MARILIA SILVA DE ALBUQUERQUE

CARACTERIZAÇÃO DA MEMÓRIA E DE
MARCADORES COLINÉRGICOS AO LONGO
DO ENVELHECIMENTO DE RATOS

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

MARILIA SILVA DE ALBUQUERQUE

CARACTERIZAÇÃO DA MEMÓRIA E DE
MARCADORES COLINÉRGICOS AO LONGO
DO ENVELHECIMENTO DE RATOS

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 original

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

Albuquerque, Marília Silva de.

Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos / Marília Silva de Albuquerque. -- 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: Neurofarmacologia do envelhecimento e da doença de Alzheimer.

Versão do título para o inglês: Characterization of memory and cholinergic markers during the aging of rats.

1. Sistema Colinérgico 2. Memória 3. Envelhecimento 4. Receptores nicotínicos I. Viel, Profa. Dra. Tânia Araújo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0192/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marília Silva de Albuquerque.

Título da Dissertação: Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos.

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 **102** nas fls. **107** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Tania Araújo Viel**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marília Silva de Albuquerque** e o pesquisador **Hudson de Souza 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

*Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Leila e José Antonio,
que, em mim, plantaram as sementinhas
da dúvida e da inquietação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, que me permitiu um aprofundamento teórico e a possibilidade dessa pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, que possibilitou que parte desta pesquisa fosse lá executada.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, que me deu liberdade para voar... Tânia, agradeço pela oportunidade, por toda cumplicidade, pelos ensinamentos, por sua luta e empenho na pesquisa. Obrigada pela confiança e por ter vivido mais essa etapa tão importante comigo!

Ao Hudson, meu co-orientador, agradeço sua dedicação e entusiasmo a cada protocolo padronizado, a cada imagem adquirida. Obrigada por dividir comigo seus conhecimentos.

À Slavica Krantic por ter me ajudado a acreditar no meu sonho, por ter confiado em mim e no meu trabalho. Agradeço pelos momentos, pelas conversas, pela atenção. Seus ensinamentos na pesquisa e na vida estão nas minhas mais lindas memórias.

Ao professor Remi Quirion e ao professor Naguib Mechawar por terem me permitido viver um sonho. Agradeço a confiança e a toda experiência que pude viver em seus laboratórios em Montreal.

À Maria Antonieta Davolli, querida M.A., que com alegria e leveza, apresentou-me muitas técnicas e possibilidades.

Aos professores do ICB que contribuíram muito com meu aprendizado e amadurecimento acadêmico durante esse mestrado. Agradeço ao Marcos Vinícius Baldo, à Regina Markus, ao Martin Metzger, ao Cristóforo Scavone e à Maria Inês Nogueira.

À Anna Karenina, por tê-la acompanhado no estágio em ensino (PAE), foi uma oportunidade linda. Você é meu exemplo de professora! Agradeço, também, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas e reflexões!

À Natália, por toda vida compartilhada, desde as mais simples alegrias até as mais profundas crises. Agradeço pelo companheirismo, pelas dúvidas, pelas descobertas (os nossos olhos brilham quando “fechamos” as sinapses!). Seu apoio e amizade foram fundamentais para essa etapa em minha vida.

Aos amigos de laboratório, quanta vida nesses anos! Cada um contribuiu essencialmente para esse meu processo. Agradeço à Tíci, pelo conforto e segurança; à Marielza, pela personificação das palavras determinação e coragem; à Laura, pela alegria e sinceridade; à Káris, pelas massagens e sorrisos; à Milena, pela maturidade na vida; à Ariadiny, pela dedicação; ao Danilo, pelo suporte tecnológico; à Gabi, pelo esforço; à Karla, pelas experiências compartilhadas e à Mel, pela companhia e incentivo nas noites no laboratório.

Ao Felipe, pelo suporte tecnológico, pelas conversas, por compartilharmos de um mesmo sonho e acreditarmos que podemos fazer a nossa parte na educação.

À Gabriela, querida amiga, obrigada pela certeza de que a tenho para a vida!

À Bianca, agradeço pela vida! Obrigada por estar comigo sempre, por me ajudar a ver a vida por uma ótica coerente, poética e musical. Agradeço pela construção e concretização dos sonhos. Sua participação, carinho e companheirismo foram fundamentais nesses anos. Você é parte disso tudo!

À linda e pequena Isadora, agradeço pelo seu olhar, pela sua admiração, pelo seu amor!

À Rachel, irmã madura e determinada. Agradeço pelo apoio, pela confiança, por sua coragem na vida!

Ao meu pai, agradeço pelo respeito e confiança. Obrigada por me ajudar a concretizar essa etapa, agradeço todo seu esforço. São os desafios que nos movem, não é mesmo?

À minha querida e companheira mãe! Agradeço por todo amor, dedicação, carinho, entusiasmo. Você foi essencial nesses anos! Agradeço ao seu apoio incondicional e à torcida de que venham os próximos trabalhos.

*You never know how strong you are,
until being strong is the only choice you have.*

Autor descohecido

RESUMO

Albuquerque, MS. Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O aumento da expectativa de vida, a diminuição das taxas de mortalidade e de fecundidade e melhoras substanciais nos parâmetros de saúde pública vêm contribuindo para o expressivo envelhecimento populacional. Compreender o processo de envelhecimento é aceitar modificações orgânicas que ocorrem naturalmente, dentre elas uma alteração nas capacidades cognitivas. Nesse contexto, o sistema colinérgico possui papel importante na modulação dos processos de aprendizagem e memória. A maioria das eferências colinérgicas parte do prosencéfalo basal e se projeta para o hipocampo, neocortex, partes do córtex límbico e amígdala. Nesses locais, há ativação de receptores colinérgicos, entre eles, os receptores nicotínicos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, os subtipos encontrados em maior abundância no sistema nervoso central. Nesse trabalho, avaliamos a evocação da memória de ratos de diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 22 meses) em esQUIVA inibitória e, também, analisamos a densidade dos receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ AChRs) e da subunidade $\beta 2$ no hipocampo, por meio de ensaio radioautográfico e *western blotting*, respectivamente, além de marcadores colinérgicos enzimáticos, a colina acetiltransferase (ChAT), envolvida com síntese de acetilcolina (ACh) e a acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação da ACh. As análises de ChAT foram obtidas por meio de ensaios imunohistoquímicos e de AChE por *western blotting*. Com relação aos resultados comportamentais, os grupos com 18 e 22 meses apresentaram um déficit na evocação da memória de longa duração (MLD) comparado ao desempenho dos animais de 12 meses. Os $\alpha 7$ AChRs desses animais apresentaram-se aumentados nas células piramidais CA3 e nas células polimórficas do giro denteado (PoDG) com relação ao grupo de 12 meses. Por outro lado, os demais marcadores colinérgicos estavam inalterados com o envelhecimento no hipocampo. Diante desses resultados, podemos sugerir dois possíveis mecanismos para explicar a redução na evocação da MLD dos animais de 18 e 22 meses acompanhada do aumento na densidade de $\alpha 7$ AChRs nas células do PoDG e de CA 3 no hipocampo: 1) uma estratégia adaptativa do envelhecimento (plasticidade colinérgica), a fim de minimizar as perdas morfofuncionais decorrentes desse processo, uma vez que esses receptores modulariam o sistema excitatório glutamatérgico ou 2) uma modulação nos interneurônios GABAérgicos desencadeando, assim, uma inibição no processamento da informação e o declínio observado da memória.

Palavras-chave: Sistema Colinérgico. Memória. Envelhecimento. Receptores nicotínicos.

ABSTRACT

Albuquerque, MS. Characterization of memory and cholinergic markers during aging of rats. [dissertation [(Masters thesis Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The increase in life expectancy, decrease in mortality and fertility rates and also substantial improvement in health conditions have been contributing to the significant population aging phenomenon. Understanding the aging process is to accept natural alterations that occurs in the biological systems, such as cognitive abilities. In this regard, the cholinergic system plays an important role in modulating learning and memory. The basal forebrain provides the major cholinergic efferents and projects to the hippocampus, neocortex, limbic cortex and amigdala. In these structures there is activation of cholinergic receptors, such as $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors, the most abundant types of nicotinic receptors found in the central nervous system. In this work, we evaluated memory recall during the aging of rats (3, 6, 12, 18 and 22 months old) with the passive avoidance apparatus. We also evaluated, in the hippocampus, the density of $\alpha 7$ nicotinic receptors ($\alpha 7$ AChRs) and the nicotinic receptor subunit $\beta 2$, using autoradiography and western blotting, respectively. In addition two cholinergic enzymes were analysed: choline acetyltransferase (ChAT), that synthesizes acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE), which metabolizes ACh in the synapse. ChAT analyses were done by immunohistochemistry and AChE by western blotting. In the behavioural regard, the 18 and 22 months old group showed a deficit in long-term memory recall (LTM) compared to the 12 months group. Also, their $\alpha 7$ AChRs density were increased in pyramidal cells of CA 3 (py CA 3) and polymorphic cells of dentate gyrus (PoDG) compared to 12 months. On the other hand, the others cholinergic markers were unchanged with aging in hippocampus. Thus, the deficit in LTM observed at 18 and 22 months combined with the increased $\alpha 7$ receptors in PoDG and py CA 3 in the hippocampus could be explained: 1) as an adaptive strategy of aging (cholinergic plasticity in glutamatergic neurons), in order to decrease morphofunctional losses or 2) as a modulation in GABA interneurons triggering inhibition in the memory evocation.

Keywords: Cholinergic System. Memory. Aging. Nicotinic Receptors.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Estruturas neurais relacionadas à memória.....</i>	14
1.2	<i>Classificação das memórias.....</i>	14
1.3	<i>Estratégia de aquisição de memória: Reflexo Pavloviano</i>	16
1.4	<i>O circuito neural do medo condicionado</i>	18
1.5	<i>Sistema colinérgico.....</i>	19
1.6	<i>Receptores nicotínicos e a formação da memória.....</i>	21
1.7	<i>Envelhecimento, marcadores colinérgicos e memória.....</i>	22
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	<i>Animais</i>	25
3.2	<i>Avaliação da evocação da memória.....</i>	25
3.3	<i>Avaliação da atividade motora</i>	26
3.4	<i>Radioautografia para receptores nicotínicos alfa 7</i>	26
3.5	<i>Quantificação da densidade de receptores nicotínicos alfa 7</i>	27
3.6	<i>Imunohistoquímica para a enzima colina acetiltransferase</i>	27
3.7	<i>Quantificação da densidade da enzima colina acetiltransferase.....</i>	28
3.8	<i>Western Blotting para a enzima acetilcolinesterase e para a subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico</i>	31
3.9	<i>Quantificação da enzima acetilcolinesterase e da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico.....</i>	32
3.10	<i>Análise estatística.....</i>	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	<i>Avaliação da atividade motora</i>	33
4.2	<i>Avaliação da memória de curta duração</i>	33
4.3	<i>Avaliação da memória de longa duração.....</i>	35
4.4	<i>Quantificação da densidade de receptores nicotínicos $\alpha 7$</i>	37
4.5	<i>Quantificação da densidade da enzima colina acetiltransferase (ChAT)</i>	40
4.6	<i>Quantificação da densidade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico.....</i>	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54

REFERÊNCIAS	56
ANEXO - Protocolo de neutralização e inativação do DAB.....	63

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), consideram-se idosas as pessoas que apresentam 60 anos ou mais. Em 1940, esses indivíduos representavam 4% da população o que, em números absolutos, correspondiam a 1,7 milhões de pessoas. Em 2000, atingiram 8,6%, caracterizando 14,5 milhões de brasileiros (Camarano et al., 2004). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) realizou, em 2010, o XII Censo Demográfico e constatou que a população idosa no Brasil já alcançou a marca de 20,6 milhões de habitantes. Projeções do mesmo instituto sugerem que teremos 30,9 milhões de idosos em 2020.

Esses números ressaltam a importância de pesquisas destinadas a esse segmento populacional, ainda pouco explorado, que cresce progressivamente. O aumento da longevidade respalda-se, em parte, nos avanços científicos e tecnológicos, bem como em uma melhora substancial nos parâmetros de saúde pública ao longo do último século.

Envelhecer é um processo carregado de muitos mitos e tabus. Compreender esse processo é aceitar alterações orgânicas que ocorrem naturalmente, dentre elas modificações das funções cognitivas, que corresponde a uma das inquietudes mais presentes na vida das pessoas. O número de casos de demência, em termos de incidência e prevalência, apresenta-se diretamente proporcional ao aumento desse segmento etário (Charchat-Fichman et al., 2005).

A possibilidade de evocar informações, lembranças e imagens dos momentos vividos confere às pessoas uma singularidade. Izquierdo (2002) parafraseia Norberto Bobbio, filósofo italiano, quando nos apresenta a seguinte frase: “somos exatamente aquilo que nos lembramos” e complementa “e aquilo que decidimos esquecer”. A capacidade mnemônica apresenta-se como um elemento constituinte da identidade do indivíduo.

Considerando esse cenário, buscamos contribuir com as discussões a respeito do envelhecimento e da formação das memórias na perspectiva da pesquisa básica.

1.1 Estruturas neurais relacionadas à memória

As memórias não ficam armazenadas em uma localização específica do cérebro e, sim, em várias regiões, sendo ligadas por circuitos de memórias (Gazzaniga, Heatherton, 2005). As estruturas neurais implicadas nos processos de memória envolvem lobos temporais mediais (hipocampo, amígdala e córtex entorrinal), córtex pré-frontal, cerebelo, septo medial, entre outras (Gazzaniga, Heatherton, 2005; Izquierdo, 2002; Lent, 2004).

A consolidação da memória imediata em memória de longa duração tem participação ativa do hipocampo e do córtex entorrinal. É importante ressaltar que os lobos temporais mediais não consistem no repositório final das memórias, mas são responsáveis por coordenar o fortalecimento entre as ligações neurais. O armazenamento, de fato, está relacionado com os locais específicos de processamento durante a percepção da nova informação sendo, portanto, atrelado às áreas sensoriais (Gazzaniga, Heatherton, 2005).

Os responsáveis pela comunicação entre os neurônios nos processos de aquisição, consolidação e evocação das informações são os neurotransmissores como: glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, serotonina e acetilcolina (ACh) (Gazzaniga, Heatherton, 2005; Izquierdo, 2002).

Estudos comportamentais e celulares sugerem que os comportamentos de aprendizagem e memória podem ser modulados por uma forma de plasticidade sináptica, na qual um aumento persistente da estimulação de neurônios leva a um aumento da eficácia da transmissão sináptica, conhecido como potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (Squire, Kandel, 2003). A LTP envolve a ativação de neurônios glutamatérgicos, com consequente aumento da produção de neurotrofinas e aumento da arborização dendrítica (Hotulaine, Hoogenraad, 2010; Pang, Lu, 2004). Esse processo é modulado pelos neurotransmissores citados anteriormente.

1.2 Classificação das memórias

As memórias podem ser classificadas de duas formas: relacionadas à natureza das informações evocadas ou ao tempo de duração das mesmas. No que diz respeito à natureza das memórias, há as que registram fatos, eventos ou

conhecimentos, são denominadas memórias declarativas e, outras que armazenam capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, chamadas memórias de procedimento (Izquierdo, 2002). Em animais, as memórias declarativas podem ser avaliadas por meio de estudos com contextos, objetos e odores (Cammarota et al., 2007).

O processo mnemônico consiste em algumas etapas: aquisição, armazenamento, consolidação e evocação (reconsolidação) das informações (Izquierdo, 2002, Squire, Kandel, 2003). Em relação ao tempo de duração das memórias, as classificações consistem em: memória imediata (ultra-rápida), memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) (Izquierdo, 2002; Lent, 2004).

Existem memórias que duram apenas alguns segundos, o tempo em que a informação leva para ser processada. Poucas alterações bioquímicas acontecem e parece depender, fundamentalmente, da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal. São denominadas memória de trabalho ou memória imediata. Exercem papel gerenciador, ou seja, determinam se as novas informações devem ser ou não gravadas (Izquierdo, 2002).

O papel da MCD é, basicamente, o de manter o indivíduo em condições de responder através de uma “cópia” da memória principal, enquanto esta ainda não tenha sido formada. Izquierdo et al. (2002) asseguram através de experimentos farmacológicos, que a MCD não inclui ativação de fatores de transcrição, expressão de genes ou síntese de proteínas.

A formação desse tipo de memória é iniciada em CA 1, no hipocampo (Corno de Amón 1), no córtex entorrinal e no córtex parietal posterior onde ocorre a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA e, apenas em CA 1 há mobilização dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e metabotrópicos. Em todos os locais, a ação desses receptores é modulada, positivamente, por receptores colinérgicos, dopaminérgicos (D-1) e noradrenérgicos (β) e, negativamente, por receptores GABAérgicos.

No hipocampo e no córtex entorrinal, durante os primeiros 60 minutos, é necessária a ativação de proteínas cinases cálcio-dependentes (PKC) e durante os primeiros 90 minutos, o hipocampo requer a participação de PKA - proteína cinase dependente de AMPc (segundo mensageiro intracelular). Embora haja participação de PKA, não há fosforilação de CREB-1 (um fator de transcrição denominado

proteína ligante do elemento responsivo do AMPc-1), assim não há transcrição de proteínas (Izquierdo, 2002; Squire, Kandel, 2003).

Uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, que duram entre 3 e 8 horas, é responsável pela formação da memória de longa duração (Izquierdo, Medina, 1997). Squire e Kandel (2003) alertam que uma característica necessária ao armazenamento da MLD é a alteração estrutural coordenada em ambas as células, pré e pós-sinápticas.

O processo de consolidação das MLD corresponde a modificações permanentes ou, pelo menos, muito duradouras da forma e função das sinapses das redes neurais de cada memória. Nesse processo, há repetida excitação das células hipocampais por meio da estimulação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA e NMDA) e metabotrópicos. Ocorre a entrada de íons Ca^{2+} , que estimula direta ou indiretamente muitas enzimas chamadas proteínas cinases, responsáveis pela regulação da transferência de íons fosfato. A PKG (proteína cinase dependente do GMPc) ativa enzimas pós-sinápticas, por meio de mecanismos que promovem a liberação de glutamato. A PKA e a MAP cinase determinam a fosforilação de CREB-1, o qual ativa a transcrição de genes necessários para a formação da MLD e, assim, a produção de proteínas correspondentes indispensáveis à manutenção da informação por horas, dias e até anos (Cammarota, 2008; Izquierdo, 2002; Squire, Kandel, 2003).

Fisiologicamente, as memórias de curta e de longa duração assemelham-se no que diz respeito ao conteúdo das informações e compartilham as mesmas informações aferentes e eferentes. Já quanto às diferenças, caracterizam-se por não serem parte de um mesmo processo, mas, sim, de duas séries de processos paralelos e independentes (Izquierdo, 2002). Em nível celular, podemos nos referir à MCD como uma memória baseada em processo, enquanto que à MLD como uma memória baseada em estrutura (Squire, Kandel, 2003).

1.3 Estratégia de aquisição de memória: Reflexo Pavloviano

A aquisição das memórias, ou seja, a associação entre um estímulo e outro ou entre um estímulo e uma resposta, consiste na maior parte das formações mnemônicas. Quem primeiro estabeleceu teorias a esse respeito foi o fisiologista e médico russo: Ivan Pavlov (1849-1936).

Pavlov recebeu um prêmio Nobel decorrente de seu trabalho sobre o sistema digestório. Estava interessado no reflexo salivar que os animais, famintos, apresentavam quando recebiam alimentos. Sua grande contribuição adveio de sua observação. Percebera que os animais iniciavam a salivação no momento em que o técnico entrava na sala com uma tigela, a fim de alimentá-los. Concluiu que essa resposta comportamental só podia resultar de experiência adquirida, visto que esse estímulo visual não era intrínseco (Gazzaniga, Heatherton, 2005).

Assim, dedicou suas pesquisas posteriores aos princípios básicos da aprendizagem determinando, portanto, o condicionamento clássico. Este consiste em um processo de aprendizagem passivo, em que o sujeito é submetido ao condicionamento.

Nele, um estímulo incondicionado remete a uma resposta incondicionada, por exemplo, naturalmente quando um cachorro é exposto a um alimento há salivação. Insere-se um estímulo neutro, como uma campainha, assim toda vez que o alimento for apresentado ao cão, este será acompanhado do som. Após este procedimento ser repetido algumas vezes, apenas o soar da campainha será capaz de produzir salivação. Diz-se, então, que este estímulo está condicionado, conduzindo, portanto, a uma resposta condicionada.

Uma vez estabelecido um reflexo pavloviano (ligação entre um estímulo e uma resposta), a apresentação reiterada de estímulo condicionado sem o seu reforço (o estímulo incondicionado) provocará a extinção da memória. Como a aquisição ou extinção são passíveis de modulação e reversão, a reapresentação do estímulo condicionado pode reverter a extinção (Izquierdo, 2002).

Cammarota (2008) argumenta que essa é a forma de aprendizado mais utilizada nos estudos biológicos sobre memória, visto que é muito simples (pode ser adquirida em apenas uma sessão), perdura por muito tempo e tem valor adaptativo muito importante.

É importante ressaltar que esse tipo de tarefa requer a integridade funcional e estrutural da amígdala e do hipocampo (Izquierdo, 2002; Squire, Kandel, 2003). As relações entre essas estruturas estão intimamente ligadas à sensação de medo. LeDoux (2003) elucida que projeções da amígdala para o córtex contribuem para o reconhecimento do medo e outros aspectos cognitivos do processo emocional.

1.4 O circuito neural do medo condicionado

O medo é considerado um mecanismo de defesa que garante a proteção do animal frente ao perigo, tendo assim uma importância na evolução das espécies (Kim, Jung, 2006). O circuito cerebral do medo condicionado, aqui proposto, em esquiva inibitória consiste de uma junção do circuito do aprendizado do medo condicionado proposto por Bear et al. (2002) com o circuito de Papez (Esperidião-Antonio et al., 2008; Machado, 2006; Squire, Kandel, 2003).

A informação sensorial (choque), por meio de sinais elétricos, chega ao tálamo, após passar pelo córtex específico. O tálamo atua como uma estação de retransmissão de impulsos nervosos para o **córtex** (informação passa a ser consciente) e para o **complexo amigdalal** (região sub-cortical). A informação chega até amígdala pelo complexo basolateral (**BLA**, que consiste em: amígdala lateral, basolateral e basomedial), o qual promove a ativação do núcleo central, que se projeta aos **núcleos hipotalâmicos**, que emitem respostas comportamentais e mudanças na fisiologia do organismo, características da reação de medo (hipertensão, taquicardia, hiperventilação, etc.).

Para que ocorra essa reação e a formação da memória dependente de fatores emocionais, a região BLA recebe aferências tanto do tálamo quanto do córtex, caracterizando duas vias: 1) A informação proveniente do tálamo atua na reação imediata (após ativação do ramo simpático do Sistema Nervoso Autônomo). O processamento dessa via ocorre em 12 milissegundos e caracteriza a **expressão emocional** (Figura 1, via a); 2) A informação proveniente do córtex, mais especificamente do giro do cíngulo e do giro para-hipocampal (processada em 19 milissegundos) agrega a memória de situações similares já aprendidas, consolidadas e então evocadas por essas regiões corticais. Essas informações provêm do “circuito de Papez” (sistema fechado com conexões entre hipocampo – hipotálamo – tálamo – córtex, consolidando a informação correspondente à **experiência emocional** (Figura 1, via b).

Na tarefa de esquiva inibitória, esses conceitos emocionais denominados expressão e experiência são evocados no momento do teste, onde a exposição ao contexto evoca a situação de medo, na qual, inicialmente, a expressão comportamental prevalece (há aumento da frequência cardíaca, *freezing*, inibição da digestão, entre outros efeitos periféricos). Se o animal permanece no lado claro

acreditamos que houve uma evocação da resposta, sendo, portanto, um resgate da experiência emocional.

Figura 1 – Representação esquemática do circuito do medo condicionado

Representação da via de expressão emocional (via a, em azul) e da via de experiência emocional (via b, em vermelho).

1.5 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico possui papel importante na modulação dos processos de aprendizagem e memória. A maioria das eferências colinérgicas parte do prosencéfalo basal, área formada por 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, neocórtex, partes do córtex límbico e amígdala e modulam, assim, as funções cognitivas.

Muitos trabalhos sugerem que as perdas mnemônicas relacionadas tanto com o envelhecimento normal, quanto com demências progressivas, como a Doença de Alzheimer (DA), correspondem à perda/atrofia de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal, assim como uma redução significativa na atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT, do inglês: *choline acetyltransferase*) (Gauthier, 2002;

Seriniki, Vital, 2008). Esses achados subsidiam a “hipótese colinérgica” para a DA e justificam a utilização de fármacos anticolinesterásicos no tratamento dos seus sintomas (Hake, Farlow, 2001; Hogan, Patterson, 2002).

A acetilcolina (ACh), neurotransmissor do sistema colinérgico, é sintetizada no corpo celular dos neurônios através da ação catalítica da ChAT, que transfere o grupo acetil da molécula acetil-coenzima A à colina, que foi recaptada nos terminais axonais. A ACh é armazenada em vesículas e liberada em resposta ao influxo de cálcio extracelular. O cálcio ativa proteínas de tráfego que direcionam as vesículas para o terminal pré-sináptico. Nesse local, as vesículas se fundem à membrana, liberando a ACh para a fenda sináptica. Os fármacos mais utilizados atualmente para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, atuam na degradação da acetilcolinesterase (AChE, do inglês: *acetylcholinesterase*), enzima que degrada a ACh na fenda sináptica (Katzung, 2010; Rang et al., 2008).

As vias colinérgicas no sistema nervoso central têm seus efeitos mediados por duas classes de receptores: os receptores metabotrópicos muscarínicos e os receptores ionotrópicos nicotínicos.

Os receptores nicotínicos (nAChRs) fazem parte da super-família de receptores associados a um canal iônico e que inclui os receptores de glicina, ácido gama aminobutírico (GABA_A), glutamato (AMPA e NMDA) e a maioria dos receptores de serotonina. Os nAChRs são encontrados nos músculos esqueléticos (receptores musculares), nos gânglios autonômicos e em muitas áreas cerebrais (receptores neuronais). A principal propriedade farmacológica desses receptores é a capacidade de transformar um sinal químico, produzido pela ligação da acetilcolina (ACh) ao seu sítio de reconhecimento, em uma mudança conformacional do complexo receptor-canal iônico, permitindo o fluxo de íons e desencadeando a contração muscular e a transmissão neuro-neural. São, portanto, proteínas essenciais para a transmissão sináptica (Arias, 1997; Clementi et al., 2000).

Atualmente, em vertebrados, foram identificadas 17 subunidades para os receptores nicotínicos ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ e ϵ) (Boccia et al., 2010; Buckingham et al., 2009). Fisiologicamente, essas subunidades se combinam para formar receptores homo ou heteropentaméricos que possuem características eletrofisiológicas e neuroquímicas singulares (Nashmi, Lester, 2006).

Os receptores formados pelas subunidades $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ são os encontrados com maior frequência no sistema nervoso central (Wevers, Schröder, 1999).

Aparentemente, esses receptores possuem uma função moduladora nas transmissões sinápticas, função essa que se evidencia pela variada distribuição e localização dos mesmos. Os receptores localizados em regiões pré-sinápticas e perisinápticas aumentam a liberação de neurotransmissores. Enquanto aqueles localizados em regiões pós-sinápticas contribuem com transmissões excitatórias rápidas. Os outros que se localizam em regiões não-sinápticas modulam vários sistemas de neurotransmissores, influenciando a excitabilidade neuronal, além de terem papel na neuroproteção e neuroinflamação (Dani, Bertrand, 2007; McGehee, Role, 1996; Role, Berg, 1996; Wonnacot et al., 2006).

1.6 Receptores nicotínicos e a formação da memória

No hipocampo, a participação desses receptores na formação das memórias foi largamente explorada em animais adultos jovens (Arthur, Levin, 2002; Barros et al., 2004; Nott, Levin, 2006) e relacionada à indução da potenciação de longa duração (LTP) (Fujii et al., 1999; Matsuyama, Matsumoto, 2003).

Chen et al. (2006) demonstraram que a ativação do receptor $\alpha 7$ resgatou sinapses com déficit de LTP. Esse estudo foi realizado em animais previamente infundidos com o peptídeo beta amiloide (β -A) e os autores sugerem que a formação de LTP no hipocampo seria dependente da ativação desses receptores e que, dessa forma, eles poderiam ser alvos de futuras terapias para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

Os $\alpha 7$ AChRs participam da aquisição e consolidação tanto da memória de curta duração (MCD) quanto da de longa duração (MLD) na região CA1 do hipocampo, assim como na evocação da MLD em avaliação de esquiva inibitória (Marti Barros et al., 2004; Niewiadomska et al., 2009; Nott, Levin, 2006). Além disso, a participação especificamente dos receptores $\alpha 7$ foi evidenciada na reconsolidação da memória (Boccia et al., 2010) e atenção sustentada (Rezvani et al., 2009; Viel et al., 2012; Young et al., 2007).

1.7 Envelhecimento, marcadores colinérgicos e memória

A queda progressiva do comportamento cognitivo de roedores e os déficits colinérgicos relacionados à idade em animais normais ou transgênicos, que desenvolvem neurodegeneração, vêm sendo discutidos por diversos autores, porém algumas controvérsias são observadas nos achados literários.

Quirion et al. (1995) observaram baixos níveis de acetilcolina (ACh) e aumento significativo de receptores inibitórios muscarínicos do subtipo M₂ em ratos senis com déficit cognitivo. Em concordância com essas observações, Vaucher et al. (2001) mostraram que ratos senis têm níveis aumentados de Aβ1-40 no hipocampo e isso reduziu a liberação de ACh hipocampal em ratos idosos com ou sem déficit cognitivo. Utilizando camundongos transgênicos que superexpressam o peptídeo beta amiloide, Li e Shen (2000) mostraram perda neuronal no prosencéfalo basal apenas em animais com mais de 9 meses de idade, embora não observaram modificações no número de neurônios no córtex e hipocampo. Com esses resultados, sugere-se uma perda seletiva de neurônios colinérgicos nos animais transgênicos.

Em contrapartida, já foi demonstrado que o nível de marcadores colinérgicos bioquímicos aparentemente não se modifica ou está, moderadamente, alterado no córtex ou hipocampo de camundongos transgênicos que superexpressam o peptídeo β-amiloide. Além disso, não há perda de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal em camundongos transgênicos para presenilina 1 e proteína precursora amiloide (German et al., 2003; Hernandez et al., 2001). Segundo os autores, os animais apresentaram neurodegeneração cortical antes mesmo da deposição das placas senis.

Bellucci et al. (2006) mostraram uma significativa disfunção colinérgica correlacionada com prejuízo cognitivo em camundongos transgênicos que expressam uma dupla mutação da proteína precursora amiloide (TgCRND8), com 7 meses de idade. Os cérebros desses animais foram caracterizados com deposição de placa β-amiloide em várias áreas, tais como: córtex, hipocampo, tálamo e prosencéfalo basal, sendo que microglias e astrócitos estavam ativados em áreas próximas aos depósitos de placa β-amiloide. Esses autores demonstraram dano neuronal e extensa desmielinização em diversas áreas do cérebro ricas em fibras colinérgicas, como *Stratum Radiatum* do hipocampo e corpo caloso nesse modelo

transgênico. Observaram, também, uma redução do número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert (NBM) em 7 meses, comparado a 2 meses de idade.

Especificamente com relação à distribuição de receptores $\alpha 7$ no cérebro de ratos, há poucos trabalhos que retratem modificações relacionadas à idade. Tribollet et al. (2004) mostraram que não há redução significativa da densidade dos mesmos em ratos de 20 meses comparativamente a ratos de 2 meses de idade. Esses autores, entretanto, não analisaram cérebros de animais mais velhos, além disso, restringiram-se apenas às fases iniciais e finais do ciclo de vida, não atentando às possíveis modificações durante o processo de envelhecimento. Da mesma forma, em estudo anterior, Zanardi et al. (2002) utilizando cérebros humanos, não observaram uma modificação clara na densidade desses receptores, relacionada à idade.

Nesse contexto, considerando as discrepâncias nos dados apresentados em literatura, o número escasso de publicações e a importante relação entre o sistema colinérgico e os processos de memória, faz-se necessário um estudo a respeito dos marcadores colinérgicos ao longo do processo de envelhecimento e de suas possíveis implicações no processamento da memória.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar e comparar a evocação da memória de ratos aos 3, 6, 12, 18 e 22 meses de idade.
2. Avaliar a densidade dos receptores nicotínicos $\alpha 7$ e das subunidades $\beta 2$ no hipocampo nas diferentes idades.
3. Avaliar a densidade das enzimas colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo nas diferentes idades.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, albinos, machos, com 10 semanas de idade foram fornecidos pelo biotério do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) da UNIFESP. Os animais envelheceram no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e foram submetidos aos testes de memória aos 3 meses de idade e completarem 6, 12, 18 ou 22 meses.

Todos os procedimentos experimentais e manuseio geral dos animais foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institute of Health publication n.º 86-23) e “Lineas Directrices Relativas al Alojamento y a los Cuidados de los Animales” (European Community Council, 86/609/CEE). Além disso, essa pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (protocolo n.º 175) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/ USP, protocolo n.º 102, folha 107, livro 02).

3.2 Avaliação da evocação da memória

Utilizamos o equipamento de esQUIVA inibitória (modelo Ugo Basile, Itália), que consiste de uma caixa dividida em dois compartimentos iguais, sendo um iluminado e, o outro, escuro, separados por uma porta-guilhotina. É importante ressaltar que os roedores tem uma preferência inata pelo compartimento escuro (Ögren, Stiedl, 2010). Os animais foram colocados individualmente na parte iluminada da caixa e a latência, em segundos, referente à entrada no compartimento escuro foi registrada. Estando no lado escuro, o animal recebeu um choque de 0,5 mA por 2 s, deflagrado pelas barras metálicas localizadas no chão desse compartimento.

A latência máxima permitida para cada animal foi de 180 s. Em cada grupo etário, metade dos animais foi submetida a uma sessão de aquisição (SA) e a uma sessão de teste (ST) 90 minutos após a primeira exposição, consistindo assim na avaliação da memória de curta duração (MCD). Já, a outra metade, foi submetida a

uma SA e a um ST 24 horas após o treino, avaliando-se, assim, a memória de longa duração (MLD). Quanto maior o tempo de permanência no lado claro na ST, maior a lembrança do animal com relação àquele contexto. Os testes foram realizados nas mesmas condições dos treinos, porém os animais não receberam o estímulo elétrico após entrarem na câmara escura.

3.3 Avaliação da atividade motora

A fim de assegurarmos que as respostas observadas no teste de esquiva inibitória não decorreriam de alterações na atividade motora, todos os animais foram submetidos a uma avaliação antes do teste de memória. O equipamento (modelo Ugo Basile, Italy) consiste de uma caixa de acrílico transparente (35 cm x 23 cm x 20 cm) contendo um conjunto de sensores infravermelhos horizontais que registram a atividade locomotora, e outro conjunto de sensores verticais que registram a exploração vertical. Cada animal foi colocado individualmente na caixa e a atividade motora foi registrada por cinco minutos.

3.4 Radioautografia para receptores nicotínicos $\alpha 7$

Os animais foram anestesiados com halotano e decapitados para extração dos cérebros. Os cérebros de 4 animais, por grupo etário, foram cortados em fatias com espessura de 20 μ m a uma temperatura de -20°C , utilizando-se um criostato (Microm). As amostras foram montadas em lâminas previamente gelatinadas, secas por cinco min em dessecador, a vácuo, e mantidas a -80°C até o uso.

Para a radioautografia dos receptores nicotínicos $\alpha 7$ foi utilizado 5 nM [^{125}I]- α -bungarotoxina em tampão fosfato 50 mM contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, 1 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, 0,1 mM), pH 7,4. As incubações foram feitas à temperatura ambiente, por 90 min e as ligações não específicas foram determinadas na presença de 2 μ M da toxina não marcada.

Ao final dos períodos de incubação, as lâminas foram lavadas sequencialmente por 4 minutos, 4 vezes cada, em tampão fosfato gelado e rapidamente foram mergulhadas em água destilada para remover o excesso de sais. As lâminas foram secas em corrente de ar por uma hora e justapostas contra uma

folha de filme radioautográfico (Hyperfilm) por 7 dias, à temperatura ambiente, juntamente com uma micro-escala radioativa ($[^{125}\text{I}]$). Após a sensibilização dos filmes com a radiação contida nas lâminas, os filmes foram revelados em solução D-19 (revelador Kodak) e fixados em solução Ektaflo Kodak.

3.5 Quantificação da densidade de receptores nicotínicos alfa 7

Os radioautogramas foram quantificados usando um sistema MCID de análise densitométrica digital (InterFocus Imaging Ltd., Linton, England). A ligação específica dos radioligantes aos receptores foi determinada subtraindo-se a ligação não específica da ligação total de seções adjacentes. As estruturas anatômicas foram comparadas àquelas descritas por Paxinos e Watson (2007).

3.6 Imunohistoquímica para a enzima colina acetiltransferase

A avaliação da densidade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) foi realizada por imunohistoquímica, utilizando-se anticorpo primário contra a ChAT (abcam ab70219) feito em coelho. Nesse protocolo, os cortes de 4 animais por grupo foram aquecidos à temperatura ambiente e mantidos dessa forma até que a condensação que se forma nessa temperatura, desaparecesse (aproximadamente 10 min). Após secarem, os cortes foram fixados por imersão em acetona gelada (-20 °C) por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, os cortes foram lavados em tampão fosfato-salina (PBS), por 3 vezes de 5 min. Em seguida, os cortes foram incubados em PBS + 0.2% Triton X-100 por 90 min em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados por 10 minutos em solução peróxido de hidrogênio a 3%. Em seguida, foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. O excesso de tampão foi retirado e os cortes incubados por 1 hora com soro de cabra para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário utilizado na sequência. O excesso de soro bloqueador foi retirado e os cortes foram incubados por 16 horas com o anticorpo primário anti-ChAT (1:750), a 4 °C. Ao término do período de incubação com o primário, os cortes foram processados pelo método do complexo amplificador avidina-biotina-peroxidase (Vectastain elite ABC kit – Vector laboratories, USA). Resumidamente, os cortes foram imersos 3 vezes por 5 minutos em PBS e incubados, por 1 hora, em solução contendo o anticorpo secundário anti-

coelho produzido em cabra, em temperatura ambiente. Após a incubação com o secundário, os cortes foram lavados por 3 vezes de 5 min em PBS e, depois, incubados por 30 min com complexo amplificador. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 min em PBS. Após as lavagens, os cortes foram mergulhados em solução de diaminobenzidina (DAB)¹ por 4,5 minutos, nesse processo o DAB reage com a peroxidase do complexo avidina-biotina-peroxidase, revelando os cortes. Em seguida, 2 lavagens de 5 min cada, em água destilada foram realizadas para remover o excesso de DAB. Posteriormente, foi feita a desidratação sequencial em álcool 75%, 95% e 100%, 5 minutos cada. A seguir, as lâminas foram imersas em xilol por 10 minutos (2 vezes de 5 min). O protocolo foi finalizado com a cobertura dos cortes com lamínula.

3.7 Quantificação da densidade da enzima colina acetiltransferase

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por um microscópio de luz Nikon Eclipse E600 (Kanagawa, Japão), utilizando-se uma objetiva de 4x aumento, o qual estava acoplado a um sistema MCID de análise densitométrica digital (InterFocus Imaging Ltd., Linton, England). Todas as imagens foram adquiridas sob as mesmas condições de intensidade luminosa.

Os experimentos foram processados em lotes, sendo que esses possuíam lâminas provenientes de cada grupo etário com as marcações totais e, também, lâminas “não específicas”, ou seja, ausência do anticorpo primário, representando as ligações inespecíficas e o *background*. As análises visuais das lâminas “não específicas” mostraram a ausência de ligações inespecíficas representando, portanto, apenas o *background*.

A fim de corrigirmos as diferenças de *background* dos diferentes lotes, subtraímos uma imagem não específica das imagens totais, resultando nas imagens contendo apenas marcações específicas (figura 2).

Os cortes histológicos foram quantificados por densidade óptica relativa, considerando a área proporcional de marcação, ou seja, a razão entre a área

¹ É importante ressaltar que o DAB é uma substância cancerígena com alto poder mutagênico, assim procedimentos especiais devem ser realizados para sua inativação e, conseqüente, descarte. Anexo contém o protocolo utilizado para descontaminação da solução de DAB.

selecionada e a marcação positiva para ChAT, assim o valor máximo possível obtido nas leituras seria 1.

Figura 2 – Tratamento das imagens

Tratamento das fotomicrografias de hipocampo de ratos obtidas dos experimentos de imunohistoquímica. Figuras representam as etapas no processamento das imagens: a. Marcações totais; b. Marcações não específicas; c. Marcações específicas: imagem proveniente da subtração da figura a - figura b.

Foi realizada uma avaliação inicial dos lotes e verificamos as faixas de intensidade, saturação e tonalidade que se aplicavam às marcações positivas (figura 3). Considerando essas faixas e o padrão simétrico e arredondado das imunomarcações positivas para ChAT, foi estabelecido que as marcações menos arredondadas, que não estivessem entre 0,7 e 1,0, seriam excluídas, sendo 1 perfeitamente redondo (figura 4). Para cada animal, foram analisados, no mínimo, 9 cortes com hipocampo e foram obtidas, pelo menos, 5 leituras.

Figura 3 – Critérios de tonalidade, intensidade e saturação das cores.

Adequação dos critérios para todos os lotes de experimentos. a. ferramentas disponíveis no sistema utilizado. b. imagem com as marcações positivas para ChAT destacadas na cor azul.

Figura 4 – Critérios para exclusão de marcações

a. Fotomicrografias com destaque para as marcações positivas em azul escuro e as marcações excluídas em azul claro, considerando a forma arredondada das marcações positivas. b. em vermelho, a marcação específica da região onde localizam-se as células piramidais de CA 3.

3.8 Western Blotting para a enzima acetilcolinesterase e para a subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico

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 (volume final do tampão: 10 mL; proporção tecido (mg): tampão (μ L) = 1:3). 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, em leitora de placas, 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 192 mM 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 1 h a 4 °C. Terminada a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com tampão Tris 100 mM contendo NaCl 0,9%, Tween-20 0,1% e leite desnatado 5% (tampão de bloqueio) por 2 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-subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico foi utilizado soro de cabra a 5% ao invés de leite desnatado. Após lavagem, o material foi incubado com o anticorpo primário anti-acetilcolinesterase (Abcam, ab77959, diluído 1:1000), anti-subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico (Abcam, ab41174, 1:2000), β -tubulina (Abcam, ab134185, diluído 1:2000) por 17 h a 4 °C, sob agitação. 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 2 h à temperatura ambiente, com agitação. As marcações foram detectadas por quimioluminescência e a aquisição digital das imagens foi feita utilizando-se o equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Life Science).

3.9 Quantificação da enzima acetilcolinesterase e da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico

As imagens provenientes da revelação digital foram analisadas no programa ImageJ 1.46r (National Institute of Health). Inicialmente, a imagem foi convertida para 32-bits e depois invertida. As bandas foram analisadas separadamente, considerando como referência o tamanho da maior banda. Uma leitura referente ao *background* da membrana foi feita. Após essas análises, as leituras foram subtraídas do valor do background. Em sequência, a razão entre a proteína de interesse e o seu controle interno foi feita.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, versão, 5.0) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. O grupo etário de 12 meses foi estabelecido como referência de comparação.

Os dados obtidos em equipamento de esQUIVA inibitória foram expressos como medianas e intervalos interquartis e analisados com o teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos, seguidos pelo teste de Dunn. As diferenças comportamentais intragrupos foram verificadas utilizando o teste pareado para dados não-paramétricos Wilcoxon.

Os dados obtidos nas avaliações da atividade locomotora, densidade dos receptores nicotínicos $\alpha 7$, da subunidade $\beta 2$, das enzimas ChAT e AChE foram expressos como médias $\pm$ erro-padrão e analisados por análise de variância seguida pelo teste de Dunnett, tendo a idade de 12 meses como referência.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade motora

Antes dos testes de memória serem iniciados, a atividade motora dos animais foi avaliada. Na figura 5, observamos diferença significativa entre as médias de locomoção dos grupos ($F_{(4,53)} = 8,01$, $P = 0,0286$). Os grupos com 3 e 6 meses apresentaram aumento significativo na locomoção em comparação aos animais com 12 meses (3 meses: $769,9 \pm 24,1$; 6 meses: $839,2 \pm 55,5$ e 12 meses: $573,7 \pm 38,6$). Todavia, a locomoção dos grupos 18 e 22 meses não foi significativamente diferente dos valores apresentados pelo grupo de 12 meses.

Figura 5 - Avaliação da locomoção dos animais de diferentes idades.

Análise da locomoção dos ratos de diferentes idades. Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão da locomoção total (em unidades). 3 meses: $n=14$; 6 meses: $n=12$; 12 meses: $n=6$; 18 meses: $n=6$ e 22 meses: $n=8$ *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4.2 Avaliação da memória de curta duração

Os animais foram submetidos à avaliação da memória de curta duração, com intervalo de 90 minutos entre a sessão de aquisição (SA) e a sessão de teste (ST) no equipamento. Os grupos de animais com 3, 6 e 12 meses apresentaram diferença significativa entre as medianas (e intervalos interquartis) das latências

entre SA e ST (3 meses – SA: 15,80 s [7,18 s/ 22,95 s] e ST: 86,9 s [33,60 s/ 100,80 s]; 6 meses – SA: 18,05 s [7,13 s/ 23,88 s] e ST: 111,40 s [34,45 s/180 s] e 12 meses – SA: 24,25 s [14,65 s/ 48,05 s] e ST: 126,60 s [22,75 s/180 s]) (Figura 6 a, b, c).

Por outro lado, os grupos de animais com 18 e 22 meses não apresentaram diferença significativa entre as medianas das latências de SA e ST (18 meses – SA: 9,50 s [7,38 s/ 27,90 s] e ST: 78,10 s [29,40 s/ 122,80 s] e 22 meses – SA: 33,40 s [14,60 s/ 48,90 s] e ST: 33,90 s [19,60 s/ 106,20 s]) (Figura 6 d,e).

A latência dos treinos entre os grupos experimentais foi comparada e não observamos diferença estatística significativa entre as medianas ($P = 0,0520$).

Figura 6 – Avaliação da memória de curta duração em esquiwa inibitória.

Os animais foram submetidos à sessão de aquisição (SA) e, 90 min após, à sessão de teste (ST). As linhas horizontais e verticais representam as medianas e os intervalos interquartis, respectivamente. 3 meses: $n=14$; 6 meses: $n=12$; 12 meses: $n=10$; 18 meses: $n=6$ e 22 meses: $n=8$. **: $P < 0,01$ vs SA; ***: $P < 0,001$ vs SA.

A fim de avaliarmos a evocação da memória de curta duração entre as diferentes idades, comparamos as latências da ST (Figura 7). Não observamos diferença estatística entre as medianas dos grupos etários (3 meses: 86,90 s; 6 meses: 111,40 s; 12 meses: 126,60 s; 18 meses: 78,10 s e 22 meses: 33,90 s; $P = 0,56$).

Figura 7 - Avaliação da memória de curta duração ao longo do envelhecimento.

Comparação entre as latências das evocações de memória de curta duração de cada grupo etário. As linhas horizontais e verticais representam as medianas e os intervalos interquartis, respectivamente. 3 meses: $n=14$; 6 meses: $n=12$; 12 meses: $n=10$; 18 meses: $n=6$ e 22 meses: $n=8$.

4.3 Avaliação da memória de longa duração

Os animais foram submetidos à avaliação da memória de longa duração, com intervalo de 24 horas entre SA e ST. Os grupos de animais com 3, 6 e 12 meses de idade apresentaram diferenças significativas entre as medianas das latências de respostas entre treino e teste, (3 meses – SA: 14,60 s [11,30 s/ 34,40 s] e ST: 121,20 s [85,50 s/ 180 s]; 6 meses – SA: 23 s [13,15 s/ 48,35 s] e ST: 180 s [25,25 s/ 180 s] e 12 meses – SA: 16,30 s [10,35 s/ 23,53 s] e ST: 70,40 s [39,45 s/ 180 s]) (Figura 8 a,b,c).

Em contrapartida, não foi observada diferença estatística entre as medianas das latências dos treinos e testes dos grupos de animais com 18 e 22 meses (18

meses – SA: 11,15 s [7,13 s/ 16,15 s] e ST: 18,60 s [10,45 s/ 35,90 s] e 22 meses – SA: 20,45 s [13,03 s/ 46,35 s] e ST: 12,20 s [9,08 s/ 31,98 s]) (Figura 8 d, e).

Figura 8 – Avaliação da memória de longa duração em esQUIVA INIBITÓRIA.

Os animais foram submetidos à sessão de aquisição (SA) e, 24 h após, à sessão de teste (ST). As linhas horizontais e verticais representam as medianas e os intervalos interquartis, respectivamente. 3 meses: n=7; 6 meses: n=13; 12 meses: n=10; 18 meses: n=8 e 22 meses: n= 8 *: $P < 0,05$ vs SA e **: $P < 0,01$ vs SA.

Quando as latências dos treinos referentes aos grupos experimentais foram comparadas, não observamos diferença estatística entre as medianas ($P = 0,1014$). Entretanto, observamos redução estatisticamente significativa entre as latências de ST referentes aos grupos de 12 e 18 meses e 12 e 22 meses (12 meses: 70,4 s; 18 meses: 18,6 s e 22 meses: 12,2 s, Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da memória de longa duração durante o envelhecimento.

Comparação entre as latências das evocações de memória de longa duração de cada grupo etário. As linhas horizontais e verticais representam as medianas e os intervalos interquartis, respectivamente. 3 meses: n=7; 6 meses: n=13; 12 meses: n=10; 18 meses: n=8 e 22 meses: n= 8 *: $P < 0.05$ vs 12 meses.

4.4 Quantificação da densidade de receptores nicotínicos $\alpha 7$

A fim de avaliarmos a densidade de receptores nicotínicos $\alpha 7$ cerebrais ($\alpha 7$ AChRs) e, também, identificarmos as áreas cerebrais nas quais esses receptores estão distribuídos, processamos o experimento de radioautografia. Foi observado $\alpha 7$ AChRs em diversas áreas cerebrais, porém, para o presente trabalho, apenas área do hipocampo foi analisada.

Os $\alpha 7$ AChRs foram observados na camada polimórfica do Giro Denteado (PoDG) e no Corno de Amón 3 (CA3). Em PoDG, houve diferença significativa entre os grupos ($F_{(4,401)} = 15,91$, $P < 0,0001$, Figura 10). Foi verificado um aumento significativo da densidade de $\alpha 7$ AChRs dos animais com 22 meses ($10 \pm 0,27$ fmols/mg) quando comparada à densidade dos animais de 12 meses ($7,14 \pm 0,21$ fmols/mg). Observamos, na figura 11 as imagens, em pseudocores, provenientes das radioautografias.

Figura 10 - Quantificação da ligação específica para o radioligante [125 I]- α -bungarotoxina ([125 I]-BUTX) em sítios de ligação nas células granulares do giro denteado (PoDG) nas diferentes idades.

Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4. ***: $P < 0,001$.

Figura 11 – Fotomicrografias da região PoDG dos animais em diferentes idades.

Fotomicrografias pseudocoloridas de radioautogramas representando a distribuição anatômica da ligação total para a [125 I]- α -bungarotoxina nas células da camada polimórfica do giro denteado (PoDG) do hipocampo de animais de 3 meses (a), 6 meses (b), 12 meses (c), 18 meses (d), 22 meses (e). A maior marcação para o antagonista de $\alpha 7$ é mostrado em amarelo/vermelho, de acordo

com a escala. Ligações não específicas estão representadas em f. A identificação das estruturas está representada em g (adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

Nas células piramidais de CA3, também, observamos diferença significativa entre os grupos ($F_{(4,160)} = 6,71$, $P < 0,0001$). Foi observado, na figura 12, um aumento significativo das densidades de $\alpha 7$ AChRs dos grupos com 6 meses ($27,93 \pm 1,35$ fmols/mg), 18 meses ($24,89 \pm 0,83$ fmols/mg) e 22 meses ($25,24 \pm 0,55$ fmols/mg), quando comparados ao grupo com 12 meses ($21,25 \pm 0,90$ fmols/mg). Observamos, na figura 13 as imagens provenientes das radioautografias.

Figura 12 - Quantificação da ligação específica para o radioligante [125 I]- α -bungarotoxina ([125 I]-BUTX) em sítios de ligação nas células piramidais de CA3 nas diferentes idades.

Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ e ***: $P < 0,001$.

Figura 13 – Fotomicrografia da região CA3 dos animais em diferentes idades.

Fotomicrografias pseudocoloridas de radioautogramas representando a distribuição anatômica da ligação total para a $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha$ -bungarotoxina nas células piramidais de CA3 do hipocampo de animais de 3 meses (a), 6 meses (b), 12 meses (c), 18 meses (d), 22 meses (e). A maior marcação para o antagonista de $\alpha 7$ é mostrado em amarelo/vermelho, de acordo com a escala. Ligações não específicas estão representadas em f. A identificação das estruturas está representada em g (adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

4.5 Quantificação da densidade da enzima colina acetiltransferase (ChAT)

A fim de avaliarmos a densidade da enzima ChAT ao longo do envelhecimento e, também, identificarmos as áreas cerebrais nas quais essa enzima está presente, processamos o experimento de imunohistoquímica. As imunomarcações foram observadas em diversas áreas cerebrais, embora apenas o hipocampo tenha sido analisado.

As marcação para ChAT foram observadas nas células piramidais em CA1-2 e em CA3 e, também, no giro denteado na camada granular (GrDG) e na camada polimórfica (PoDG). Não observamos diferenças entre as idades em nenhuma das áreas analisadas (CA 1-2: Figura 14 $F_{(4,9)} = 0,71$; $P = 0,61$, CA3: Figura 15 $F_{(4,9)} = 1,15$; $P = 0,39$, GrDG: Figura 16 $F_{(4,9)} = 0,05$; $P = 0,99$ e PoDG: Figura 17 $F_{(4,9)} = 0,84$; $P = 0,53$). Observamos, na figura 18 as imagens provenientes dos ensaios imunohistoquímicos.

Figura 14 – Densidade da enzima ChAT nas células piramidais CA 1-2 nas diferentes idades.

Análise de densidade óptica relativa dos corte de hipocampo de ratos de diferentes idades. Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4.

Figura 15 - Densidade da enzima ChAT nas células piramidais CA 3 nas diferentes idades.

Análise de densidade óptica relativa dos corte de hipocampo de ratos de diferentes idades. Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4.

Figura 16 - Densidade da enzima ChAT nas células granulares do giro denteado (GrDG) nas diferentes idades.

Análise de densidade óptica relativa dos corte de hipocampo de ratos de diferentes idades. Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4.

Figura 17 - Densidade da enzima ChAT nas células polimórficas do giro denteado (PoDG) nas diferentes idades.

Análise de densidade óptica relativa dos corte de hipocampo de ratos de diferentes idades. Os histogramas e barras verticais representam as médias e erros-padrão. O número de animal utilizado por grupo foi 4.

Figura 18 – Fotomicrografias de hipocampus com marcações positivas para a enzima ChAT dos animais de diferentes idades.

Fotomicrografias de imunomarcações para ChAT do hipocampo de ratos de diferentes idades: a. 3 meses; b. 6 meses; c. 12 meses; d. 18 meses; e. 22 meses; f'. Ligações não específicas com ajuste no brilho e contraste da imagem, para melhor visualização; setas em f' e f'' sinalizando a localização do corte histológico; g. destaque para as marcações positivas na região CA 3; h. identificação das estruturas adaptado de Paxinos e Watson (2007).

4.6 Quantificação da densidade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico

A fim de determinar a quantidade ótima de proteínas a ser utilizada nos experimentos de *western-blotting* para detecção de acetilcolinesterase (AChE) e da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico, foram realizadas corridas de eletroforese com diferentes quantidades de proteína total de hipocampo dos animais do grupo de 12 meses.

Cada membrana desse ensaio foi incubada com um anticorpo diferente: anticorpo contra acetilcolinesterase (diluição 1:1000) e anticorpo contra a subunidade $\beta 2$ (diluição 1:2000). A partir dessa determinação, foi escolhida a quantidade de 25 μ g de proteínas totais para os experimentos subsequentes com as amostras de cada grupo etário.

Com relação a densidade relativa de AChE, não observamos diferença estatística entre os grupos ($F_{(4,18)} = 3,56$; $P = 0,08$, Figura 19). Da mesma maneira, os grupos etários não apresentaram diferença na densidade relativa da subunidade $\beta 2$ ($F_{(4,18)} = 0,33$; $P = 0,85$, Figura 20).

Figura 19 - Avaliação da densidade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de ratos.

Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, da ChAT usando a β tubulina como controle endógeno. (a) As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão. (b) Imagem representativa obtida em ensaio de *western blotting*. 3 meses: n=5; 6 meses: n=5; 12 meses: n=5; 18 meses: n=5 e 22 meses: n=3.

Figura 20 - Avaliação da densidade da subunidade $\beta 2$ do receptor nicotínico no hipocampo de ratos.

Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, da subunidade $\beta 2$ usando a β tubulina como controle endógeno. (a) As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão. (b) Imagem representativa obtida em ensaio de *western blotting*. 3 meses: n=5; 6 meses: n=5; 12 meses: n=5; 18 meses: n=5 e 22 meses: n=3.

5 DISCUSSÃO

Essa pesquisa intitulada “*Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos*” visa contribuir para a discussão dos possíveis mecanismos comportamentais e moleculares que circundam as temáticas envolvendo memória e envelhecimento. Trata-se de uma pesquisa experimental, com análises sob a ótica quantitativa.

Durante a última década, estudos relacionados aos mecanismos moleculares que se alteram e se adaptam ao longo do envelhecimento têm sido objeto de interesse dos cientistas. O fato do interesse nesse campo ser recente contribui para a falta de consenso a respeito das faixas etárias e as correspondentes fases do ciclo de vida dos ratos, por exemplo. Além disso, o termo “animal senil” vem sendo utilizado de forma generalizada, referindo-se tanto ao animal velho, com boa saúde, quanto àquele que apresenta alguma doença.

Arslan et al. (2010) consideram animais a partir de 12 meses como senis; para Freddi et al. (2008) os mesmos são compreendidos numa faixa entre 15 e 21 meses; Mallikarjuna et al. (2009) e Conboy et al. (2008) classificam como senis ratos com 18 meses; para Petcu et al. (2008), ratos com 20 meses; para Djeridane et al. (2005) animais com 22 meses; para Mármol et al. (2009) e Darmopil et al. (2009) são senis a partir de 24 meses, para Wu et al. (2009) os animais devem ter entre 27 e 28 meses e, finalmente, para Caspary et al. (2013) os animais devem apresentar entre 30 e 32 meses para receber tal denominação. Todos os animais “senis” descritos são animais sem nenhuma doença. Uma vez que não consideramos esse termo adequado, nessa pesquisa, os animais foram denominados “velhos”.

Acreditamos que a melhor forma de se estudar as modificações de um fenômeno ao longo do envelhecimento é avaliando o mesmo em diferentes faixas etárias. Corroborando com essa ideia, Coleman et al. (2004) publicaram, em um editorial da revista *Neurobiology of Aging*, explicações a respeito da importância e necessidade de desenhos experimentais sobre o envelhecimento com mais de duas idades, uma vez que o fenômeno precisa ser avaliado na sua integralidade. Dessa forma, estudar o processo em apenas duas idades, geralmente, pontos extremos, agregam poucas informações.

Como não existe um consenso em relação à faixa etária considerada “velha”, estudamos o comportamento e alterações moleculares de animais com até 22

meses de idade. Inicialmente, as faixas etárias experimentais propostas eram: 3, 6, 12, 18 e 24 meses. Todavia, devido à expressiva mortalidade dos ratos mais velhos, resolvemos adiantar os experimentos comportamentais dos animais que comporiam o grupo de 24 meses. Sendo assim, as faixas etárias utilizadas nessa pesquisa foram: 3, 6, 12, 18 e 22 meses de idade.

Nesse estudo, consideramos a idade de 12 meses como referência quando comparamos os dados de evocação de memória tanto de curta quanto de longa duração, assim como, as densidades de receptores nicotínicos e das enzimas estudadas. O envelhecimento deve ser considerado como um processo pelo qual o organismo se adapta às alterações morfofisiológicas que ocorrem. Reconhecemos que estabelecer uma idade como referência é considerar uma faixa etária como padrão fisiológico, situação inexistente no desenvolvimento de roedores ou de seres humanos. Nesse estudo, a idade 12 meses foi tida como referência, uma vez que as múltiplas comparações inviabilizariam as análises. Assim, reconhecemos que estabelecer 12 meses é uma limitação deste estudo e optamos por essa idade, visto que a grande maioria dos sistemas fisiológicos, nesta espécie, já se desenvolveu (Coleman et al., 2004).

O estudo comportamental da memória em roedores pode ser realizado utilizando-se diversos métodos, de acordo com o tipo de memória que se quer avaliar. Nessa pesquisa, avaliamos um comportamento relacionado à memória aversiva, a esquiva inibitória, devido à complexidade de eventos cerebrais envolvidos na sua aquisição e consolidação. Essa tarefa mobiliza, principalmente, hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex frontal (Tinsley et al., 2004). Segundo LeDoux (2003), projeções da amígdala para o córtex contribuem para a vivência do medo e outros aspectos cognitivos do processo emocional.

A tarefa de esquiva inibitória combina os pressupostos comportamentais atrelados ao condicionamento de medo Pavloviano (associação do choque ao compartimento escuro do equipamento) e às teorias “behavioristas” propostas por Skinner, no final do século XX, sendo, também, denominada de condicionamento instrumental ou operante (Ögren, Stiedl, 2010). Trata-se de uma forma de aprendizagem que é modulada por uma série de comportamentos inatos. O comportamento proveniente do estímulo inicial gera uma consequência, a qual afeta a probabilidade do comportamento ocorrer novamente (Gazzaniga, Heatherton, 2005).

Tinsley et al. (2004) elencam quatro razões para considerar o condicionamento aversivo como um modelo efetivo para o estudo dos efeitos colinérgicos nos processos de aprendizagem e memória. Os autores aludem aos déficits na memória produzidos por lesões em estruturas importantes para o desempenho na esquia inibitória, como amígdala e hipocampo. Abordam, como segundo aspecto, o fato de o condicionamento de medo ser aprendido rapidamente. Consideram, também, que a memória de medo, gerada por procedimentos de condicionamento aversivo, tende a ser muito estável durante um longo período de tempo. Finalmente, pontuam que o medo trata-se de um comportamento motivacional, o qual está envolvido na proteção do animal contra o perigo.

Em consonância com os autores acima, Orsini e Maren (2012) referem-se ao medo como o centro das organizações de comportamento de defesa e, ainda, como um mecanismo essencial à sobrevivência.

Ao submeter os animais a essa tarefa de memória, esperávamos que eles tivessem o comportamento de memória semelhante aos estudos com seres humanos, os quais aludem a um declínio gradual da memória em função do envelhecimento saudável (Yassuda et al., 2011).

Os animais foram expostos ao equipamento de avaliação de memória em dois momentos: sessão de aquisição (SA) e sessão de teste (ST) da memória de curta ou de longa duração (MCD e MLD, respectivamente). O protocolo para avaliação da MCD consistiu na repetição da tarefa de esquia inibitória 90 minutos após a SA, enquanto a avaliação da evocação de MLD foi realizada 24 horas após a primeira exposição do animal ao equipamento. É importante ressaltar que os animais submetidos aos testes de MCD e MLD não foram os mesmos. Segundo experiência prévia do nosso grupo, repetidas exposições dos ratos a um mesmo protocolo comportamental pode influenciar observações posteriores, como, por exemplo, comportamentos de extinção e de reforço à tarefa da esquia inibitória.

Na primeira exposição ao equipamento (SA) não observamos diferença significativa das latências entre as idades, tanto para os animais submetidos às tarefas de evocação de MCD, quanto para os de MLD. Esses dados nos permitem inferir que o padrão de resposta esperado ao equipamento de esquia (avidez ao ambiente escuro), nesse momento, foi mantido entre as diferentes idades.

Com relação à MCD, observamos diferenças significativas entre as latências da SA e de ST nos grupos de 3, 6 e 12 meses. Isso nos mostra que as habilidades

mnemônicas estavam preservadas mesmo no grupo de 12 meses, considerado velho por alguns autores, como Arslan et al., 2010. Por outro lado, os grupos com 18 e 22 meses não apresentaram diferença estatística entre suas SA e ST, mostrando que esses animais mais velhos já apresentam um comprometimento cognitivo.

Quando as evocações de MCD (ST) foram analisadas conjuntamente, caracterizando uma comparação ao longo do envelhecimento, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos; isso nos permite concluir que não há diferença na evocação da MCD com a idade. Squire e Kandel (2003) postulam três características que ajudam a esclarecer os mecanismos básicos de armazenamento de curta duração: 1) é transitório; 2) não necessita de alterações anatômicas para ser mantido; 3) não necessita de nova síntese proteica.

Essas características confirmam os achados de Izquierdo et al (2002), os quais asseguraram através de experimentos farmacológicos, que a MCD não inclui ativação de fatores de transcrição, expressão de genes ou síntese de proteínas, mas requer ativação de cascatas enzimáticas existentes. Sendo assim, esse tipo de memória não requer mudanças tão complexas nos substratos neurais das vias envolvidas, o que corrobora a similaridade nas latências de evocação nas diferentes faixas etárias.

Ao compararmos as medianas do tempo de permanência no lado claro, entre SA e ST de MLD, observamos que os grupos de 3, 6 e 12 meses de idade apresentaram diferença estatística significativa, ou seja, houve evocação dessa memória. O mesmo não foi observado nos grupo de 18 e 22 meses.

Esse achado comportamental alude ao que foi verificado na MCD, visto que os grupos até 12 meses mantêm os substratos necessários à formação, consolidação e evocação de memória. Em idades mais avançadas, entretanto, esses processos não estão preservados.

Com relação à comparação das latências de MLD nos cinco grupos experimentais, observamos diferença significativa nos desempenhos dos animais de 18 e 22 meses quando comparados aos animais de 12 meses, o que nos possibilita constatar que há um declínio na evocação da MLD com relação à idade dos ratos. Assim, esse “esquecimento” pode ser atribuído ao enfraquecimento na estimulação feita pelos ativadores de transcrição gênica e à incapacidade de reduzir a desativação dos mesmos (Squire, Kandel, 2003).

A fim de excluirmos a possibilidade dos resultados mnemônicos serem influenciados por déficits motores, os animais foram submetidos a uma avaliação da atividade locomotora. Observamos que os animais de 3 e 6 meses apresentaram uma deambulação maior que os animais de 12 meses. Não houve diferença entre as deambulações dos animais de 12, 18 e 22 meses. Os nossos resultados estão em conformidade com os dados da literatura, uma vez que há um declínio da atividade exploratória com o envelhecimento em espécies de roedores (Ingram, 2000² apud Anver, Haines, 2004). Esse declínio é, em parte, explicado por alterações no sistema dopaminérgico, tanto em termos de neurotransmissor quanto de receptores.

Os animais de 3 e 6 meses mostraram uma locomoção maior comparada aos animais mais velhos. Esses grupos apresentaram, também, uma maior permanência no lado claro do equipamento de esQUIVA tanto nas avaliações de MCD quanto de MLD. Assim, podemos concluir que esses grupos não passaram para o lado escuro porque se lembraram do choque que haviam recebido nas patas na sessão de aquisição. O mesmo não ocorreu com os animais mais velhos, que mesmo locomovendo-se menos que os animais mais jovens, passaram para o lado escuro com um tempo significativamente menor. Dessa forma, o fato de terem passado rapidamente e apresentarem um perfil locomotor menor reforça, ainda mais, o déficit de MLD com o envelhecimento.

Muitos trabalhos sugerem que as perdas mnemônicas relacionadas tanto com o envelhecimento normal, quanto com demências progressivas, como a Doença de Alzheimer (DA), correspondem à hipofunção do sistema colinérgico. Os neurônios do complexo colinérgico no prosencéfalo basal, principais projeções colinérgicas para o córtex e para o hipocampo, sofrem mudanças funcionais durante o envelhecimento, resultando assim, em déficits progressivos da memória (Hake, Farlow, 2001; Sclierbs, Arendt, 2006, 2011).

No presente trabalho, analisamos a distribuição e a densidade das subunidades $\alpha 7$ e $\beta 2$ no hipocampo. Os $\alpha 7$ nAChRs foram encontrados nas células piramidais (py) de CA3 e células polimórficas do giro denteado (PoDG). Já as subunidades $\beta 2$ não foram separadas com relação às camadas ou tipo celulares do hipocampo, pois realizamos um ensaio com o homogenato do hipocampo como um

²Ingram DK. Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. Med Sci Sports Exerc. 2000;32:1623-9.

todo. Também avaliamos as duas principais enzimas desse sistema, a responsável pela síntese e pela degradação da acetilcolina, ChAT e AChE respectivamente.

Os receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ modulam as funções cognitivas, visto que são proteínas essenciais para a transmissão sináptica (Arias, 1997; Clementi et al., 2000). Devido às evidências de participação desses receptores nos processos de memória, resolvemos investigar a densidade dos mesmos ao longo do envelhecimento e estabelecer possíveis relações com os resultados comportamentais observados.

Tribollet et al. (2004) compararam a distribuição de subtipos de receptores nicotínicos no envelhecimento, embora tenham restringido suas análises às fases extremas do ciclo de vida dos ratos, como: fase embrionária, adulta (2 meses de idade) e “meia-idade” (20 meses, segundo os autores) utilizando a técnica de radioautografia. Uma das conclusões desse estudo foi: “A expressão de receptores nicotínicos neuronais está inalterada em animais de meia idade, sugerindo que, em ratos, esses receptores não desempenham um papel importante no processo do envelhecimento” (tradução nossa, p.405).

Os autores propuseram análises ao longo do envelhecimento, embora para isso tenham apenas considerado idades praticamente extremas no ciclo de vida da espécie em estudo, no caso 2 e 20 meses. Nessas idades há intenso anabolismo e catabolismo celular, respectivamente, o que pode ter contribuído para essa conclusão. Além disso, não foram feitas análises em idades intermediárias às descritas, o que seria necessário para caracterizar um estudo ao longo do envelhecimento (Coleman et al., 2004).

No presente estudo, também, não houve diferença na densidade dos receptores nicotínicos nos extremos etários estudados, porém em idades intermediárias a distribuição foi significativamente diferente. Houve um aumento significativo de $\alpha 7$ AChRs em py CA3 nos animais de 18 e 22 meses comparado aos de 12 meses, assim como o aumento da densidade de receptores em PoDG no grupo com 22 meses.

Essas áreas, onde observamos marcação para esses receptores, são áreas importantes para o aprendizado de novas associações e, também, para a formação e a evocação da memória. Marcações positivas para $\alpha 7$ AChRs nas mesmas áreas cerebrais também foram apresentadas por Tribollet et al. (2004). O giro denteado é uma estrutura fundamental nesses processos mnemônicos, uma vez que o córtex

entorrinal e o septo medial destinam, quase, integralmente, suas projeções para as camadas molecular (MoDG) e polimórfica (PoDG) do giro denteado, respectivamente (Amaral et al., 2007).

Essas projeções excitatórias, em MoDG, atingem, principalmente, dendritos das células granulares e, também, interneurônios. O circuito continua até as células piramidais de CA 3, via conexões das células musgosas, principais tipos celulares de PoDG. Os neurônios de CA 3 fazem conexões com células de CA 1, as quais projetam-se através do subiculum para camadas mais profundas do córtex entorrinal (Amaral et al., 2007; Kesner, 2007; Martinez-Cabanal, 2013). Essas células musgosas, juntamente com os interneurônios GABAérgicos, exercem um controle local da excitabilidade das células granulares (Frazier et al., 2003). Estudos com microscopia eletrônica mostraram que projeções colinérgicas formam sinapses convencionais tanto com as células musgosas quanto com os interneurônios (Deller et al., 2003).

A função modulatória desses receptores $\alpha 7$ pode estar atrelada à estimulação dos interneurônios GABAérgicos, sendo que a ativação desses receptores permite o influxo de cálcio após a membrana ser despolarizada (Alkondon et al., 1997; Freedman et al., 1993; Wanaverbercq et al., 2007; Zago et al., 2006). Dessa forma, um aumento na densidade desses receptores poderia estar relacionado à estimulação GABAérgica, provocando, assim, o déficit observado nos animais mais velhos.

Por outro lado, esse aumento dos $\alpha 7$ nAChRs mencionado acima nos animais com 18 e 22 meses poderia ser uma estratégia de plasticidade do sistema colinérgico, uma vez que uma superexpressão de receptores poderia manter o comportamento de memória ou minimizar seus déficits, por meio da manutenção e melhora do LTP nas células glutamatérgicas excitatórias (Baraldi et al., 2013; Marchi et al., 2002; Viel et al., 2012). No envelhecimento, há modificações estruturais e essas podem estar relacionadas à diminuição de neurônios glutamatérgicos, ou mesmo de corpos celulares colinérgicos cerebrais e outros marcadores colinérgicos, os quais são essenciais para a MLD.

Analizamos, também, a subunidade de receptores nicotínicos $\beta 2$. Ao longo do envelhecimento não observamos aumento ou diminuição dessa subunidade. Esse resultado vai ao encontro dos dados disponíveis em literatura, uma vez que essas subunidades, presentes nos dendritos dos interneurônios hipocampais, atingem seu

maior nível durante as primeiras duas semanas de vida e depois há uma estabilização durante a vida adulta (Zhang et al., 1998). Não foram localizados estudos que abordassem essa subunidade no hipocampo de ratos mais velhos, embora a perda específica dos receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ tenha sido observada no córtex temporal de pacientes com doença de Alzheimer (Warpman, Nordberg, 1995³ apud Marchi et al., 2002).

Com relação às enzimas, não observamos diferença estatística na densidade de ChAT nas células de py CA 1-2, py CA 3, GrDG e PoDG. Assim, concluímos que, no hipocampo, a síntese de acetilcolina não se apresenta alterada com o envelhecimento dos ratos. Na literatura, encontramos trabalhos mostrando que a atividade da ChAT diminui com o envelhecimento nas regiões do estriado e do córtex (Zambrzycka et al., 2002). Estudo de suplementação de ChAT em ratos de 15-16 meses mostraram que houve uma melhora na evocação da memória, assim um aumento na síntese de acetilcolina pode ser efetivo na modulação dos processos de memória (Fu et al., 2005).

O papel da AChE como uma enzima catalítica é bem conhecido (Taylor, Radic, 1994), mas, além disso, a AChE está envolvida na proliferação, diferenciação e funcionamento de diversas células. Vários estudos compararam os níveis de AChE e de ChAT em diversas estruturas cerebrais e os autores constataram que em regiões sem projeções colinérgicas e baixos níveis de ChAT havia um alto nível de AChE, sinalizando que a participação da AChE não se restringe à degradação da ACh na fenda sináptica. Fazem menção, também, a estudos que correlacionaram a deposição de placas beta amiloides com níveis aumentados da AChE, essas placas estão associadas à doença de Alzheimer em seres humanos (Grisaru et al., 1999).

A densidade da AChE não se apresentou alterada com o envelhecimento, embora ao observarmos o gráfico percebemos uma curva em U e, provavelmente, se aumentarmos o número de amostras uma diferença estatística possa ser observada. O aumento de AChE nas idades mais avançada daria subsídios para explicar o déficit de MLD, pois uma menor disponibilidade de ACh nas fendas sinápticas estimularia menos a transmissão das informações e, conseqüentemente, a evocação da memória. Além das possíveis relações da AChE com a deposição de

³ Warpman U, Nordberg A. Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport*. 1995;6:2419-23.

beta amiloide nos animais mais velhos. O mesmo aumento nas idades mais jovens poderia ser relacionado ao intenso anabolismo observado nessas idades.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção da memória para o indivíduo e para as sociedades é indispensável para construção da história e da identidade, além de ser uma estratégia que possibilita a evolução das espécies, garantindo assim, a sobrevivência.

As modificações cognitivas fisiológicas são inerentes ao processo do envelhecimento. Nessa pesquisa, observamos, em animais com 18 e 22 meses de idade, um déficit na MLD e aumento significativo da densidade de $\alpha 7$ AChRs no hipocampo, nas células piramidais de CA 3 e nas células polimórficas do giro denteado (PoDG) em comparação aos animais de 12 meses. Não observamos diferença significativa nos outros marcadores colinérgicos avaliados: subunidade $\beta 2$ dos receptores nicotínicos; colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE).

Diante desses resultados, podemos sugerir dois possíveis mecanismos para explicar a redução na evocação da MLD dos animais de 18 e 22 meses acompanhada do aumento na densidade de $\alpha 7$ AChRs no hipocampo: 1) uma estratégia adaptativa do envelhecimento (plasticidade colinérgica), a fim de minimizar as perdas morfofuncionais decorrentes desse processo, uma vez que esses receptores modulariam o sistema excitatório glutamatérgico ou 2) uma modulação nos interneurônios GABAérgicos desencadeando, assim, uma inibição no processamento da informação e o declínio observado da memória.

Isto posto, essas análises contribuem para o entendimento da participação do sistema colinérgico nos processos de memória de medo, além de fornecer dados que abordam diferentes fases do ciclo de vida dos ratos, privilegiando assim, o processo de envelhecimento na sua integralidade.

Outros estudos podem contribuir para essa caracterização colinérgica, como a ampliação das áreas cerebrais estudadas: amígdala (importante área para a formação da memória de medo) e córtex pré-frontal (área associativa e mobilizada na evocação da memória). Avaliações de marcadores de vesículas de acetilcolina (VACHT) e, também, marcadores do transportador de acetilcolina dependente de sódio (ChT) podem ser interessantes como possíveis alvos farmacêuticos. Além disso, colocalizações entre receptores nicotínicos e marcadores do sistema GABAérgico e/ou glutamatérgico contribuiriam para o entendimento da modulação

colinérgica ao longo do envelhecimento, especificamente, nas células polimórficas do giro denteado.

REFERÊNCIAS⁴

- Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:1396-411.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22.
- Anver Mr, Haines DC. Gerontology. In: Hedrich H, editor. *The laboratory mouse*. London: Elsevier; 2010. 600 p.
- Arias HR. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Rev*. 1997;25:133-91.
- Arslan M, Ozkose Z, Akyol G, Barit G. The age- and gender-dependent effects of desflurane and sevoflurane on rat liver. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62:35-43.
- Arthur D, Levin ED. Chronic inhibition of alpha4beta2 nicotinic receptors in the ventral hippocampus of rats: impacts on memory and nicotine response. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;160:140-5.
- Baraldi T, Schöwe NM, Balthazar J, Monteiro-Silva KC, Albuquerque MS, Buck HS, Viel TA. Comparison of cognitive stimulation during life-time and during the elderly: effects on spatial memory, on neuroplasticity and on cholinergic markers of mice. *Exp Gerontol*. 2013;48:831-8.
- Barros MD, Ramirez MR, Dos Reis EA, Izquierdo I. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*. 2004;126:651-6.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. 855 p.
- Bellucci A, Luccarini I, Scali C, Prosperi C, Giovannini MG, Pepeu G, Casamenti F. Cholinergic dysfunction, neuronal damage and axonal loss in TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis*. 2006;23:260-72.
- 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.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

⁴ 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>

Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB. Nicotinic acetylcholine receptors signaling: roles in Alzheimer's disease and amyloid protection. *Pharmacol Rev.* 2009;61:39-61.

Camarano AA, Kanso S, Mello JL. Como vivem os idosos brasileiros? In: Camarano AA, editor. *Os novos idosos brasileiros muito além dos 60?* Rio de Janeiro: IPEA; 2004. 604 p.

Cammarota M, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I. Studies of short-term avoidance memory. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: from genes to brain imaging.* Boca Raton (FL): CRC Press; 2007.

Cammarota M, Bevilaqua LRM, Izquierdo I. Aprendizado e memória. In: Lent R, editor. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 356 p.*

Caspary DM, Hughes LF, Ling LL. Age-related GABA_A receptor changes in rat auditory cortex. *Neurobiol Aging.* 2013;34:1486-96.

Charchat-Fichman H, Caramelli P, Sameshima K, Nitrini R. Declínio da capacidade cognitiva durante o envelhecimento. *Rev Bras de Psiquiatr.* 2005;27:79-82.

Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology.* 2006;50:254-68.

Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from structure to therapeutics. *TIPS.* 2000;21:35-7.

Coleman P, Finch C, Joseph J. The need for multiple time points in aging studies. [editorial] *Neurobiol Aging.* 2004;25:3-4.

Conboy L, Foley AG, O'Boyle NM, Lawlor M, Gallagher HC, Murphy KJ, Regan CM. Curcumin-induced degradation of PKC delta is associated with enhanced dentate NCAM PSA expression and spatial learning in adult and aged Wistar rats. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:1254-65.

Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:699-729.

Darmopil S, Petanjek Z, Mohammed AH, Bogdanovic N. Environmental enrichment alters dentate granule cell morphology in oldest-old rat. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1845-56.

Deller T, Katona I, Cozzari C, Frotscher M, Freund TF. Cholinergic innervation of mossy cells in the rat fascia dentata. *Hippocampus.* 1999;9:314-20.

Djeridane Y, Charbuy H, Touitou Y. Old rats are more sensitive to photoperiodic changes. A study on pineal melatonin. *Exp Gerontol.* 2005;40:403-8.

Esperidião-Antonio V, Majeski-Colombo M, Toledo-Monte Verde D, Moraes-Martins G, Fernandes JJ, Assis MB, Siqueira-Batista R. Neurobiologia das emoções. *Rev Psiq Clín.* 2008;35:55-65.

Frazier CJ, Strowbridge BW, Papke RL. Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability. *J Neurophysiol.* 2003;89:3018-28.

Freddi R, Duca P, Gritti I, Mariotti M, Vertemati M. Behavioral and degeneration changes in the basal forebrain systems of aged rats: A quantitative study in the region of the basal forebrain after levo-acetyl-carnitine treatments assessed by Abercrombie estimation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:419-26.

Freedman R, Wetmore C, Strömberg I, Leonard S, Osion L. Alpha-bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. *J Neurosci.* 1993;13:1965-75.

Fu AL, Huang SJ, Sun MJ. Complementary remedy of aged-related learning and memory deficits via exogenous choline acetyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:268-73.

Fujii S, Ji, Z, Morita N, Sumikawa K. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. *Brain Res.* 1999;846:137-43.

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

Gazzaniga MS, Heatherton TF. *Ciência psicológica: mente, cérebro e comportamento.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 624 p.

German DC, Yazdani U, Speciale SG, Pasbakhsh P, Games D, Liang CL. Cholinergic neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 2003;462:371-81.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem.* 1999;264:672-86.

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

Hernandez D, Sugaya K, Qu T, McGowan E, Duff K, McKinney M. Survival and plasticity of basal forebrain cholinergic systems in mice transgenic for presenilin-1 and amyloid precursor protein mutant genes. *Neuroreport.* 2001;12:1377-84.

Hogan DB, Patterson C. Treatment of Alzheimer's disease and other dementias - review and comparison of the cholinesterase inhibitors. *Can J Neurol Sci.* 2002; 29:306-14.

Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol.* 2010;189: 619–29.

Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed; 2002. 96 p.

Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22:269-87.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formations, the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68:285-316.

Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica*. 10. ed. Alegre: AMGH Editora; 2010. 1045 p.

Kesner RP. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem.* 2007;14:771-81.

Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30:188-202.

LeDoux J. The emocional brain, fear and amygdala. *Cel and Mol Neurobiol.* 2003;81: 179-209.

Lent R. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências*. São Paulo: Ed Atheneu; 2004. 698 p.

Li H, Shen X. Selective loss of basal forebrain cholinergic neurons in APP770 transgenic mice. *Chin Med J (Engl).* 2000;113:1040-2.

Machado A. *Neuroanatomia Funcional*. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2006. 363 p.

Mallikarjuna K, Nishanth K, Hou CK, Kuo CH, Sathyavelu Reddy K. Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats. *Acohol.* 2009;43:59-64.

Marchi M, Risso F, Viola C, Cavazzani P, Raiteri M. Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J Neurochem.* 2002;80:1071-8.

Mármol F, Sánchez J, López D, Martínez N, Mitjavila MT, Puig-Parellada P. Oxidative stress, nitric oxide and prostaglandin E(2) levels in the gastrointestinal tract of aging rats. *J Phamacol.* 2009;61:2001-6.

Martí Barros D, Ramirez MR, Dos Reis EA, Izquierdo I. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience.* 2004;126:651-6.

Martinez-Canabal A. The dentate gyrus of the hippocampus: roles of transforming growth factor beta1 (TGF β 1) and adult neurogenesis in the expression of spatial

memory [Ph. D. thesis]. Toronto: Institute of Medical Science University of Toronto, 2013.

Matsuyama S, Matsumoto A. Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs essential to nicotinic LTP. *J Pharmacol Sci.* 2003;93:180-7.

McGehee DS, Role LW. Neurobiology: memories of nicotine. *Nature.* 1996;383:670-1.

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

Nashmi R, Lester HA. CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J Mol Neurosci.* 2006;30:181-4.

Niewiadomska G, Baksalerske-Pazera M, Riedel G. The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33:791-805.

Nott A, Levin ED. Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and memory. *Brain Res.* 2006;1081:72-8.

Ögren SO, Stiedl O. Passive Avoidance. In: Stolerman I. editor. *Encyclopedia of psychopharmacology.* Berlin: Springer; 2010. 1434 p.

Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36:1773-802.

Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev.* 2004;3:407-30.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th ed. San Diego: Academic Press; 2007. 456 p.

Petcu EB, Sfredel V, Platt D, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review. *Gerontol.* 2008;54:6-17.

Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, Parent A, White N, Meaney MJ. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M2-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired rats. *J Neurosci.* 1995;15:1455-62.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia.* 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 848 p.

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.

Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*. 1996;16:1077-85.

Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006;113:1625-44.

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 2011;221:555-63.

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

Squire LR, Kandel ER. Memória: da mente às moléculas. Porto Alegre: Artmed; 2003. 251 p.

Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994;34:281-320.

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

Tribollet E, Bertrand D, Marguerat A, Raggenbass M. Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience*. 2004;12:405–20.

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

Vaucher E, Aumont N, Pearson D, Rowe W, Poirier J, Kar S. Amyloid β peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and unimpaired rats. *J Chem Neuroanat*. 2001;21:323-9.

Wanaverbecq N, Semvanov A, Pavlov I, Walker MC, Kullmann DM. Cholinergic axons modulate GABAergic signaling among hippocampal interneurons via post synaptic $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurosci*. 2007;27:5683-93.

Wevers A, Schröder H. Nicotinic Acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 1999;1:207-19.

Wonnacott S, Barik J, Dickinson J, Jones IW. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J Mol Neurosci*. 2006;30:137-40.

Wu M, Desai DH, Kakarla SK, Katta A, Paturi S, Gutta AK, Rice KM, Walker EM Jr, Blough ER. Acetaminophen prevents aging-associated hyperglycemia in aged rats: effect of aging-associated hyperactivation of p38-MAPK and ERK 1/2. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:279-86.

Yassuda MS, Viel TA, Lima-Silva TB, Albuquerque MS. Memória e Envelhecimento: Aspectos Cognitivos e Biológicos. In: Freitas EV, Py L, Neri AL – editoras. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. 1750 p.

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

Zago WM, Massey KA, Berg DK. Nicotinic activity stabilizes convergence of nicotinic and GABAergic synapses on filopodia of hippocampal interneurons. *Mol Cell Neurosci*. 2006;31:549-59.

Zambrzycka A, Alberghina M, Strosznajder JB. Effects of aging and amyloid-beta peptides on choline acetyltransferase activity in rat brain. *Neurochem Res*. 2002;27:277-81.

Zanardi A, Leo G, Biagini G, Zoli M. Nicotine and neurodegeneration in ageing. *Toxicol Letters*. 2002;127:207-15.

Zhang X, Liu C, Miao H, Gong ZH, Nordberg A. Postnatal changes of nicotinic acetylcholine receptor alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7 and beta 2 subunits genes expression in rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 1998;16:507-18.

ANEXO - Protocolo de neutralização e inativação do DAB⁵

Embora o hipoclorito seja comumente usado em muitos laboratórios como um procedimento de neutralização, ele não é efetivo na remoção das propriedades mutagênicas do DAB. No entanto, o procedimento utilizando permanganato de potássio e ácido sulfúrico é um efetivo neutralizador do componente tóxico.

1) Misture quantidades da solução de DAB tetrahidrocloreto desidratado em água e quantidades de DAB base livre em 0,1 M de ácido clorídrico, de modo que a concentração de DAB não exceda 0,9 mg/mL. Dilua as soluções com o mesmo tampão se necessário, mas a concentração da solução não deve exceder 0,9 mg/mL.

2) Para cada 10 mL da solução, adicione 5 mL de 0,2 M de solução de permanganato de potássio (31,6 g de KMnO_4 por litro de solução com água) e 5 mL de 2 M de solução de ácido sulfúrico (112 mL H_2SO_4 concentrado por litro solução com água).

3) Deixe essa mistura em repouso por, no mínimo, 10 horas.

4) Para confirmar se a solução foi neutralizada, confira o pH. Esse deve estar entre 6 e 9. Descarte a solução na pia com grande quantidade de água.

⁵ Protocols Online. Current and new protocols for life science research. [Internet]. Available from: <http://protocolsonline.com/recipes/stock-solutions/neutralization-of-dab/> (tradução e adaptação nossa)