

Finalmente, na sessão de provas realizada na Semana 3 foi observado novamente que os grupos controle e βA continuaram a apresentar aumento significante (P < 0,05) das RC ao longo das 50 provas, mostrando que mantinham a memória da tarefa e/ou a capacidade de reaprendê-la. Por outro lado, os grupos βA + MLA e MLA não apresentaram aumento significativo das RC ao longo das provas, o que sugere que a ausência dos receptores nicotínicos α7 em ambos os grupos impediu que os animais reaprendessem a tarefa (Figura 7, Semana 3).

FIGURA 5 - ANÁLISE SEMANAL DAS RESPOSTAS CONDICIONADAS EM ESQUIVA ATIVA



Análise semanal das respostas condicionadas dos grupos controle, βa, βa + mla e mla submetidos ao treino de atenção sustentada em equipamento de esquiva ativa. para isso, cada uma das 50 provas foi dividida em 5 grupos de 10 provas. os histogramas e barras verticais correspondem à média ± erro-padrão. *: $p < 0,05$; a: $p < 0,01$; b: $p < 0,001$ (controle: n = 16, βa: n = 18, βa + mla: n = 12, mla: n = 11).

-

3.5 PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE ELISA.

Com o intuito de determinar a diluição ótima das amostras a ser utilizada nos experimentos de ELISA para dosagem de BDNF e detecção atividade da acetilcolinesterase, foram realizados testes dos dois kits para diferentes diluições de amostras. A partir dessa determinação, foi escolhida para dosagem de BDNF as diluições 1:2 das amostras de soro e 1:40 para amostras de córtex e hipocampo. Já para o ensaio de ELISA de AChE ficou determinado a diluição de 1:200 das amostras de soro e 1:50 para amostras de córtex e hipocampo.

3.6 DOSAGEM DE BDNF.

A fim de averiguar um indicador de formação de reserva cognitiva, foi feita a dosagem de BDNF em homogenatos de córtex e hipocampo dos animais. Além disso, foi feita a mesma dosagem no soro, com intuito de avaliar o nível sanguíneo de neurotrofinas plasmáticas e sua relação com a memória.

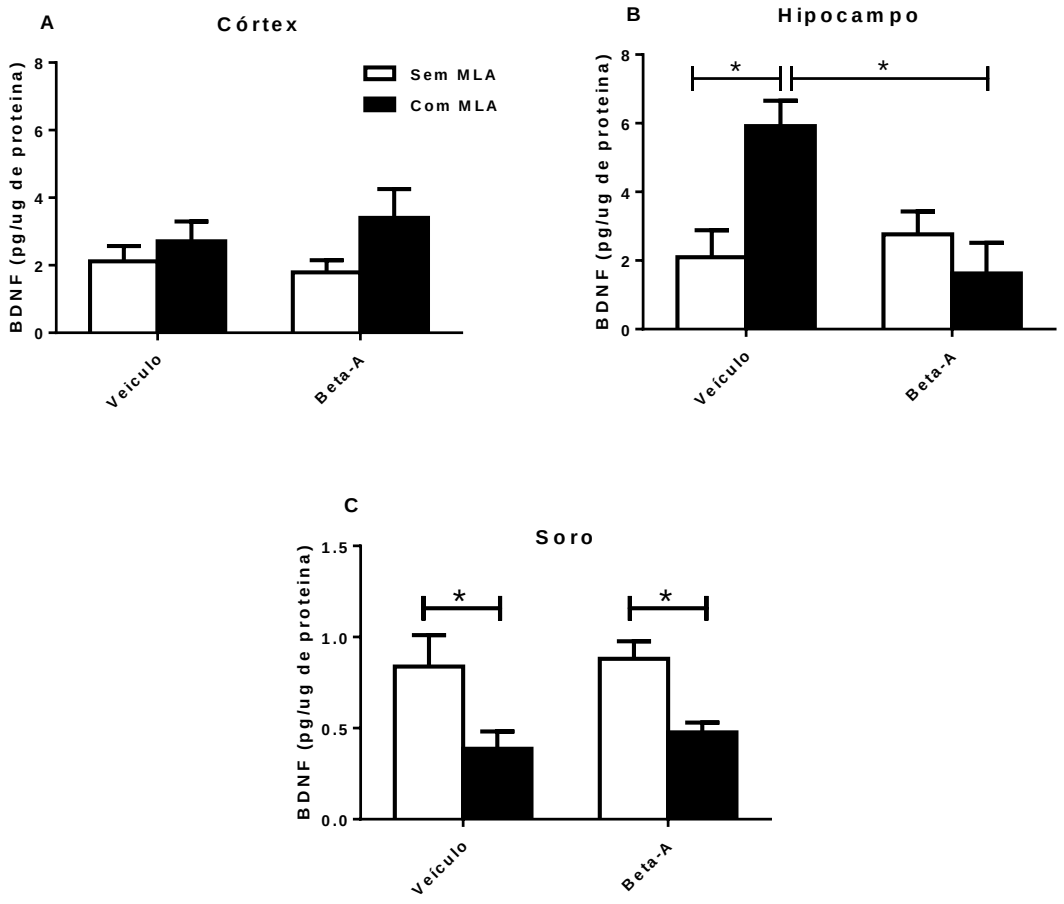
Com relação à densidade de BDNF no córtex não foi observada diferença entre os grupos (P= 0,3693). Com esse resultado é possível sugerir que nem o bloqueio do receptor nem a neurodegeneração exerceram efeito sobre a densidade da proteína nessa área cerebral (Figura 8A).

Em amostras de hipocampo, foi verificado que tanto a presença de neurodegeneração quanto a presença de MLA influenciaram na densidade de BDNF [interação significativa: $F_{(3,19)} = 8,85$, $P < 0,01$]. Dessa forma, houve aumento significativo de 2,8 vezes na densidade da neurotrofina no grupo infundido com MLA (7,65 ± 1,84 pg/mg) em relação aos animais infundidos com veículo (2,10 ± 0,79 pg/mg de proteína, $P < 0,05$). Por outro lado, a presença de neurodegeneração interferiu significativamente nesse aumento, pois a infusão conjunta de MLA e o peptídeo βA causou redução significativa de 78,8% da densidade de BDNF (P <

0,05), quando comparados com os animais infundidos com MLA, mas sem neurodegeneração (figura 8).

Com relação à densidade de BDNF no soro, a presença de MLA causou redução significativa de 45,9% e 37,6% da neurotrofina em animais com neurodegeneração (0,47 ± 0,05 pg/mg) e sem neurodegeneração (0,52 ± 0,16 pg/mg), respectivamente, quando comparados com animais infundidos somente com o veículo (0,84 ± 0,17 pg/mg) e somente com o peptídeo βA (0,88 ± 0,10 pg/mg) [$F_{(3,40)}$ = 10,28, P < 0,01, Figura 8C].

FIGURA 8 - ANÁLISE DA DOSAGEM DA DENSIDADE BDNF



Análise da dosagem da densidade BDNF por método de ELISA no córtex (A), hipocampo (B) e soro (C) dos animais de diferentes grupos. Os símbolos e barras correspondem à média ± erro-padrão. **: P < 0,01 e *: P < 0,05.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERASE (AChE).

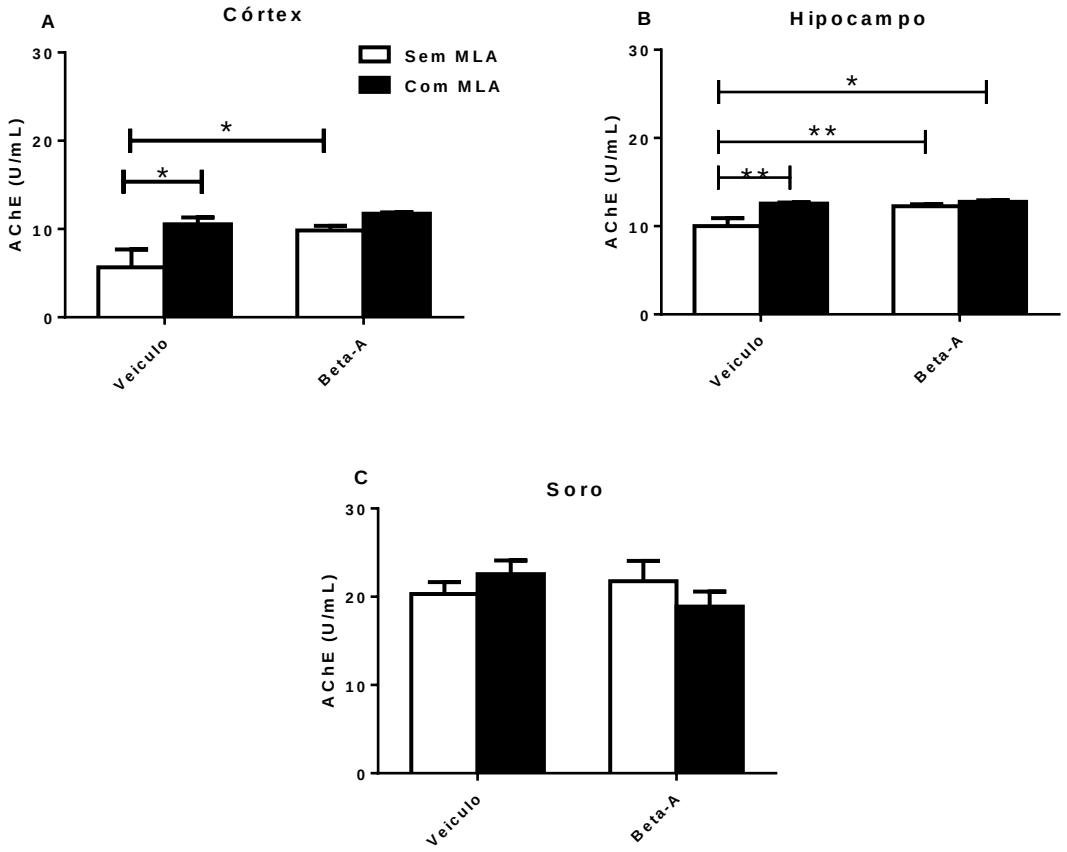
A fim de avaliar a relação do sistema colinérgico com a formação da memória de longa duração nesse modelo de neurodegeneração, a atividade da AChE, enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina, foi avaliada pelo método de ELISA em homogenatos de cérebro e no soro dos animais.

No córtex, a infusão do antagonista nicotínico MLA [$F_{(3,16)} = 10,73$, $P < 0,01$)] ou a infusão do peptídeo β-amiloide [$F_{(3,16)} = 6,77$, $P < 0,05$)] alteraram a atividade da enzima. Houve aumento significativo de 1,8 vezes da atividade da AChE em animais infundidos com MLA (10,53 ± 0,77 U/mL, $P < 0,05$), quando comparada à de animais infundidos somente com o veículo (5,67 ± 2,03 U/mL). Da mesma forma, a presença neurodegeneração aumentou significativamente em 1,7 vezes a atividade da enzima (9,83 ± 0,52 U/mL), em comparação aos animais infundidos com veículo (Figura 9A).

Em amostras de hipocampo, foi verificado que a presença de neurodegeneração e MLA influenciou a atividade da enzima tanto isoladamente, quanto em conjunto. Assim, houve aumento significativo de 1,2 vezes na atividade da AChE no grupo infundido com MLA (12,57 ± 0,12 U/mL) em relação aos animais infundidos com veículo (10,00 ± 0,91 U/mL, $F_{(3,17)} = 10,08$, $P < 0,01$). Da mesma forma, a presença de neurodegeneração aumentou significativamente a atividade da enzima em 1,2 vezes (12,27 ± 0,23 U/mL). Ademais, a infusão conjunta de βA e MLA também aumentou, significativamente, a atividade da enzima em 1,2 vezes (12,77 ± 0,17 U/mL) em relação aos animais controles, mostrando que houve interação significativa entre esses tratamentos [$F_{(3,17)} = 4,55$, $P < 0,05$] (Figura 9B).

Com relação à atividade da enzima no soro, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 9C).

FIGURA 9 - ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE



Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase por método de ELISA no córtex (A), hipocampo (B) e soro (C) dos animais dos diferentes grupos. Os símbolos e barras correspondem à média ± erropadrão. *: P < 0,05.

4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas tem sido observado o aumento da longevidade na população em geral. No Brasil, esse aumento do número de idosos ocorre como nunca visto antes, tornando-se um contexto complexo e propulsor de demandas em diversas áreas. Dentro desse novo contexto do envelhecimento populacional, o objetivo dos estudos nessa área, das ações sociais e do sistema de saúde deixa de ser apenas aumentar a longevidade, mas principalmente, manter a capacidade funcional de cada indivíduo. Assim, a importância de se viver mais pode ser percebida quando os anos adicionais têm qualidade e significado. Na velhice natural existem declínios biológicos e cognitivos inerentes ao processo de envelhecimento, o que não implica necessariamente no comprometimento total das atividades diárias e da autonomia do indivíduo. Diferentemente, pacientes de doenças neurodegenerativas como a DA possuem autonomia reduzida, perda da capacidade cognitiva e o comprometimento na realização das tarefas diárias.

A DA é a demência mais prevalente em nosso país, e por isso, tornou-se alvo de muitas pesquisas e investimentos, com o objetivo de retardar sua progressão e minimizar suas consequências (GREEN, 2001). A DA é caracterizada pela perda característica de neurônios devido à formação das placas amiloides em suas ligações e pela formação de aglomerados neurofibrilares intraneuronais, processos que dificultam a transmissão da mensagem e a atividade dos neurotransmissores em diversas regiões relacionadas à formação da memória (IZQUIERDO et al., 2008).

Nessas regiões temos a ação de vários sistemas de neurotransmissores. Dentre eles, o colinérgico está diretamente relacionado à DA, e por isso, é foco dessa pesquisa.

A “hipótese colinérgica” da demência surgiu a partir de exames *post-mortem* de tecidos cerebrais de pacientes com Alzheimer que mostraram uma redução significativa na atividade da enzima colina acetiltransferase (SERINIKI; VITAL, 2008). Além disso, manifestações da demência têm sido relacionadas à perda de neurônios colinérgicos. Dessa forma, uma vez que a acetilcolina executa um papel essencial na memória, são utilizados fármacos anticolinesterásicos no tratamento dos sintomas da DA (FARLOW; HAKE, 2001; HOGAN E PATTERSON, 2002), com o intuito de minimizar a degradação de acetilcolina mantendo-a ativa por mais tempo na fenda sináptica.

Neste trabalho, a forma utilizada para investigar a relação do sistema colinérgico com a DA foi o estudo do papel de seus receptores, em especial o receptor nicotínico (nAChR) α7, e o estudo da atividade da enzima acetilcolinesterase. O receptor α7 vem sendo associado a atividade hipocampal (MEALING; MIELKE, 2009), reconsolidação da memória (BOCCIA et al., 2010), e atenção sustentada (HOYLE et al., 2006; REZVANI et al., 2009; VIEL et al., 2012; YOUNG et al., 2007). Portanto, o intuito foi entender se a melhora da memória verificada com o estímulo promovido pelo treino semanal está relacionada a vias neuronais dependentes de receptores α7 e os efeitos (ou consequências) para a atividade da enzima.

O treino semanal de atenção foi utilizado como estratégia, pois em trabalho recente de nosso grupo de pesquisa mostramos que treinar a atenção de ratos, submetidos a um modelo de neurodegeneração, em equipamento de esquiva ativa (treino semanal) melhorou a memória dos animais e aumentou a densidade de nAChR α7 em áreas relacionadas à atenção, memória e emoções (VIEL et al., 2012).

Dessa forma, no presente trabalho, repetimos esses treinos semanais em camundongos. Porém, a fim de entender o papel do receptor α7, incluímos um grupo de animais infundidos com βA e metilicaconitina (MLA, antagonista nicotínico) e um grupo só com MLA, pois o bloqueio desse receptor contribuiu para o entendimento do seu papel, quando comparado aos demais grupos.

Inicialmente, foi verificado que todos os animais aprenderam a tarefa pois, no último dia da seleção no equipamento de esquiva ativa, as respostas condicionadas de todos os animais selecionados foi semelhante. Esse desempenho também foi observado na análise semanal dessas respostas.

O protocolo de seleção foi aprimorado devido à inclusão de uma pausa de 5 minutos após a 25ª prova no equipamento, já que no treino em esquiva ativa existe um elemento de treinamento, ou seja, o animal é condicionado a realizar uma resposta específica em um intervalo fixo de tempo (STOLERMAN, 2010). Nesse teste a atividade do animal é influenciada por suas consequências, seja o reforço negativo (choque) ou a fuga, por isso, a introdução de uma pausa na sessão de aprendizado pode ser vista como duas submissões ao treinamento, melhorando a aquisição da informação.

No presente estudo, foi realizada a avaliação da atividade locomotora, e não foi verificada diferença entre os animais distribuídos nos diferentes grupos. Após a cirurgia, porém, o grupo βA apresentou redução da deambulação. No entanto, no desempenho na esquiva ativa eles tiveram, no mesmo período, um aumento nas respostas condicionadas, mostrando que não havia déficit locomotor nesse grupo.

Após cirurgia e ao longo de todo tempo de observação, os animais do grupo controle mantiveram a memória da tarefa na esquiva ativa. Deste modo, a cirurgia para implante das mini-bombas osmóticas e a infusão semanal não tiveram efeito sobre a memória, ou seja, o procedimento não desencadeou déficits cognitivos aos camundongos, assim como foi observado anteriormente, em ensaios semelhantes utilizando ratos e camundongos (AMARAL et al., 2010; VIEL et al., 2008).

Os animais dos dois grupos infundidos com o peptídeo βA apresentaram queda significativa de memória uma semana após a cirurgia, diferente do grupo controle. Esse fato se relaciona, provavelmente, à infusão crônica do peptídeo βA que causa neurodegeneração cortical e hipocampal (IORES-MARÇAL et al., 2006), bem como formação de placas nas mesmas áreas (VIEL e et al., 2008).

Por outro lado, os animais do grupo infundido somente com βA e treinados semanalmente apresentaram uma melhora evidente e significativa da memória. Diferentemente, no trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, foi observado que a infusão crônica do peptídeo βA em camundongos, sem o treino semanal, promoveu uma queda de 54,7% na memória dos animais após 35 dias de infusão (AMARAL et al., 2010).

Desde já, podemos inferir que animais infundidos com o peptídeo βA e submetidos ao estímulo do treino seguido de um período de recuperação, como o imposto pelo equipamento de esquiva ativa, podem apresentar recuperação da memória. Esse resultado também foi observado em ratos Wistar (VIEL e et al., 2012). Esse desempenho pode estar relacionado com a formação de vias neuroprotetoras nas áreas relacionadas ao aprendizado. Nesse contexto, ocorre o aumento da liberação de neurotransmissores, e consequentemente um aumento das sinapses, além de modificar a densidade de espículas dendríticas (HOOGENRAAD;

HOTULAINEN, 2010). Esse fenômeno, conhecido como neuroplasticidade, fortalece as conexões neuronais ou aumenta a associação entre neurônios (LYNCH, 2004).

No entanto, no grupo infundido com o peptídeo β-amiloide e com o antagonista nicotínico de α7 MLA, a redução da memória observada uma semana após a cirurgia foi mantida, apesar da estimulação semanal no equipamento, mostrando que os animais não conseguiram manter a memória da tarefa. Esse resultado difere do grupo que só recebeu βA e confirma nossa hipótese, pois podemos inferir que a infusão conjunta do peptídeo βA com o antagonista α7 impediu que o estímulo do treino de atenção desenvolvesse vias neuroprotetoras para a manutenção e resgate da memória como observamos no grupo βA. Vários estudos têm demonstrado que a ativação de receptores nicotínicos atenua a toxicidade do βA e a proteção a essa toxicidade é proporcional ao número de receptores nicotínicos expressos (BUCCAFUSCO, JONNALA, 2001; KIHARA et al., 1997; TAKATA et al., 2010). Dessa forma, observamos que o receptor α7 possui um papel importante nessas vias, e por isso, com o MLA garantindo o seu bloqueio, não observamos melhora da memória com a estimulação semanal em esquiva ativa.

William e colaboradores (2007) propuseram um modelo no qual os receptores nicotínicos α7 teriam um papel neuroprotetor nos primeiros estágios da DA. Nesse modelo, o oligômero β-amiloide é capaz de ativar transitoriamente receptores nicotínicos α7 e seus mensageiros fornecendo um sinal neurotrófico crucial para a manutenção da integridade do hipocampo e também, contrabalanceando os efeitos tóxicos do acúmulo do β-amiloide.

A fim de entender esse papel neuroprotetor dos receptores nicotínicos α7, testamos a hipótese de que a infusão isolada do antagonista desse receptor no hipocampo causaria redução da função cognitiva de camundongos submetidos a um treino de atenção. O aparecimento desses déficits de memória foi visto no desempenho semanal desses animais pois, após a infusão do MLA, eles tiveram uma perda brusca da memória da tarefa, com um desempenho abaixo de seus controles, e uma recuperação parcial da memória com o treino semanal no equipamento. Nesse sentido, a infusão do antagonista causou uma redução da resposta comportamental, semelhante àquela vista anteriormente nos animais infundidos com βA, mas uma falha na recuperação.

Com isso, pode-se pensar no papel central do receptor α7 na modulação de aprendizado e memória no hipocampo dorsal (LEVIN; NOTT, 2006) pois, além da função neuroprotetora discutida anteriormente na análise do grupo βA + MLA, os resultados obtidos com a infusão isolada do MLA parecem estar relacionados com o conceito de reserva cognitiva, uma vez que os animais que receberam MLA não apresentaram recuperação total da memória. Essa conclusão foi construída a partir da comparação entre o declínio de desempenho do grupo infundido com esse antagonista e a melhora do desempenho das respostas condicionadas de animais que não tiveram o receptor α7 bloqueado. Essa melhora foi observada mesmo na presença do βA.

Nesse contexto, na presença de neurodegeneração, a função cerebral desses animais seria mantida devido a reservas estruturais (ou seja, densidade neuronal e conectividade sináptica) ou funcionais (eficácia dos circuitos neuronais) (revisado por MILGRAM et al., 2006; PETROSINI et al., 2009) dependentes de α7. Dessa forma, seria possível relacionar o receptor α7 com a formação de resiliência cerebral, ou seja, o aumento das capacidades funcionais e estruturais do cérebro que permitam que o mesmo se recupere ou se torne resistente a injúrias, choques ou distúrbios neuropatológicos (PETROSINI et al., 2009).

Em nível molecular, existem diversos marcadores do aumento da densidade, conectividade ou da eficácia dos circuitos neuronais, nesse trabalho avaliamos a densidade da neurotrofina BDNF, que é um vital componente da plasticidade sináptica e da formação da memória, e está envolvida em processos de crescimento e regeneração de neurônios, além de participação em vias de apoptose e sobrevivência celular (ALLEN; DAWBARN, 2006).

A BDNF modula a função e a estrutura da sinapse influenciando a despolarização da célula, ativando a transdução do sinal e promovendo a intensa estimulação dos circuitos excitatórios (MASSEY, 2006).

Nesse trabalho, não houve diferença na densidade de BDNF no córtex dos diferentes grupos,

Sabe-se no entanto, que no hipocampo, o processo biológico aceito para explicar a formação de longa duração, o LTP (potenciação de longa duração) é mantida pela ação da BDNF no receptor TrkB, promovendo síntese de proteínas responsáveis por mudanças estruturais e aumento da resposta sináptica a uma

estimulação fraca (YOSHII, 2007). Além disso, o sistema colinérgico está envolvido na amplificação da indução da LTP (FUJII et al., 1999; FUJII; SUMIKAWA, 2000, MATSUYAMA; MATSUMOTO, 2003), e consequentemente vem sendo ligado à consolidação do aprendizado e memória (BARROS et al., 2004; LEVIN; NOTT, 2006; NIEWIADOMSKA et al., 2009).

Já foi demonstrado, também, que o sistema colinérgico regula a produção de BDNF e NGF no hipocampo, via ativação de receptores muscarínicos (BERZAGHI et al., 1993). Nas amostras de hipocampo do presente trabalho observamos que o bloqueio do receptor nicotínico α7 aumentou significativamente a densidade de BDNF. A hipótese levantada é a de uma possível ativação de via compensatória pelo sistema colinérgico, aumentando BDNF e ativando toda sua via de sinalização, pois foi descrito que os receptores TrkB também estão presentes em alguns neurônios colinérgicos e oferecem suporte à função colinérgica (ALLEN et al., 2011). A contrapartida também é existente, pois a ação de BDNF foi relacionada ao aumento da expressão e do agrupamento de α7 em interneuronios no hipocampo (KAWAI et al., 2007; MASSEY et al., 2006) e a ação de BDNF influenciou a sobrevivência de neurônios colinérgicos, aumentando a síntese da enzima que sintetiza a acetilcolina (SCHWAB, 1992).

Por outro lado, a infusão de βA não promoveu alteração da densidade de BDNF no hipocampo, córtex ou no soro de animais infundidos com βA. Vários trabalhos apontam a redução de BDNF no soro ou plasma como um biomarcador para esquizofrenia (TOYOKA et al., 2002), depressão e doença de Alzheimer (POLYAKOVA et al., 2014; PLÁTENIÍK et al., 2014). Além disso, já foram descritas mudanças em 47% do tecido *post-mortem* dos neurônios que expressam TrkB (SALEHI et al., 1996), diminuição do nível de mRNA para BDNF no hipocampo (PHILLIPS, 1991) e diminuição do nível de BDNF maduro total em áreas relacionadas à memória em pacientes de DA (NARISAWA-SAITO, 1996). A ausência de alteração de BDNF nos tecidos cerebrais e no soro de animais infundidos com βA, no presente trabalho, pode ser devido ao curto tempo de instalação da neurodegeneração e/ou à estimulação em treino semanal, uma vez que, como demonstrado nos experimentos comportamentais, esses animais tiveram recuperação da memória. Concordando com essas observações, há trabalhos que demonstram que a expressão de BDNF e dependente da atividade neuronal (revisado por GREENBERG et al., 2009).

Por outro lado, o bloqueio do receptor α7 causou redução de BDNF no soro de todos os grupos. Essa redução demonstra, mais uma vez, que a ausência do receptor, mesmo nesse curto espaço de tempo, foi determinante para o prejuízo da memória.

Com relação à enzima acetilcolinesterase (AChE), segundo a hipótese mais aceita para explicar a etiologia da doença de Alzheimer, a atividade da AChE aumenta nesses pacientes (SERINIKI; VITAL, 2008). De fato, alguns trabalhos sugerem que a avaliação de alterações na atividade ou densidade da enzima no plasma e em tecidos poderia servir como um marcador para se acompanhar a progressão da doença (GARCIA-AYLLÓN et al., 2010; RAO et al., 2007). Em concordância com o que sugere a literatura, no presente trabalho foi verificado aumento significativo da atividade da enzima no córtex e no hipocampo dos animais infundidos com o peptídeo βA. É conhecido que neurônios colinérgicos são mais sensíveis à degeneração causada pela presença do peptídeo. Com a progressão da neurodegeneração, o peptídeo βA se acumula em neurônios que expressam receptores nicotínicos α7 e a internalização do peptídeo parece ser facilitada por sua ligação ao receptor nicotínico α7 em superfícies de células neuronais. Essa interação causa danos nesses neurônios, com consequente perda de terminais sinápticos (D'ANDREA; NAGELE, 2006). Aparentemente, a ausência de terminais colinérgicos, promove aumento compensatório da densidade e da atividade da AChE (GARCIA-AYLLÓN et al., 2010).

Da mesma forma, os animais infundidos com o antagonista nicotínico MLA apresentaram um aumento da atividade da enzima, o que poderia ser explicado de duas maneiras: 1) a redução da função dos receptores α7 neuronais poderia levar ao aumento compensatório da atividade da enzima e 2) a redução da função desses receptores em células da glia, poderia levar à redução da degradação do peptídeo βA, com aumento da formação de placas e destruição de neurônios colinérgicos.

Dessa forma, como no caso anterior, também ocorreria o aumento compensatório da enzima.

Corroborando a ideia de que o bloqueio de receptores nicotínicos é tão prejudicial para a memória quanto a infusão do peptídeo βA, no presente trabalho foi verificado que a infusão conjunta de βA e MLA também aumentou a atividade da AChE.

Não foi verificado aumento da atividade da enzima no soro dos animais, diferente do observado na literatura (GARCIA-AYLLÓN et al., 2010; RAO et al., 2007). Provavelmente esse fato se deveu, também, ao curto tempo de desenvolvimento da neurodegeneração, nesse modelo experimental (5 semanas), o que não foi suficiente para promover uma alteração periférica da atividade da enzima.

6 CONCLUSÕES

Com relação às observações comportamentais, é possível concluir que:

- ✓Animais infundidos com βA apresentaram perda de memória, que foi recuperada após treino de atenção semanal;
- ✓O bloqueio de receptores α7 por infusão crônica do antagonista MLA também promoveu perda da memória, porém a recuperação com o treino de atenção foi parcial.
- ✓A infusão conjunta de βA e MLA também promoveu perda da memória. Essa perda não foi revertida com o treino semanal.

Com relação à neurotrofina BDNF, é possível concluir que:

- ✓Animais infundidos com βA não apresentaram alteração da densidade da neurotrofina em tecidos cerebrais ou no soro, muito provavelmente por causa do curto tempo de indução da neurodegeneração, nesse modelo experimental e/ou pelo próprio estímulo produzido pelo treino de atenção.
- ✓Animais infundidos com MLA apresentaram aumento da densidade de BDNF no hipocampo, aparentemente como um mecanismo compensatório promovido pelo sistema colinérgico (talvez via receptores muscarínicos).
- ✓A infusão conjunta de βA e MLA promoveu uma queda significativa dessa neurotrofina no hipocampo, denotando que sem os mecanismos neuroprotetores promovidos pela presença de α7, a via da plasticidade neuronal é reduzida.

Com relação à enzima acetilcolinesterase, é possível concluir que:

- ✓Houve aumento significativo da atividade da enzima no córtex e hipocampo de animais infundidos com βA, como o que ocorre em pacientes da doença de Alzheimer.
- ✓O bloqueio crônico dos receptores α7 promoveu aumento da atividade da AChE nos mesmos tecidos, provavelmente por mecanismo compensatório pela redução da função de neurônios colinérgicos ou pela redução da degradação do peptídeo βA, aumentando a formação de placas senis.

- ✓O tratamento conjunto de βA e MLA também promoveu aumento da atividade de AChE.
- ✓Diferente do descrito na literatura, não houve alteração da atividade da AChE no soro dos animais devido, possivelmente, ao curto tempo de instalação da neurodegeneração, nesse modelo experimental.

Com esses dados pode-se sugerir que o receptor nicotínico α7 possui papel determinante para a recuperação da memória frente a um processo de neurodegeneração. Nesse sentido, a ausência de sua função é tão prejudicial para a memória quanto a neurodegeneração e leva ao aumento da atividade da AChE nos tecidos e recrutamento de mecanismos de resiliência tecidual a injúrias (aumento de BDNF). Porém, na presença de neurodegeneração, a ausência desses mecanismos de neuroproteção promovidos pelo receptor α7 reduzem a resiliência do tecido cerebral (aumento da atividade da AChE e redução da densidade de BDNF) e impedem a recuperação da memória dos animais.

Referências*

ALLEN, S. J.; WATSON, J. J. DAWBARN, D. The Neurotrophins and Their Role in Alzheimer's Disease. **Curr. Neuropharmac.,** v.9, n.4, p. 559-573, 2011.

AMARAL, F. A. et al. Participation Of Kinin Receptors On Memory Impairment After Chronic Infusion Of Human Amyloid-B 1-40 Peptide In Mice. **Neuropept.**, v. 44, n. 2, p. 93-97, 2010.

BARALDI, T. et al. Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. **Exp. Gerontol.**, v. 48, n. 8, p. 831-838, 2013.

BARROS, M.D. et al. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats, **Neurosci.**, v.126, p. 651-656, 2004.

BERZAGHI, M. et al. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in thedeveloping rat hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 9, p. 3818-3826, 1993.

BOCCIA, M. M.; BLAKE, M. G., KRAWCZYK, M. C. Hippocampal Alpha7 Nicotinic Receptors Modulate memory Reconsolidation Of An Inhibitory Avoidance Task In Mice. **Alzheimer's disease**, v. 368, p. 387-403, 2006.

CASTRO, B. M. **Funções motoras em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina.** 2006. 46 f. Dissertação (Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia). Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 6, p. 147-190, 1914.

D'ANDREA, M. R.; NAGELE, R.G. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, n. 6, p. 677-684, 2006.

DRASDO, A. et al. Methyllycaconitine: A novel nicotinic antagonist. **Mo. Cell. Neurosci.**, v. 3, n. 3, p. 237-243, 1992.

FRAUTSCHY, S. A. et al. Protease inhibitor coinfusion with amyloid beta-protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 20, p. 8311-8321, 1998.

FRANKLIN, K.B.J.; PAXINOS, G. The **Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, thirded.** 3. ed. San Diego: Academic Press, 2007. [s.p.]

FUJII, S.; J, Z., MORITA, N.; SUMIKAWA, K. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. **Brain. Research.,** v.846, p.137-143, 1999.

FUJII, S.; SUMIKAWA, K. Inactivation of α7 nicotinic ACh receptors and activation of non-α7 ACh receptors both contribute to long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. **Neurosc. letters**, v.286, p.134-138, 2000.

GARCÍA-AYLLÓN, M.S. et al. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. **PLoS ONE**, v. 5, n.1, 2010.

GELLERSTEDT, N. Zur Kenntnis Der Hirnveranderungen Bei Der Normalen Altersinvolution. **Unns. Lak. Foren. Forrh.**, v. 38, p. 193-408, 1993.

GROVRIN, E.; LEVINE, A. Purification of active cysteine proteases by affinity chromatography with attached E-64 inhibitor. **Protein. Expr. Purif.,** v.15, n. 3, p. 247-250, 1999.

GREEN, R. C. Diagnóstico e tratamento da Doença de Alzheimer e outras demências. In:___. **Avaliação do Paciente Idoso com Problemas Cognitivos.**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora da PUC, 2001. p. 21-43.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase Inhibitors For Thr Tratament Of Alzheimer`S Disease: Getting On And Staying On. **Curr. The. Res., v.**64, n. 4, p. 216-235, 2003.

HAKE, E. M.; FARLOW, M.R. New concepts in the drug therapy of Alzheimer's disease. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 2, n. 12, p. 1975-1983, 2001.

HARPER, J.D.; LANSBURY, P. T. Models of amyloid seeding in Alzheimier’s disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the timedependent solubility of amyloid proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 385-407, 1997.

HERRERA, E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v16, p.106-108, 2002.

HOTULAINEN, P.; HOOGENRAAD, C.C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. **J. Cell. Biol.**, v. 189, n.4, p. 619-629, 2010.

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

IORES-MARÇAL, L. M. et al. Bradykinin Release And Inactivation In Brain Of Rats Submitted To An Experimental Model Of Alzheimer's Disease. **Peptides,** v. 27, n. 12, p. 3363-3369, 2006.

IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An. Acad. Bras. Ciên.**, v. 80, n. 1, p.115-127, 2008.

KANDEL, E. R. The Molecular Biology Of Memory Storage: A Dialogue Between Genes And Synapses. **Science**, v. 294, p. 1030-1038, 2001.

KAWAI, H.; ZAGO, W. BERG, D. K. Nicotinic alpha 7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. J. **Neurosci.,** v. 15, n. 22 ou 18, p. 7903-7912, 2002.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas Dos Transtornos Psiquiátricos.** Porto Alegre: Ed. Artmed., 2004. v. 2, 503 p.

KOMULAINEN, P. et al. Bdnf Is A Novel Marker Of Cognitive Function In Ageing Women: The Dr's Extra Study. **Neurobiol. Learn. Mem., v.** 90, n.4, p. 596-603, 2008.

LYNCH, M. Analysis of the presynaptic signalling mechanisms underlying the inhibition of LTP in rat dentate gyrus by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. **Hippocampus**, v. 14, n. 1, p.4, 2004.

MASSEY, K. A.; ZAGO, W. M.; BERG, D. K. BDNF up-regulates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor levels on subpopulations of hippocampal interneurons. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 33, n. 4, p. 381-388, 2001.

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. **J. Pharmacol. Sci.,**, v.93, p.180-187, 2003.

MIELKE, J.G.; MEALING, G.A.R. Cellular distribution of the nicotinic acetylcholine receptor a7 subunit in rat hippocampus. **Neurosci. Res.**, v.65, p. 296-306, 2009.

MILGRAM, N.W.; SIWAK-TAPP, C.T.; ARAUJO, J.; Head, E. Neuroprotective effects of cognitive enrichment. **Ageing Res. Rev.**, v. 5, n. 3, p. 354-369, 2006.

MCKINNEY, M. JACKSONVILLE, M. C. Brain Cholinergic Vulnerability: Relevance To Behavior And Disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, p. 1115-1124, 2005.

NARISAWA-SAITO, M. et al. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. **Neuroreport**., v. 25, n. 7, p. 2925-2928, 1996.

NILSSON, M. et al. Environment Increases Neurogenesis In The Adult Rat Dentate Gyrus And Improves Spatial Memory. **J. Neurobiol.**, v.39, n.4, p. 569-578.

NIEWIADOMSKA, G.; BAKSALERSKA-PAZERA, M.; RIEDEL, G. The septohippocampal system, learning and recovery of function. **Prog. Neuropsych. Biol. Psychiatry**, v.33, p. 791-805, 2009.

NOTT, A.; LEVIN, E. Dorsal hippYoshii, A., Constantine-Paton, M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. **Nat. Neurosci.**, v. 10, n. 6, p. 702-711, 2007.

OLIVEIRA, C. E.; SALINA, M. E.; ANNUNCIATO, N. F. Fatores Ambientais Que Influenciam a Plasticidade Do Snc. **Acta Fisiátrica,** v. 8, n.1, p. 6-13, 2001.

PETROSINI, L. et al. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. **Brain. Res. Rev.**, v. 61, n.2, p. 221-239, 2009.

PLÁTENÍK, J. et al. GSK3β, CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. **Prog. Neuropsyc. Biol. Psychiatry,** v. 50, p. 83-93, 2014.

POLYAKOVA, M. et al. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis. **J. Affect. Disord.**, v. 174, p. 432-440, 2015.

PHILLIPS, H. S. et al. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. **Science**, v. 12, n. 250, p. 290-294, 1990.

RAO, A.A.; SRIDHAR, G.R.; DAS, U.N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer’s disease. **Med. Hypotheses**, v. 69, p. 1272-1276, 2007.

REZVANI, A.H. et al. Effect of R3487/MEM3454, a novel nicotinic a7 receptor partial agonist and 5-HT3 antagonist on sustained attention in rats. **Prog. Neuropsyc. Biol. Psychiatry,** v. 33, p. 269-275, 2009.

ROSSATO, J.I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn. Mem.**, v.14, p. 36-46, 2007.

SALEHI, A. et al. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. **Neuron.**, v. 51, n.1, p. 29- 42, 2001.

SAMAIA, P. B.; HOMERO, P. B. F. Aspectos Genéricos Da Doença De Alzheimer. Revisão De Literatura. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 27, n.2, 2000.

SANDBRINK, R. et al. Genes Contributing To Alzheimer's Disease. **Mol. Psychiatry.** v.1, p. 27-40, 1996.

SEIDL, E. M.; ZANNON, C. M. Qualidade de Vida e Saúde: Aspectos Conceituais e Metodológicos. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n.2, p. 580-588, 2004.

SCHWAB, M.E. et al. Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. **Brain. Res.,** v. 168, n.3, p. 473-483,1979.

SERENIKI, Adriana; VITAL, Maria Aparecida Barbato Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev. Psiquiatr. Rio Gd. Sul**, Porto Alegre , v. 30, n. 1, 2008 .

SIVAPRAKASAM, K. Towards a unifying hypothesis of Alzheimer's Disease: cholinergic system linked to plaques, tangles and neuroinflammation. **Curr. Med. Chem.,** v.13, p. 2179-2188, 2006.

SMITH, M. A. C. Doença De Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 21, n.2, p. 3-7, 1999.

SCHÖWE, N. M. et al. Avaliação do papel de receptores nicotínicos α7 na manutenção da memória de camundongos em modelo de neurodegeneração. In: 27. REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE). **Resumos**. Aguas de Lindoia, SP. 2004.

TAKATA, K.et al. Galantamine-induced amyloid-β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. **J. Biolol. Chem.**, v. 285, n. 51, p. 40180-40191, 2010.

TOYOOKA, K. et al. Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. **Pschyatry Res.,** v.110, n.3, p. 249- 257, 2002.

TURRIGIANO, G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.,** v.1, n.1, 2012.

VIEL, T.A. et al. Increases Of Kinin B1 And B2 Receptors Binding Sites After Brain Infusion Of Amyloid-Beta 1-40 Peptide In Rats. **Neurobiol. Aging.**, v. 29, n. 12, p. 1805-1814, 2008.

VIEL, T.A. et al. Chronic Infusion Of Amyloid-B Peptide And Sustained Attention Altered A7 Nicotinic Receptor Density In The Rat Brain. **Curr. Alzheimer Res.**, v.10, n.1, p.104-107, 2011.

VIEL, T.A. et al. Comparison Of Cognitive Stimulation During Life-Time And During The Elderly: Effects On Spatial Memory, On Neuroplasticity And On Cholinergic Markers Of Mice. **Neurosci. Meeting Planner**, 2011.

VIEL, T.A. et al. Chronic infusion of amyloid-β peptide and sustained attention altered α7 nicotinic receptor density in the rat brain. **Curr. Alzheimer. Res.**, 2012.

WONNACOTT, S. et al. Nicotinic Receptors Modulate Transmitter Cross Talk In The Cns: Nicotinic Modulation Of Transmitters. **J. Mol. Neurosci.,** v. 30, p.137-140, 2006.

YANG, J. et al.Enriched Environment Treatment Restores Impaired Hippocampal Synaptic Plasticity And Cognitive Deficits Induced By Prenatal Chronic Stress. **Neurobiol. Learn. Mem.,** v. 87, n. 2, p. 257-263, 2007.

YOUNG, J.W. et al. Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. **Eur. Neuropsychopharmacol.,** v. 17, p. 145-155, 2007.

YOSHII, A., Constantine-Paton, M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. **Nat. Neurosci.**, v. 10, n.6, p. 702-711, 2007.

ZHANG, X.; RAVID, R.; NORDBERG, A. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 237-243, 2000.