NATÁLIA MENDES SCHÖWE

RELAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO E PAPEL
DO SISTEMA COLINÉRGICO NA NEUROINFLAMAÇÃO

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

São Paulo
2013

NATÁLIA MENDES SCHÖWE

RELAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO E PAPEL
DO SISTEMA COLINÉRGICO NA NEUROINFLAMAÇÃO

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Tânia Araújo Viel

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Schöwe, Natália Mendes.

Relação entre o tratamento crônico com lítio e papel do sistema colinérgico na neuroinflamação / Natália Mendes Schöwe. -- São Paulo, 2013.

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: Alterações neuroquímicas ao longo do envelhecimento normal e aspectos neuroquímicos da doença de Alzheimer.

Versão do título para o inglês: Relationship between the chronic treatment with lithium and the role of cholinergic system in neuroinflammation.

1. Neuroinflamação 2. Sistema colinérgico 3. Lítio I. Viel, Profa. Dra. Tânia Araújo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Mendes Schöwe.

Título da Dissertação: Relação entre o tratamento crônico com lítio e papel do sistema colinérgico na neuroinflamação.

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 **81** nas fls. **105** 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 "*Relação entre o tratamento crônico com lítio e o papel do sistema colinérgico na neuroinflamação*" do qual participam o(s) aluno(s) **Natália Mendes Schöwe** 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 **23.09.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos meus pais e familiares, em nome de
todo apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora querida, pela oportunidade, pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos momentos de alegria e de crises (que também foram fundamentais para meu crescimento!) e ao seu marido, Hudson, meu co-orientador, que também teve um papel fundamental para a elaboração e execução desse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório: Ariadiny Caetano, Marielza Nunes, Marília Albuquerque, Milena Telles, Danilo Mourelle, Ticiane Baraldi, Káris Dong, Laura Coelho, Leandro Molina, Gabriela Cipolli, Karla Monteiro e Janaína Balthazar, pelo apoio, pela ajuda na bancada, pelas conversas, pelas tardes na Godere, pelas risadas e pela união.

À Prof^a Dr^a Carolina Demarchi Munhoz e ao Prof. Dr. Cristóforo Scavone, pela colaboração e por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse aprender ainda mais.

À Dielly Lopes, Leonardo Novaes e Nilton dos Santos, por toda a disposição e ajuda nos western blottings. Foi uma experiência curta, mas de imensa valia!

Ao Seu Martinho e ao Marco Chamma, por toda a atenção para comigo e cuidado para com meus camundongos.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, que possibilitou e permitiu que parte desse trabalho fosse lá executado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

À minha mãe muito querida e minha tia Marisa e tio Cláudio, por todo o suporte e também pelo apoio financeiro, depois que minha bolsa acabou.

Ao Rodrigo, meu namorado querido, pela compreensão e companheirismo em todos os momentos.

A Deus que ilumina meu caminho e meus pensamentos e me dá força a cada dia.

RESUMO

Schöwe NM. Relação entre o tratamento crônico com lítio e papel do sistema colinérgico na neuroinflamação. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Com o evidente envelhecimento da população mundial, demanda-se maior entendimento acerca das questões relacionadas ao seu processo biológico. Uma das alterações biológica na senescência é relacionada ao perfil imunológico, que implica em elevação de marcadores inflamatórios mesmo na ausência de estímulo. Esse cenário pode implicar, por exemplo, em piora de doenças crônico-degenerativas, pois nestes casos já há um processo inflamatório concomitante. Recentemente, tem-se estudado o envolvimento de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ como atenuadores do processo inflamatório no sistema nervoso central, uma vez que a “via anti-inflamatória colinérgica” é bem estabelecida na periferia. O lítio é um metal monovalente utilizado no tratamento do transtorno afetivo bipolar e, em microdoses, foi efetivo em estabilizar a memória de pessoas com doença de Alzheimer. Efeitos benéficos desse íon também têm sido relatados em processos inflamatórios, por meio da inibição da enzima GSK-3 β . Além disso, já foi demonstrado que o tratamento crônico com esse íon aumentou a captação de colina pelos terminais pré-sinápticos e a neurotransmissão colinérgica. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com microdoses de lítio para a formação de mediadores inflamatórios em cérebros de camundongos jovens, após injeção intraperitoneal de LPS, e se os receptores $\alpha 7$ estavam envolvidos nesse processo. Após sete meses de tratamento com lítio, foi observado que o grupo lítio-LPS apresentou formação da memória espacial, diferentemente do grupo água-LPS. Não foram observadas alterações na memória relacionada a estímulo aversivo, em esQUIVA inibitória, avaliados oito dias após a indução da inflamação aguda. Os ensaios moleculares indicaram que os níveis de IL-6, TNF- α , IL-10 e pGSK-3 β /GSK-3 β estavam iguais em todos os grupos, evidenciando que o processo inflamatório já estava terminado no momento da retirada do cérebro dos animais. Da mesma maneira, não houve diferença entre os grupos com relação à densidade dos marcadores colinérgicos, quais sejam a colina acetiltransferase e a subunidade $\alpha 7$, avaliados por western blotting. Com isso, não foi possível comprovar ou excluir o efeito anti-inflamatório das microdoses de lítio. Portanto, o desenho experimental deverá ser ajustado.

Palavras-chave: Neuroinflamação. Sistema colinérgico. Lítio.

ABSTRACT

Schöwe NM. Relationship between the chronic treatment with lithium and the role of cholinergic system in neuroinflammation. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

With the evident aging world population, it's greater the demand in understanding the issues related to their biological process. One change in the biological aging process is related to the immunological profile, which implies an increase of inflammatory markers in the absence of stimulus. This scenario may involve, for example, worsening of chronic degenerative diseases, because in these cases there is already a concomitant inflammatory process. Recently, researchers have been studying the involvement of $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors as attenuators of inflammation in the central nervous system, since the "cholinergic antiinflammatory pathway" is well established in the periphery. Lithium is a monovalent metal used in the treatment of bipolar disorder, and microdosing was effective in stabilizing the memory of people with Alzheimer's disease. Beneficial effects of these ions have also been reported in inflammatory processes through the inhibition of GSK-3 β . Furthermore, it was demonstrated that chronic treatment with this ion increased choline uptake by presynaptic terminals and cholinergic neurotransmission. The aim of this study was to evaluate the effects of chronic treatment with lithium microdosing for the formation of inflammatory mediators in the brains of young mice after intraperitoneal injection of LPS, and whether $\alpha 7$ receptors were involved in this process. After seven months of treatment with lithium, we observed that the lithium-LPS group did present spatial memory formation, unlike the water-LPS group. No changes were observed in related aversive stimulus in inhibitory avoidance assessed eight days after the induction of acute inflammation. The molecular assays indicated that levels of IL-6, TNF- α , IL-10 and pGSK-3 β /GSK-3 β were the same in all groups, indicating that the inflammatory process had been completed at the time of recession of animals' brains. Likewise, there was no difference between groups with respect to the density of cholinergic markers, which are choline acetyltransferase and $\alpha 7$ subunit, assessed by western blotting. Thus, it was not possible to confirm or exclude the anti-inflammatory effect of lithium microdosis. Therefore, the experimental desing should be adjusted.

Keywords: Neuroinflammation. Cholinergic system. Lithium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Envelhecimento e inflamação</i>	10
1.2 <i>Sistema Colinérgico e Inflamação.....</i>	11
1.3 <i>Lítio e Inflamação.....</i>	13
2 OBJETIVOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 <i>Animais</i>	17
3.2 <i>Tratamento com lítio e indução da neuroinflamação</i>	17
3.3 <i>Avaliação do consumo de água</i>	18
3.4 <i>Avaliação da atividade motora</i>	18
3.5 <i>Avaliação da memória espacial</i>	18
3.6 <i>Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo</i>	19
3.7 <i>Dosagem de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e TNF-α.....</i>	20
3.8 <i>Western-blotting para as enzimas CAT, GSK-3β, Glicogênio Sintase Quinase-3β fosforilada (pGSK-3β) e para o receptor nicotínico $\alpha 7$</i>	21
3.9 <i>Análise estatística</i>	22
4 RESULTADOS	24
4.1 <i>Ingestão semanal de H₂O ou lítio.....</i>	24
4.2 <i>Avaliação da atividade motora</i>	25
4.3 <i>Avaliação da memória espacial</i>	26
4.4 <i>Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo</i>	28
4.5 <i>Dosagem de IL-6, IL-10 e TNF-α no hipocampo.....</i>	29
4.6 <i>Padronização dos experimentos de Western-Blotting</i>	30
4.7 <i>Western-blotting para as Enzimas CAT, GSK-3β, pGSK-3β e para o receptor nicotínico $\alpha 7$</i>	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento e inflamação

O aumento do número de pessoas idosas no mundo decorre da diminuição da taxa de fecundidade aliada ao aumento crescente na expectativa de vida (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007). A diminuição da taxa de fecundidade vem ocorrendo por diversos fatores que incluem mudanças nas estruturas familiares e no estilo de vida das mulheres que, com sua inserção no mercado de trabalho, optaram por ter filhos mais tarde ou, ainda, renunciar à maternidade. Segundo Camarano (2006), o acréscimo na expectativa de vida resultou do “sucesso” de políticas econômicas e sociais e de avanços na tecnologia médica, advindas de uma melhoria das condições de vida em geral e de saúde, em particular.

Assim, o envelhecimento é um processo que se refere à mudança na estrutura etária da população, já que há um aumento do número de pessoas idosas (acima de 60 anos, como considera a Organização Mundial de Saúde, para países em desenvolvimento) em relação aos outros grupos etários (Carvalho, Garcia, 2003). Esse aumento é percebido ao analisarmos os dados demográficos do Brasil: em 1940 a população idosa representava em torno de 4% da população total; em 2000 esse número cresceu para 8%. Para 2020, estima-se que a população idosa componha 15% do total de brasileiros (Camarano, 2004). Para 2050, estima-se que a população com 80 anos e mais atinja o número de 13,7 milhões (IBGE, 2004).

Ainda há muitos pontos obscuros acerca do processo de envelhecimento. Como este é um fenômeno biológico normal e comum a todos os indivíduos, não deve ser considerado como doença. Sabe-se que, no decorrer desse processo, há alterações orgânicas que ocorrem naturalmente e, entre estas, está a desregulação do sistema imunológico, ou imunossenescência. Esta é um processo em que há acúmulo de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio não “neutralizadas” e hiperestimulação do sistema imunológico inato e adaptativo (Jenny, 2012).

A inflamação é uma resposta do organismo a uma lesão, em que o objetivo é a defesa do hospedeiro. Com isso, vários tipos celulares, com diferentes funções, são recrutados ao local. Uma dessas células é o monócito, que libera citocinas

responsáveis por sinalizar entre as células do sistema imunológico de modo a aumentar a resposta inflamatória e neutralizar o antígeno. Assim, quando a situação de lesão (causada por trauma ou infecção) se resolve, a cascata inflamatória termina e o tecido retorna à sua condição fisiológica.

Com o envelhecimento, há aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas, que favorecem a elevação de marcadores inflamatórios, entre os quais o fator de necrose tumoral α (TNF- α), mesmo quando essas doenças estão “controladas” (Chung et al., 2009; Singh e Newman, 2011). Um exemplo desse tipo de doença, que é de grande prevalência em indivíduos idosos, é a doença de Alzheimer (DA). Na DA, a presença de placas amiloides e hiperfosforilação da proteína tau é acompanhada de processo inflamatório iniciado pela ativação da microglia e de astrócitos, o que resulta em aumento da produção de TNF- α . Evidências de pesquisas básicas, clínicas e genéticas mostram que o TNF- α aparentemente tem um papel central na neuroinflamação relacionada à DA (Fillit et al., 1991; Lio et al., 2006; McAlpine et al., 2009; Meda et al., 1995) exercendo seus efeitos, pelo menos em parte, pela ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF κ B.

Uma das hipóteses para a etiologia da DA é a que envolve o sistema colinérgico. Essa hipótese surgiu a partir de evidências de que os prejuízos cognitivos característicos dessa demência, como a perda da memória recente, estavam relacionados à morte de neurônios colinérgicos. Assim, a maioria dos fármacos utilizados, atualmente, para o tratamento da doença são os anticolinesterásicos, que aumentam os efeitos da acetilcolina por inibirem sua degradação (Hake, Farlow, 2001; Hansen et al., 2006; Hogan, Patterson, 2002).

1.2 Sistema Colinérgico e Inflamação

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 (McKinney, Jacksonville, 2005). Esses neurônios projetam-se para o hipocampo, neocortex, partes do córtex límbico e amígdala e modulam as funções cognitivas.

O neurotransmissor acetilcolina (ACh) é sintetizado no corpo celular dos neurônios a partir da colina recaptada dos terminais axônicos. A colina é acetilada por uma enzima citosólica, a colina acetiltransferase (CAT) que transfere o grupo acetil da molécula de acetil-coenzima A. A ACh é, então, armazenada em vesículas e liberada por exocitose em resposta à entrada de Ca^{2+} na terminação nervosa (Rang et al., 2008). Exames *post-mortem* de tecidos cerebrais de pacientes com Alzheimer mostraram uma redução significativa na atividade da enzima CAT (Gauthier, 2002; Seriniki, Vital, 2008), o que constitui a “hipótese colinérgica” para a doença.

Os efeitos colinérgicos são mediados por duas classes de receptores: os receptores metabotrópicos muscarínicos e os receptores ionotrópicos nicotínicos. No sistema nervoso central, os receptores nicotínicos formados pelas subunidades $\alpha 4\beta 2$ ou $\alpha 7$ são os encontrados com maior frequência. Os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) $\alpha 7$ são compostos por cinco subunidades alfa 7, as quais formam um poro permeável a cálcio (Albuquerque et al., 2009). O envolvimento desses receptores com os processos de atenção e memória tem sido bastante explorado (Boccia et al., 2010; Hoyle et al., 2006; Rezvani et al., 2009; Young et al., 2007), inclusive em animais submetidos a processos neurodegenerativos (Viel et al., 2012).

Recentemente, têm surgido trabalhos que mostram um papel deste receptor em processos inflamatórios sistêmicos, uma vez que o $\alpha 7$ está presente, também, em células não neuronais, como linfócitos e macrófagos. Nesse sentido, seu envolvimento em modelos de inflamação no sistema nervoso central também tem sido estudado. Já foi demonstrado que o tratamento de culturas de células de microglia com acetilcolina, colina ou o colinomimético nicotina promoveu uma resposta anti-inflamatória, pois levou à redução de produção de TNF- α (De Rosa et al., 2005; Parrish et al., 2008; Shytle et al., 2004). Essa “via anti-inflamatória colinérgica” foi tida como dependente de nAChR $\alpha 7$, uma vez que o efeito foi atenuado com o antagonista seletivo α -bungarotoxina (Shytle et al., 2004).

Observações semelhantes foram feitas em ratos pré-tratados com metillicaonitina (MLA; outro antagonista de nAChR $\alpha 7$) e o agente anticolinesterásico donepezil e, em seguida, submetidos à injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo (LPS), que leva à ativação do sistema

imunológico e ao processo inflamatório. O tratamento com MLA reduziu o efeito anti-inflamatório do donepezil (Tyagi et al., 2010), mostrando mais uma vez a participação dos receptores $\alpha 7$ na via eferente da resposta inflamatória. O mesmo não foi observado com o pré-tratamento com dihidro- β -eritroidina (antagonista de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$) ou escopolamina (antagonista de receptores muscarínicos).

1.3 Lítio e Inflamação

O lítio é um cátion monovalente cuja eficácia na estabilização do humor foi descoberta há mais de 50 anos. Desde então, este fármaco vem sendo a principal escolha no tratamento do transtorno afetivo bipolar (Quiroz et al., 2004). Em estudo realizado com pacientes idosos bipolares, sob tratamento com lítio, observou-se menor prevalência de demência em comparação a pacientes submetidos a tratamento com outros estabilizadores de humor (Nunes et al., 2007).

Os efeitos moleculares e bioquímicos do lítio são diversos e relacionados à inibição de muitas enzimas que participam de diversas vias de sinalização intracelular. O principal mecanismo que leva aos efeitos terapêuticos do lítio é a inibição da inositol monofosfatase e da glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). A primeira está envolvida na reciclagem de inositol na célula, o qual é importante na cascata de sinalização do fosfoinositol, necessário para formar segundos mensageiros, como o inositoltrifostato (Quiroz et al., 2004). A GSK-3 regula diversos processos celulares. Dentre esses, destaca-se sua função de fosforilar enzimas que participam de vias que levam à neuroinflamação, apoptose e formação de placas amiloides (Phiel, Klein, 2001). Por outro lado, a fosforilação da enzima em determinados sítios como a Ser9 promove inibição da atividade da mesma, reduzindo a resposta inflamatória. Dessa forma, recentemente foi mostrado que a inativação de uma das isoformas da GSK-3, a GSK-3 β , em culturas primárias de cérebros de ratos levou à inibição da produção do TNF α pela modulação do fator nuclear *kappa* B (NF κ B) (Wang et al., 2010). Além disso, a suplementação alimentar com lítio preveniu o aumento de mediadores inflamatórios no cérebro de ratos (Basselin et al., 2010). Assim, a inibição dessas enzimas aparentemente leva aos efeitos neuroprotetores terapêuticos do lítio.

Apesar de tais efeitos benéficos, o lítio possui estreita faixa terapêutica (0,5 – 1,5 mmol/L) e duração de ação longa, o que pode levar à intoxicação, se não houver monitoração constante da litemia (Baldessarini, Tarazi, 2001; Rang et al., 2008). Além disso, sua toxicidade é ainda maior na população idosa por causa da alteração farmacocinética inerente ao processo de envelhecimento como, por exemplo, baixa função renal, o que dificulta ainda mais a excreção do lítio. Nesse sentido, observa-se a importância de se estabelecer uma dose ótima para a utilização desse cátion de maneira que seus efeitos terapêuticos sejam alcançados sem causar toxicidade ao indivíduo.

Em estudo clínico recente do nosso grupo, verificamos que o tratamento com microdoses de lítio foi eficiente em impedir a progressão do declínio cognitivo de pacientes com diagnóstico clínico para a doença de Alzheimer (patente requerida, Nunes et al., 2013). Esses dados nos fizeram levantar hipóteses sobre quais mecanismos estariam envolvidos com a evidente melhora dos pacientes.

Alguns trabalhos relacionam o tratamento com sais de lítio e o sistema colinérgico. Jope (1979) mostrou que o tratamento crônico de ratos com lítio aumentou a síntese do neurotransmissor acetilcolina. Esse efeito foi devido a um aumento da captação de colina pelos terminais pré-sinápticos. O tratamento crônico de ratos com esse íon também foi relacionado ao aumento da neurotransmissão colinérgica em hipocampus de ratos por uma via que envolve o receptor 5-HT_{1A} de serotonina (Fujii et al., 2000).

Uma forma de indução experimental de inflamação aguda é via injeção de lipopolissacarídeo isolado da bactéria *Escherichia coli* (LPS). O LPS interage com receptores membranares TLR-4 (“toll-like receptor-4”), levando à ativação de diversas vias intracelulares, promovendo a produção de citocinas e iniciando o processo inflamatório. Dentre essas vias, a ativação de TLR-4 aumenta a produção de p38 MAPK (Shytle et al., 2004; Suzuki et al., 2006), p44/42 MAPK (Shytle et al., 2004) e NFκB (Beurel et al., 2010; Wang, 2010.), aumentando a produção de TNF-α e outras citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (Medzhitov, 2008). Da mesma forma, o LPS leva ao aumento da ativação de GSK-3β (Green, Nolan, 2012), o que também ativa NFκB, aumentando a produção de TNF-α (Beurel et al., 2010; Wang, 2010). A injeção sistêmica de LPS, por meio da indução de produção de citocinas, causa nos animais sintomas de “sickness behavior”, entre os quais a letargia, perda

de motivação, anedonia, diminuição do apetite e da atividade motora (Biesmans et al., 2013; Kelley et al., 2003).

Uma vez que já foi demonstrado que o lítio aumenta a síntese de acetilcolina, que o receptor nicotínico $\alpha 7$ está envolvido com redução de processos neuroinflamatórios e que o tratamento com lítio inibe a atividade de GSK-3 β , reduzindo a inflamação, o objetivo geral desse projeto é avaliar se o tratamento crônico com microdoses de lítio altera o processo inflamatório induzido e se esse mecanismo envolve a participação do sistema colinérgico, via receptores nicotínicos $\alpha 7$.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar se há alteração comportamental (influência na aprendizagem e formação de memória) relacionada ao pré-tratamento com lítio e indução de neuroinflamação aguda.
2. Verificar o envolvimento de receptores $\alpha 7$ nesse processo.
3. Avaliar os efeitos do uso crônico de lítio para a formação de mediadores inflamatórios em cérebros de camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6, inicialmente com dois meses de idade, provenientes do biotério do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) da UNIFESP.

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. Além disso, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB-USP protocolo nº 81 da folha 105 do livro 02 para uso de animais em experimentação).

3.2 Tratamento com lítio e indução da neuroinflamação

O lítio foi administrado na forma de carbonato de lítio, na dose de 0,2 mg/kg, que corresponde a 0,006 mEq Li/kg. Foi feita uma solução a 1 mg/L e oferecida *ad libitum* aos animais durante sete meses. A quantidade ingerida foi monitorada semanalmente. Essa dose foi estabelecida de acordo com a utilizada em pesquisa anterior do grupo, realizada com humanos, em que o carbonato de lítio foi administrado a 1,5 mg/dia (0,0006 mEq) (Nunes et al., 2013). Além disso, trabalhos mostram que a farmacocinética do lítio em camundongos varia com relação aos humanos, sendo necessária a adaptação da dose, que deve ser dez vezes maior nos camundongos (Ledoux, 2013; Wood et al., 1986).

Para indução da neuroinflamação, ao final dos tratamentos, os animais foram injetados com lipopolissacarídeo (LPS; *Escherichia coli*, 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; 1 mg/kg), por via intraperitoneal, ou volume equivalente de salina estéril, e os grupos foram formados conforme descrição detalhada abaixo. A dose de LPS foi estabelecida a partir de trabalhos que mostraram que a injeção de LPS a 1

mg/kg era capaz de induzir alta ativação do sistema imunológico (Nautiyal, 2008) e perda de memória após 7 dias da injeção (Vasconcelos et al, em elaboração)¹.

- 1) Controle Salina (n= 7): camundongos C57Bl/6 que receberam água filtrada e, após 7 meses de observação foram injetados com salina (i.p).
- 2) Controle LPS (n= 7): camundongos C57Bl/6 que receberam água filtrada e, após 7 meses de observação, foram injetados com LPS (i.p).
- 3) Lítio Salina (n= 9): camundongos C57Bl/6 que receberam lítio e, após 7 meses de observação, foram injetados com salina (i.p).
- 4) Lítio LPS (n= 9): camundongos C57Bl/6 que receberam lítio e, após 7 meses de observação, foram injetados com LPS (i.p).

3.3 Avaliação do consumo de água

O consumo de água foi monitorado semanalmente pesando-se a garrafa de água das caixas dos animais. A quantidade média ingerida, por cada animal, foi estimada de acordo com o número de animais na caixa e com o consumo semanal de água. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro-padrão do consumo mensal de líquidos.

3.4 Avaliação da atividade motora

A atividade motora dos animais foi avaliada em uma caixa de atividade motora, a fim de eliminar qualquer possibilidade de que caso houvesse mau desempenho nas provas, este fosse devido a déficit motor. A caixa de atividade motora é uma caixa acrílica com fotorreceptores nas laterais que quantificam a deambulação e exploração vertical dos animais, em unidades arbitrárias. Os camundongos permaneceram individualmente no equipamento por cinco minutos, com registro de atividade a cada um minuto.

3.5 Avaliação da memória espacial

¹ Vasconcelos et al. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Memory Impairment". Em fase de elaboração.

A avaliação da memória espacial foi realizada utilizando-se o “labirinto de Barnes”, composto por uma prancha circular branca com 31 buracos e uma parede preta, com quatro símbolos (cruz, quadrado, círculo e triângulo) amarelos, dispostos em sequência. Uma caixinha preta, cheia de maravalha (caixa de escape), foi colocada em baixo de um dos buracos (sempre o mesmo para cada animal). O animal foi colocado no centro da prancha, onde permaneceu por um minuto, sob uma caixa de acrílico, para reconhecer o contexto. Sobre a prancha, foi colocada uma luz (70 W) considerada como estímulo incômodo para o camundongo. Em seguida, ele foi solto e teve, no máximo, cinco minutos para encontrar a caixa de escape, onde ele ficou por mais um minuto, com as luzes apagadas e a caixa fechada. A latência para encontrar a caixa de escape foi registrada. O teste é baseado na preferência inata de camundongos por lugares escuros e fechados. Os animais passam por duas observações por dia, com intervalo de duas horas entre cada uma, durante cinco dias. Foi registrado o tempo inicial que o animal levou para achar a caixa de escape, em cada uma das exposições dos camundongos ao equipamento.

3.6 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo

Para avaliar esse tipo de memória, foi utilizado o equipamento de esquivas inibitória, o qual possui dois compartimentos, um escuro e outro claro (este com uma lâmpada fixada na porção superior), 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. Na sessão de aquisição, realizada no dia seguinte ao último dia do labirinto de Barnes, o animal foi colocado no lado claro da caixa e teve o tempo máximo de 300 segundos para explorar o local. Se ele passasse para o lado escuro, a porta se fecharia automaticamente e ele receberia um leve choque nas patas (0,5 mA) por dois segundos. Foi registrada a latência do animal para atravessar de um lado para o outro da caixa. Após 24 horas, um teste para avaliar a retenção da memória de longa duração foi realizado, em que se verificou, novamente, a latência para entrada no lado escuro. Quanto maior esse tempo, maior a lembrança do animal com relação àquele contexto.

A figura 1 representa o protocolo comportamental que foi utilizado neste projeto.

Figura 1 - Representação do protocolo experimental utilizado neste trabalho.

Durante sete meses, a ingestão semanal de água (H₂O) ou água com lítio foi monitorada. Ao fim desse período, os animais foram injetados com salina ou LPS. Durante os oito dias seguintes, os animais passaram pelos testes comportamentais de avaliação da atividade motora (Act), da memória espacial (Barnes) e da memória relacionada a estímulo aversivo (E.I.).

Ao final do protocolo experimental, foram retirados o cérebro, sangue, fígado e rins dos animais. Nesse trabalho, utilizamos apenas os cérebros para as análises moleculares.

3.7 Dosagem de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e TNF- α

Foi utilizada a metodologia xMap (MAP= Multiple Analyte Profiling, x= sua variável, no caso citocinas), que envolve um processo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos, que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados às microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, a ficoeritrina, que está ligado ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas em uma placa de 96 poços. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

Uma vez que essa técnica possibilita a dosagem de várias citocinas utilizando-se apenas uma placa (kit MCYTOMAG-70K-03, Millipore), as três citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α), foram dosadas simultaneamente. As concentrações mínimas de detecção, desse kit, são 1,1 pg/mL para IL-6, 2,0 pg/mL para IL-10 e 2,3 pg/mL para TNF- α . É feita uma curva-padrão das citocinas que varia de 0 a 2000 pg/mL, além de estarem presentes no kit dois controles positivos, cuja variação da concentração depende do analito estudado. Assim, para IL-6, espera-se que as concentrações estejam entre 98 e 203 pg/mL, para o controle 1, e 589 e 1224 pg/mL para o controle 2; para IL-10, as concentrações devem estar entre 83 e 173 pg/mL, para o controle 1, e 480 e 998 pg/mL, para o controle 2; para TNF- α , as concentrações esperadas estão entre 100 e 208 pg/mL, para o controle 1, e 601 e 1344 pg/mL, para o controle 2.

Para esse ensaio, foi utilizada metade dos cérebros de 5 animais de cada grupo. Assim, os hemisférios foram dissecados e homogeneizados em 150 μ L de tampão Tris 20mM (pH 7.4), NaCl 150mM, PMSF 1mM, Tween-20 0,05% e um tablete de coquetel de inibidores de proteases (para 10 mL). As amostras foram enviadas para o Instituto Genese de Análises Científicas (São Paulo), onde o ensaio foi realizado. Paralelamente, foi realizada a quantificação de proteínas nessas amostras, pelo método de Bradford (1976), para a posterior normalização dos dados.

3.8 Western-blotting para as enzimas CAT, GSK-3 β , Glicogênio Sintase Quinase-3 β fosforilada (pGSK-3 β) e para o receptor nicotínico $\alpha 7$

As áreas cerebrais relacionadas à memória foram separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA e um tablete de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. A partir do sobrenadante foi feita a dosagem da concentração de proteínas, em cada fração, utilizando-se o método de Bradford (1976). Quantidades equivalentes de proteínas foram separadas por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%), utilizando-se tampão de corrida contendo Tris 25 mM, Glicina 0,192 M e 0,1% de SDS, a 100 V por aproximadamente 2 h. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão Tris

25 mM pH 8,3, glicina 192 mM e metanol 20%, a 400 mA por 2 h a 4 °C. Terminada a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com tampão Tris 100mM contendo NaCl 0,9%, Tween-20 0,1% e leite desnatado 5% (tampão de bloqueio) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio das reações não específicas do anticorpo primário. Para o bloqueio das membranas que foram incubadas com anticorpo anti-pGSK 3 β foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) 5% ao invés de leite desnatado. Após lavagem, o material foi incubado com o anticorpo primário anti-CAT (Abcam, ab70219, diluído 1:1000), anti-GSK-3 β (Abcam, ab32391, 1:2000), anti-pGSK-3 β (Abcam, ab131097, 1:1000), anti- α 7 (Abcam, ab 23832, 1:750), β -tubulina (Abcam, ab134185, diluído 1:4000) ou actina (Santa Cruz Biotechnology, SC-1616-R, 1:500) por 16 h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas conforme descrito anteriormente e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase de raiz forte (HRP, de HorseRadish Peroxidase) e diluído 1:4000 em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. As marcações foram detectadas por quimioluminescência, por meio da exposição das membranas contra um filme radioautográfico. A análise dos filmes radioautográficos foi feita utilizando-se o programa ImageJ 1.46r (National Institute of Health).

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação da atividade motora, bem como as análises realizadas por western blotting e Multiplex foram expressos como médias $\pm$ erro padrão e analisados utilizando-se o programa Statistica versão 7.0. Foi feita ANOVA de duas vias, considerando o tratamento e a indução de inflamação aguda como fatores.

Os dados obtidos na avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo em esquiva inibitória foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0, expressos como medianas e intervalos interquartis e analisados pelo teste de Wilcoxon (teste t pareado e não paramétrico), dentro de cada grupo.

Para os experimentos de comportamento em labirinto de Barnes, os dados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão e analisados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni, para comparações múltiplas, utilizando o programa Statistica versão 7.0. Foram considerados os fatores tratamento, indução de

inflamação aguda e tempo de observação. Os dados do consumo mensal de água também foram expressos como médias $\pm$ erro padrão e analisados por ANOVA de duas vias, sendo os fatores o tempo e o tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão semanal de H₂O ou lítio

O consumo de água e lítio pelos animais foi registrado semanalmente. No gráfico, está representado o consumo mensal. Os animais que recebiam lítio ingeriram maior quantidade de água durante todo o tempo observado ($F_{[1,29]} = 42,07$, $p < 0,001$) (figura 2). Além disso, houve interação entre os fatores tempo e tratamento (presença ou não de lítio na água; $F_{[1,29]} = 9,836$, $p < 0,001$), confirmando que a presença de lítio, mesmo em microdoses, altera o padrão de consumo de água ao longo do período de tratamento.

Figura 2 - Consumo mensal de água e lítio pelos animais ao longo de sete meses.

O consumo de água pelos animais foi medido semanalmente. Para melhor visualização, os dados estão apresentados de acordo com o consumo mensal por animal. Os símbolos e barras correspondem à média $\pm$ erro-padrão. a: $P < 0,001$.

4.2 Avaliação da atividade motora

Antes de os testes de memória serem iniciados, a atividade locomotora dos animais foi avaliada, uma vez que os protocolos exigem que os animais não apresentem déficit locomotor. Como está representada na figura 3, a diferença foi observada no grupo tratado com lítio, em que os animais injetados com LPS apresentaram redução significativa na atividade locomotora e exploração vertical, quando comparados com animais injetados com salina (Deambulação dia 1: grupo água salina: $392,6 \pm 42,5$; água LPS: $317,3 \pm 56,6$; lítio salina: $486,8 \pm 35,9$; lítio LPS: $300,7 \pm 53,9$; $F_{[3,28]}=7,349$; $p < 0,05$. Exploração vertical dia 1: grupo água salina: $39,2 \pm 9,8$; água LPS: $20,6 \pm 14,2$; lítio salina: $74,4 \pm 14,6$; lítio LPS: $19,2 \pm 9,4$; $F_{[3,28]}= 8,742$; $p < 0,01$. Deambulação dia 2: grupo água salina: $326,3 \pm 55,7$; água LPS: $270,0 \pm 44,6$; lítio salina: $449,2 \pm 37,0$; lítio LPS: $272,1 \pm 39,1$; $F_{[3,28]}=7,107$; $p < 0,05$. Exploração vertical dia 2: grupo água salina: $40,3 \pm 12,3$; água LPS: $25,0 \pm 11,1$; lítio salina: $66,6 \pm 13,9$; lítio LPS: $17,0 \pm 9,1$; $F_{[3,28]}=7,392$; $p < 0,05$). No entanto, não se pode afirmar que tais sintomas estão associados ao tratamento, uma vez que não houve interação na análise de variância (Deambulação dia 1: $F_{[3,28]}= 1,321$; $p > 0,05$. Exploração vertical dia 1: $F_{[3,28]}= 2,157$; $p > 0,05$. Deambulação dia 2: $F_{[3,28]}= 1,905$; $p > 0,05$. Exploração vertical dia 2: $F_{[3,28]}= 2,065$; $p > 0,05$).

Figura 3 – Avaliação da atividade motora após tratamento com água ou lítio e injeção de salina ou LPS.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada 24h e 48h após a injeção de água ou LPS. Os histogramas e as barras verticais são as médias $\pm$ erro padrão. *: $P < 0,05$. Água salina, $n=7$; água LPS, $n=7$; lítio salina, $n=9$ e lítio LPS, $n=9$.

4.3 Avaliação da memória espacial

No labirinto de Barnes, avalia-se o tempo que os animais demoram a encontrar um local de segurança, a partir de pistas colocadas na parede do equipamento. Assim, espera-se que a latência de escape ao longo dos cinco dias de teste diminua.

Utilizamos a ANOVA de duas vias para medidas repetidas, considerando como fatores o tratamento e a indução de inflamação. Segundo essa análise, houve efeito principal dos dois fatores (tratamento: $F_{[3,28]} = 27,5$, $P < 0,001$; indução de inflamação: $F_{[3,28]} = 4,8$, $P < 0,05$) e tempo ($F_{[4,112]} = 14,3$, $P < 0,001$), indicando que, isoladamente, cada fator exerce efeito sobre o desempenho dos animais no labirinto. Com relação ao tempo, observamos que apenas os grupos água salina e lítio LPS aprenderam a tarefa, ou seja, diminuíram significativamente a latência ao longo dos cinco dias de teste.

A fim de refinar a análise e entender se o tratamento e a indução de inflamação exercem, de fato, impacto na tarefa, excluímos o fator tempo calculando a área sob a curva da latência para encontrar a caixa de escape de cada grupo. Observamos, então que o tratamento exerce sim influência no teste ($F_{[3,28]} = 7,37$, $P < 0,05$), mas não tivemos como conferir o aspecto em que essa diferença é relevante, uma vez que no pós-teste de Bonferroni não há diferença significativa entre os grupos.

Não se observou interação entre os fatores tratamento e inflamação ($F_{[3,28]} = 0,2265$; $P = 0,2923$) para os grupos tratados com água ou lítio, injetados com salina ou LPS (figura 4), indicando que o tratamento e a presença de inflamação não influenciam um no outro.

Figura 4 - Avaliação da memória espacial no labirinto de Barnes.

Os animais foram submetidos à avaliação da memória espacial 48h após a injeção de água ou LPS. A diminuição da latência ao longo dos cinco dias indica o aprendizado da tarefa. Os símbolos e as barras verticais correspondem às médias $\pm$ erro padrão. *: $P < 0,01$; #: $P < 0,01$. Água salina, $n=7$; água LPS, $n=7$; lítio salina, $n=9$ e lítio LPS, $n=9$.

4.4 Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo

Na avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo, espera-se que os animais tenham maior latência na sessão de teste (ST), realizada 24h depois da sessão de aquisição (SA). Observamos que todos os grupos aprenderam a tarefa, isto é, lembraram que não deveriam passar para o outro lado da caixa, independentemente do tratamento ou da indução da inflamação aguda (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo em esQUIVA inibitória.

No dia seguinte ao término da avaliação da memória espacial, os animais foram submetidos à sessão de aquisição em esQUIVA inibitória. A sessão de teste foi realizada depois de 24h. O aumento da latência em ST indica o aprendizado da tarefa. As colunas e barras verticais representam as medianas e os intervalos interquartais. SA: Sessão de Aquisição, ST: Sessão de Teste. *: $P < 0,05$ vs SA; **: $P < 0,01$ vs SA.

4.5 Dosagem de IL-6, IL-10 e TNF- α no hipocampo

A fim de confirmar a validade do modelo de inflamação utilizado, foram avaliadas as concentrações de interleucina-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, e interleucina-10, uma das citocinas anti-inflamatória, no hipocampo dos animais. No entanto, não foi observado aumento das citocinas pró-inflamatórias nos grupos injetados com LPS, como era esperado (IL-6: $F_{[3,26]} = 0,4583$, $P = 0,5044$; TNF- α : $F_{[3,26]} = 0,5739$, $P = 0,4555$; IL-10: $F_{[3,26]} = 1,2582$, $P = 0,2722$).

4.6 Padronização dos experimentos de Western-Blotting

A fim de determinar a quantidade ótima de proteínas a ser utilizada nos experimentos de western-blotting para detecção de colina acetiltransferase (CAT), glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) e receptor nicotínico $\alpha 7$, foram realizadas corridas de eletroforese com diferentes quantidades de proteína total de hipocampo dos animais do grupo água salina.

Cada membrana desse ensaio foi incubada com um anticorpo diferente: anticorpo contra colina acetiltransferase (diluição 1:1500; Figura 6A), anticorpo contra a subunidade $\alpha 7$ (diluição 1:750; Figura 6B) e anticorpo contra GSK-3 β (diluição 1:2000; Figura 6C). A partir dessa determinação, foi escolhida a quantidade de 25 μ g de proteínas totais para a continuação das análises.

Figura 6 - Determinação da quantidade de proteína para detecção de CAT, $\alpha 7$ e GSK-3 β .

Autorradiografias e análise densitométrica em unidades arbitrárias das bandas obtidas em ensaio de western blotting. Proteínas totais de um animal controle foram colocadas em diferentes quantidades em cada poço. (A) Autorradiografia e análise densitométrica obtida em ensaio para detecção de CAT. (B) Autorradiografia e análise densitométrica obtida em ensaio para detecção de $\alpha 7$. (C) Análise densitométrica obtida em ensaio para detecção de GSK-3 β .

4.7 Western-blotting para as Enzimas CAT, GSK-3 β , pGSK-3 β e para o receptor nicotínico $\alpha 7$

Foram avaliadas as densidades de CAT e do receptor alfa 7 no hipocampo dos animais a fim de verificar se o estímulo inflamatório ou o tratamento com lítio poderiam interferir no sistema colinérgico.

Com relação à CAT, não foi observada diferença entre os grupos ($F_{[3,13]}=0,3183$, $P = 0,5822$). A média do grupo água salina, em unidades arbitrárias foi: $0,576 \pm 0,043$ (Figura 7), o que mostra que nem o tratamento com lítio nem a inflamação exerceram efeito sobre a densidade da enzima. Da mesma maneira, não houve diferença na expressão dos receptores nicotínicos alfa 7 ($F_{[3,13]}= 0,0822$, $P =$

0,7788. A média do grupo água salina, em unidades arbitrárias foi: $0,578 \pm 0,024$ (Figura 8).

Figura 7 - Avaliação da densidade da enzima colina acetiltransferase (CAT) no hipocampo de camundongos.

As proteínas foram extraídas oito dias após a injeção de salina ou LPS. (A) Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, da CAT usando a actina como controle endógeno. As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão. Água salina: $n=5$; água LPS, lítio salina e lítio LPS: $n=4$. (B) Autorradiografia representativa obtida em ensaio de western blotting.

Figura 8 - Avaliação da densidade de receptores nicotínicos $\alpha 7$ no hipocampo de camundongos.

As proteínas foram extraídas oito dias após a injeção de salina ou LPS. (A) Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, de $\alpha 7$ usando a β -tubulina como controle endógeno. As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão. Lítio salina: $n=5$; água salina, água LPS e lítio LPS: $n=4$. (B) Autorradiografia representativa obtida em ensaio de western blotting.

Foi avaliada, ainda, a atividade da GSK-3 β , uma vez que o lítio é sabidamente um inibidor dessa enzima. Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($F_{[3,18]} = 0.0043$, $P > 0.05$. A média do grupo água salina, em unidades arbitrárias foi: $1,285 \pm 0,268$) (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da atividade da enzima GSK-3 β no hipocampo de camundongos.

Para a avaliação da atividade da enzima GSK-3 β , foram feitos ensaios para suas formas total e fosforilada em serina 9 (inativa). A partir das análises densitométricas de cada uma, com relação ao controle endógeno β -tubulina, estabelecemos a relação da enzima fosforilada pela total. (A) Relação pGSK-3 β /GSK-3 β , em unidades arbitrárias (U.A.). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão. Água salina: n=3; lítio salina, água LPS e lítio LPS: n=4. (B) Imagem representativa obtida em ensaio de western blotting.

5 DISCUSSÃO

A resposta inflamatória ocorre naturalmente e é necessária à reorganização tecidual. Nesse processo são recrutadas células inflamatórias que produzem citocinas a fim de sinalizar o desenvolvimento de uma cascata de eventos que leva, ao final, ao retorno do tecido à sua condição fisiológica.

Durante o processo de envelhecimento normal há uma elevação de marcadores pró-inflamatórios, o que pode implicar em recuperação mais demorada de processos e reações inflamatórias, além de se tornar fator de risco para outras doenças (Chung et al., 2009).

O processo inflamatório é acentuado em uma das doenças mais comuns da velhice, a Doença de Alzheimer. A DA se caracteriza pela deposição de placas da proteína beta-amiloide e emaranhados neurofibrilares em todo o cérebro, sobretudo no córtex e hipocampo, regiões importantes para a formação de memórias (Camarota et al., 2008; Squire, Kandel, 2003). Em consequência, inicia-se o processo inflamatório pela ativação da microglia e de astrócitos, que leva ao aumento da produção de TNF- α (Fillit et al., 1991; Lio et al., 2006; McAlpine et al., 2009; Meda et al., 1995). Tal processo também pode influenciar as funções cognitivas, como memória e aprendizagem.

Em 2007, Nunes e colaboradores observaram que, em pacientes com DA, o comprometimento cognitivo foi menor entre aqueles tratados cronicamente com lítio, além dos clássicos anticolinesterásicos. Além disso, recentemente observamos que o tratamento com microdoses de lítio por 18 meses estabilizou a memória de pacientes diagnosticados com DA (Nunes et al., 2013).

A fim de avaliar se o tratamento crônico com lítio poderia prevenir efeitos neuroinflamatórios após uma lesão aguda, após sete meses de tratamento com o mineral, foi feita a indução de inflamação com a injeção intraperitoneal de LPS. Este é um modelo amplamente utilizado em trabalhos com objetivo de estudar ativação do sistema imunológico, processo inflamatório e sepse.

Nesse trabalho, a indução da inflamação reduziu significativamente a mobilidade dos animais tratados com lítio e injetados com LPS. No entanto, vale ressaltar que a exploração desses animais não estava prejudicada, uma vez que se

equiparou à dos animais tratados com água. Observamos que os animais tratados com lítio e injetados com salina tiveram mais unidades de deambulação e exploração vertical que os outros três grupos, apesar de não ser estatisticamente significativo. Isso pode ser justificado pelo efeito desinibidor do lítio, que leva os animais a perderem a capacidade de discernir situações de perigo e, assim, exploram mais o ambiente. Estudo de Ackermann et al. (2010) mostra que animais transgênicos com diminuição da atividade da GSK apresentaram maior hiperatividade e curiosidade em campo aberto. Ferreira et al. (2009) também verificaram efeito ansiolítico do lítio por meio de testes comportamentais, em que os animais submetidos ao labirinto em cruz elevado passaram tempo significativamente maior nos braços abertos do aparato. Já os animais injetados com LPS tiveram exploração diminuída, mas no mesmo nível do controle, o que é de se esperar, uma vez que eles estavam durante o período de “sickness behavior”. De qualquer maneira, tal resultado não influenciou o desempenho dos animais nos testes de memória, que exigem sua locomoção, como foi discutido acima.

Alguns trabalhos mostram que o LPS, por si só, prejudica a formação de memória e, assim, o desempenho de camundongos em tarefas cognitivas que dependem do hipocampo, como memória espacial e medo contextual (Arai et al., 2001; Pugh et al., 1998). No presente trabalho foi observado, no labirinto de Barnes, que o grupo água salina aprendeu e lembrou da tarefa. O grupo lítio salina aparentemente apresentou melhor performance, pois apresentou uma menor latência já no primeiro dia de teste (evidenciada pela complementação da análise estatística) e assim permaneceu até o final das observações, sugerindo que o tratamento com lítio melhora a percepção do que seria o local seguro para o animal, e mantém essa memória. Por outro lado, os animais tratados com água e LPS já iniciaram de um patamar mais baixo que o grupo água salina, o que normalmente poderia ser interpretado como uma melhor memória espacial. Nesse caso, uma possível explicação pode ser o fato de o LPS causar, além dos efeitos inflamatórios, perda de motivação e interesse por novidades, sintomas esperados com essa injeção e conhecidos como componentes do “sickness behavior” (Dantzer, 2001). Isso provavelmente fez com que o animal procurasse mais avidamente o ambiente fechado, mantendo esse comportamento até o final das observações. Ademais, os animais tratados com lítio e injetados com LPS, apesar de também começarem de

um patamar mais baixo que os animais água salina, apresentaram redução significativa do tempo para achar a caixa de escape nos 4º e 5º dias de observação, evidenciando uma melhor memória espacial.

Com relação à memória a estímulo aversivo avaliada em esquiva inibitória, já foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de LPS em camundongos, 4 horas antes da avaliação da memória causou redução significativa na latência para entrar na câmara escura do equipamento, em relação ao grupo tratado com veículo, mostrando que com a inflamação aguda gerada, os animais não conseguem recuperar a informação aprendida (Lee et al., 2008).

No presente trabalho a avaliação da memória foi realizada sete dias após a injeção de LPS. Em trabalho realizado recentemente em colaboração com nosso grupo (Vasconcelos et al., em elaboração)², e utilizando protocolo experimental semelhante, não foi observada diferença estatística entre a sessão de aquisição e a sessão de teste de ratos injetados com LPS. Porém, neste trabalho não foi observado prejuízo da memória de nenhum dos grupos, uma vez que todos lembraram que não deviam passar para o lado escuro da caixa. Esse paradigma leva em consideração, além do condicionamento operante (Tinsley et al., 2004) a experiência emocional, de que situações vividas com grande carga emocional, boa ou ruim, são importantes para a sobrevivência (LeDoux, 2000). Entretanto, cabe ressaltar que os animais foram mortos e os cérebros retirados no mesmo dia em que realizaram esse teste. Como fizemos a dosagem de citocinas e verificamos que os níveis de IL-6 e TNF- α já estavam nos mesmos níveis do grupo controle, podemos dizer que o processo inflamatório já estava terminado. Assim, provavelmente, quando os animais foram submetidos à sessão de aquisição na esquiva inibitória, eles já estavam com sua capacidade de aprendizagem e memória íntegras novamente.

Alguns trabalhos mostram que o pico de produção de citocinas inflamatórias acontece por volta de 4 horas após a injeção de uma dose tolerável de LPS e que, após 24 horas, os níveis já voltaram ao basal (Biesmans et al., 2013; Doursout et al., 2013). Em contrapartida, trabalhos em que a dose de LPS injetada em

² Vasconcelos et al., "Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Memory Impairment". Em fase de elaboração.

camundongos leva à sepse mostram que os prejuízos causados pela endotoxemia são mais duradouros, causando alteração da expressão de proteínas por 30 dias ou até 10 meses após a indução de neuroinflamação (Iravani et al., 2005; Qin et al., 2010; Semmler et al., 2007), podendo apresentar ou não alteração comportamental. Por essa razão utilizamos a dose de 1mg/kg e, para a elaboração do protocolo experimental, baseamo-nos nesses trabalhos. Apesar desse respaldo na literatura, não observamos os mesmos efeitos em nosso trabalho. Por isso, os resultados moleculares referentes ao sistema colinérgico não são conclusivos e não respondem à nossa pergunta, evidenciando a necessidade de ajustes no protocolo. Uma vez que o processo inflamatório já não estava mais presente, se houve alguma alteração promovida pelo tratamento com lítio ou alguma resposta do sistema colinérgico durante a inflamação, essas alterações já não estavam mais presentes no momento da retirada do cérebro dos animais.

Em nível molecular, avaliamos a densidade da GSK-3 β , que é o principal alvo terapêutico do lítio e está altamente envolvida em processos de neuroinflamação, além de participação em vias de apoptose e sobrevivência celular (Beurel, 2006). O lítio inibe essa enzima ao induzir sua fosforilação na serina 9. Com isso, atingem-se os efeitos clínicos resultantes do tratamento. Não foi observada diferença estatística entre os grupos, apesar de haver um discreto aumento da relação pGSK-3 β / GSK-3 β .

Com relação ao tratamento com lítio, este foi realizado na dose de 0,2 mg/kg (correspondente à dose utilizada no estudo anterior com humanos), foi iniciado em animais jovens (2 meses de idade) e perdurou por sete meses. Dessa forma, o objetivo do desenho experimental usado no presente trabalho foi verificar uma possível proteção dessa dose de lítio à inflamação aguda induzida por injeção de LPS, o que também não pôde ser de fato verificado pelo motivo supracitado.

Em estudo recente de nosso grupo (Nunes et al., FeSBE 2012) verificamos que camundongos C57Bl/6 de 18 meses de idade (WT Ctrl) continuam mantendo a capacidade de aprender a tarefa na esQUIVA inibitória. Por outro lado, animais transgênicos para a doença de Alzheimer, de mesma idade (TG Controle), não conseguem, minimamente, aprender a tarefa. Aqueles que passaram para o lado escuro do equipamento na sessão de aquisição (Treino), não retiveram a informação na sessão de teste (Teste) (figura 10). Com o tratamento com lítio, na mesma dose

utilizada no presente trabalho (0,2 mg/kg), por 16 meses (dos 2 aos 18 meses de idade: WT Li 2m e TG Li 2m) ou por 8 meses (dos 10 aos 18 meses de idade: WT Li 10m e TG Li 10m) houve aumento significativo da latência para entrar na câmara escura, evidenciando a formação da memória, em todos os grupos estudados.

Figura 10 - Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo de camundongos transgênicos em esQUIVA INIBITÓRIA.

Em outro trabalho grupo, animais transgênicos para a doença de Alzheimer foram submetidos à esQUIVA INIBITÓRIA quando completaram 18 meses de idade. O aumento na latência no teste indica o aprendizado da tarefa. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Dessa forma, é possível que os efeitos comportamentais desse tratamento somente sejam evidentes quando há a presença de um processo neurodegenerativo (no caso, acompanhado sabidamente, por instalação de processo inflamatório). Porém, não se pode descartar a possibilidade de a terapêutica com microdoses de lítio ser eficaz em proteger o organismo contra insultos inflamatórios agudos, pois já foi demonstrado que o lítio preveniu o aumento de mediadores inflamatórios em culturas primárias e no cérebro de ratos (Basselin et al., 2010; Wang et al., 2010).

A avaliação do consumo de água pelos animais foi feita a fim de possibilitar o cálculo da quantidade média de lítio ingerida. Foi observado que os animais tratados

com lítio consumiram, em média, 50% mais água que os animais tratados com água normal, mas a quantidade de lítio ingerida foi a esperada, 0,2 mg/kg.

Embora a farmacocinética do lítio varie consideravelmente entre indivíduos, o volume de distribuição e a taxa de excreção desse íon são relativamente estáveis. O lítio é um cátion monovalente e tem características semelhantes ao sódio e ao potássio, por serem do mesmo grupo químico. No néfron, após o processo de filtração, 80% do lítio é reabsorvido no túbulo proximal. Esse mecanismo ocorre, provavelmente, por competição com transportadores de sódio, uma vez que períodos ocasionais de perda de sódio (por exemplo, por doenças intercorrentes ou restrições de fluidos e eletrólitos) aumentam a retenção desse íon. Entretanto, o uso de diuréticos espoliadores de sódio, como os tiazídicos, também aumentam a retenção de lítio (Baldessarini, Tarazi, 2001). Sob tratamento com lítio, há aumento da excreção de sódio levando, conseqüentemente à poliúria e polidipsia. Apesar da dose usada nesse projeto ser mil vezes menor que a usada para o tratamento do transtorno bipolar, o aumento do consumo de água observado ao longo de doze semanas nesse trabalho pode ser decorrente do efeito do lítio nos rins. Mailman (1983) constatou, ainda, que o lítio aumentou o nível plasmático de renina e angiotensina I e II podendo, portanto, aumentar a sensação de sede. Os rins foram retirados e congelados, o que possibilita a análise histopatológica nesses órgãos. Além disso, o sangue foi coletado e o soro, separado, podendo ser utilizado para dosagem de creatinina e litemia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a terapêutica com microdoses de lítio tem se mostrado eficaz em reduzir os prejuízos cognitivos em modelos animais de neurodegeneração, que possuem um processo inflamatório concomitante, e em animais velhos, que, por possuírem perfil imunológico naturalmente alterado, podem apresentar esses sintomas.

Uma vez que neste estudo foram utilizados animais jovens, verificamos que a indução da inflamação aguda não foi capaz de causar danos aos processos de aprendizagem e memória de longo prazo, refletidos nos testes comportamentais, independentemente do tratamento crônico com microdoses de lítio ou água.

Ainda, como ao final do protocolo experimental os animais não estavam mais sob o cenário inflamatório pretendido com a injeção de LPS, planejamos repetir os experimentos, tratando os animais com microdoses de lítio pelo mesmo tempo e induzindo a inflamação com LPS. Os animais serão mortos, entretanto, após 2 horas da injeção do LPS, tempo no qual há comprovadamente um aumento significativo das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no sangue e cérebro dos animais (Munhoz et al., 2010; Terrando et al., 2010). Com isso, esperamos obter as respostas que nos propusemos no início desse projeto.

REFERÊNCIAS³

Ackermann TF, Kempe DS, Lang F, Lang UE. Hyperactivity and enhanced curiosity of mice expressing PKB/SGK-resistant glycogen-synthase kinase-3 (GSK-3). *Cell Physiol Biochem*. 2010;25:775-86.

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*. 2009;89:73–120.

Arai K, Matsuki N, Ikegaya, Y, Nishiyama, N. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. *Jpn J Pharmacol*. 2001;87:195–201.

Baldessarini RJ, Tarazi FI. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap.20, p. 485-520.

Basselin M, Kim HW, Chen M, Ma K., Rapoport SI, Murphy RC, Farias SE. Lithium modifies brain arachidonic and docosahexaenoic metabolism in rat lipopolysaccharide model of Neuroinflammation. *J Lipid Res*. 2010;51:1049-56.

Beurel E, Joep RS. The Paradoxical Pro- and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. *Prog Neurobiol*. 2006;79(4): 173–89.

Beurel E, Michalek SM, Joep RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen-synthase-kinase-3 (GSK-3). *Trends Immunol*. 2010 Jan;31(1):24-31.

Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:271359. doi: 10.1155/2013/271359.

Boccia MM, Blake MG, Krawczyk MC, Baratti CM. Hippocampal alpha7 nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience*. 2010;171:531–43.

³ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Camarano AA. Mecanismos de proteção social para a população idosa brasileira. Rio de Janeiro: Ipea; 2006.

Camarano AA, Kanso S, Mello JL. Como vive o idoso brasileiro? In: Camarano AA. organization. Os novos idosos brasileiros: muito além dos 60? Rio de Janeiro: Ipea; 2004.

Cammarotta M, Bevilaqua LRM, Izquierdo I. Aprendizado e memória. In: Lent R. Neurociência da mente e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Cap. 11, p. 241-252.

Carvalho J, Garcia RA. O Envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. *Cad Saúde Pública.* 2003;19(3):725-33.

Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzzeti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2009;8:18–30.

Dantzer R. Cytokine-induced sickness-behavior: where do we stand? *Brain Behav, Immun.* 2001;15:7–24.

De Rosa MJ, Esandi Mdel C, Garelli A, Rayes D, Bouzat C. Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2005;160: 154–61.

Doursout MF, Schurdell MS, Young LM, Osuagwu U, Hook DM, Poindexter BJ, Schiess MC, Bick DLM, Bick RJ. Inflammatory cells and cytokines in the olfactory bulb of a rat model of neuroinflammation; insights into neurodegeneration? *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Jul;33(7):376-83.

Ferreira FR, Spini VBMG, Ribeiro GCC, Paduani GF. chronic lithium treatment prevent anxiety-like behavior related to dietary restriction. *Biosci J.* 2009;25(2):131-8.

Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1991;129:318-20.

Fujii T, Nakai K, Nakajima Y, Kawashima K. Enhancement of hippocampal cholinergic neurotransmission through 5-HT1A receptor-mediated pathways by repeated lithium treatment in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000;78:392-9.

Gauthier S. Advances in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *CMAJ.* 2002; 166(5):616-23.

Green HF, Nola YM. GSK-3 mediates the release of IL-1b, TNF-a and IL-10 from cortical glia. *Neurochem Int.* 2012;61:666–71.

Hake AM, Farlow MR. New concepts in the drug therapy of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(12):1975-83.

Hansen RA, Gartlehner G, Kaufer DJ, Lohr KN, Carey T. Drug class review on Alzheimer's drugs: final report. *Drug Class Reviews*. Portland (OR): Oregon Health & Science University; 2006.

Hogan DB, Patterson C. Treatment of Alzheimer's disease and other dementias - review and comparison of the cholinesterase inhibitors. *Can J Neurol Sci*. 2002;29:306-314.

Hoyle E, Genn RF, Fernandes C, Stolerman IP. Impaired performance of alpha 7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology*. 2006;189:211-23.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. *Projeção da População do Brasil por sexo e Idade para o Período 1980-2050*. Rio de Janeiro; 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Uma análise das condições de vida da população brasileira. Rio de Janeiro. [cited from 2012 Ago. 11]. Disponível em:http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=987, 2007.

Iravani MM, Leung CC, Sadeghian M, Haddon CO, Rose S, Jenner P. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *Eur J Neurosci*. 2005;22(2):317-30.

Jenny NS. Inflammation in aging: cause, effect, or both? *Discov Med*. 2012 Jun; 13(73):451-60.

Joje RS. Effects of lithium treatment in *vitro* and in *vivo* on acetylcholine metabolism in rat brain. *J Neurochem*. 1979;33:487-97.

Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R, Zhou JH, Shen WH, Johnson RW, Broussard SR. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*. 2003 Feb;17 Suppl 1:S112-8.

Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, Hong JT. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation*. 2008;5:37-51.

Ledoux J-M. Features of the comparative pharmacokinetics of lithium; a potential application of its use in livestock farming. *Med Hypotheses*. 2003;61(2):278-81.

LeDoux JE. The amygdala. *Curr Biol*. 2000;17(20):868-74.

Lio D, Annoni G, Licastro F, Crivello A, Forte GI, Scola L, Colonna-Romano G, Arosio B, Galimberti L, Vergani C, Caruso C. Tumor necrosis factor-alpha -308A/G

polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:567-71.

Mailman RB. Lithium-induced polydipsia: dependence on nigrostriatal dopamine pathway and relationship to changes in the rennin-angiotensin system. *Psychopharmacology.* 1983;80(2):143-9.

McAlpine FE, Lee JK, Harms AS, Ruhn KA, Blurton-Jones M, Hong J, Das P, Golde TE, LaFerla FM, Oddo S, Blesch A, Tansey MG. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis.* 2009;34:163-77.

Mckinney M, Jacksonville MC. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem. Pharmacol.* 2005;70:1115-24.

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos Jr L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature.* 1995;374:647-50.

Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky, RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neuroscience.* 2010;30(41):13690-8.

Nautiyal KM, McKellar H, Silverman AJ, Silver R. Mast cells are necessary for the hypothermic response to LPS-induced sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R595–R602.

Nunes MA, Viel TA, Buck HS. Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013; 10(1):104-7.

Nunes MA, Silva KC, Caetano AL, Aquila LP, Camargo MM, Souza SG, Balthazar J, Dong KE, Viel TA, Baraldi-Tornisielo T, Buck HS. Avaliação do tratamento com microdoses de lítio para a memória espacial de camundongos transgênicos para a Doença de Alzheimer (APPSWIND). In: XXVII Reunião Anual da FeSBE; 22-25 de agosto de 2012. Águas de Lindoia, São Paulo, SP.

Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. *Rev Psiquiatr.* 2007;34(6):294-5.

Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang L.H, Hudson L, Lin X, Patel N, Johnson SM, Chavan S, Goldstein RS, Czura CJ, Miller EJ, Al-Abed Y, Tracey KJ, Pavlov VA. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med.* 2008; 14(9-10):567-74.

Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:789-813.

Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav Immun*. 1998 Sep;12(3):212-29.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453-62.

Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Interv*. 2004;4(5):259-72.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Rezvani AH, Kholdebarin E, Brucato FH, Callahan PM, Lowe DA, Levin ED. Effect of R3487/MEM3454, a novel nicotinic $\alpha 7$ receptor partial agonist and 5-HT₃ antagonist on sustained attention in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:269–75.

Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem*. 2004;89:337–43.

Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev*. 2011;10(3):319–29.

Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007; 204(2):733-40.

Sereniki A, Vital MABF. A Doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev Psiquiatr RS*. 2008;30(1 Supl).

Squire LR, Kandel ER. *Memória: Da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Kiyano K, Andrä M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP₃ pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res*. 2006;83:1461–70.

Terrando N, Fidalgo AR, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Maze M. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care*. 2010;14:R88.

Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Cholinergic protection via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. *Neurochem Int*. 2010;56:135–42.

Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing Pavlovian conditioning and inhibitory avoidance. *Learn Mem.* 2004;11:35-42.

Viel TA, Caetano AL, Albuquerque MS, Araújo MS, Buck HS. Chronic infusion of amyloid- β peptide and sustained attention altered $\alpha 7$ nicotinic receptor density in the rat brain. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(10):1210-20.

Young JW, Crawford N, Kelly JS, Kerr LE, Marston HM, Spratt C, *et al.* Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007;17:145–55.

Wang MJ, Huang HY, Chen WF, Chang HF, Kuo JS. Glycogen synthase kinase-3 β inactivation inhibits tumor necrosis factor- α production in microglia by modulating nuclear factor κ B and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation.* 2010;31(7):99-117.

Wood AJ, Goodwin GM, Rosemarie de Souza, Green AR. The pharmacokinetic profile of lithium in rat and mouse; an important factor in psychopharmacological investigation of the drug. *Neuropharmacology.* 1986;25(11):1285-88.