NATÁLIA MENDES SCHÖWE

**Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e
associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração
por infusão crônica de β -amiloide**

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

São Paulo
2018

NATÁLIA MENDES SCHÖWE

**Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e
associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração por infusão
crônica de β -amiloide**

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

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel.

Versão original.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mendes Schöwe, Natália

Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração por infusão crônica de β -amiloide / Natália Mendes Schöwe; orientadora Tânia Araújo Viel. -- São Paulo, 2018.

96 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neurodegeneração. 2. Lítio em microdose . 3. Rivastigmina.
4. Doença de Alzheimer. 5. Neuroproteção. I. Araújo Viel, Tânia.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Mendes Schöwe

Título da Tese: Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração por infusão crônica de β -amiloide

Orientador: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

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 90 nas fls. 22 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Tania Araújo Viel**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração por infusão crônica de beta-amiloide*" do qual participam o(s) aluno(s) **Natália Mendes Schöwe**, **Milena Telles** e o pesquisador Colaborador **Hudson de Sousa Buck**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **18.08.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

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

AGRADECIMENTOS

Chegamos, então, ao final dessa caminhada. Quatro anos intensos, de muito trabalho e muito aprendizado, que moldaram, profissional e pessoalmente, a pessoa que aqui escreve. Obviamente, não andei sozinha. Por isso, agradeço várias pessoas e instituições, que me acompanharam e me deram suporte e abrigo em cada etapa.

À minha orientadora, Tânia, que caminha comigo há anos, desde a iniciação científica, e me guiou até aqui.

Ao Hudson, meu co-orientador não formal, que também me guiou e abriu as portas do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP, onde passei a maior parte desses anos.

À Julie K. Andersen, que desde o primeiro contato, confiou em mim e me recebeu de braços abertos em seu laboratório.

Aos funcionários do biotério da FCMSCSP, por toda a atenção comigo e com meus animais.

À equipe da Julie, Shankar Chinta, OvsAnna Movsesyan, Minna Schmidt e, em especial, à Georgia Woods, que me orientou com os experimentos de imunofluorescência, e ao Anand Rane e Subramanian Rajagopalan, research associate e lab manager do laboratório, que me receberam não só no laboratório, mas também em suas vidas. Agradeço por cada conversa, conselho e abraço.

À Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, que abriu as portas de seu laboratório para eu aprender a fazer cultura de células, e ao Nilton, seu aluno de doutorado, na época, que gentil e pacientemente dividiu seu tempo comigo.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Neurofarmacologia e Envelhecimento, Ariadiny, Arthur, Alessandra, Bruna, Helena, Isabella, Guilherme, Sebastiana, Marcella, Mariana, Marielza e Ticiania. O que seria da vida científica se não fossem

esses companheiros para dividir a bancada, trabalhar cantando e sorrindo (e chorando, às vezes...)?

À Marília e à Káris, especialmente, minhas amigas do coração, que estiveram presentes na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, até que a defesa [não] nos separe!!!

Ao Rodrigo, meu namorado, amigo e companheiro, por toda a paciência e compreensão, principalmente em tempos de loucura.

À minha mãe, minha tia Marisa e meu tio Cláudio, por todo o suporte, fundamental para que essa etapa se concretizasse.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, onde foi realizada a maior parte desse trabalho.

Ao Buck Institute for Research on Aging (Novato, CA, EUA), que me recebeu durante seis meses para a realização do período sanduíche.

À CAPES, pelo suporte financeiro por meio de uma bolsa proveniente de Cota Institucional e por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (processo nº 88881.135498/2016-01).

RESUMO

SCHÖWE, N. M. Avaliação de mecanismos de prevenção e tratamento com microdose de lítio e associação com rivastigmina em modelo de neurodegeneração por infusão crônica de β -amiloide. 2018. 96 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência na população idosa mundial. O tratamento de primeira escolha em pacientes com DA de grau leve a moderado é com anticolinesterásicos, que promovem modesta melhora cognitiva. Trabalhos mostram que o lítio também possui efeito benéfico para o tratamento da DA e que é ainda mais eficaz se utilizado como prevenção dos sintomas de demência, mesmo em doses mais baixas que as terapêuticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de uma microdose de lítio em associação com um anticolinesterásico, para a memória e neuroproteção em modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneração induzida com o peptídeo βA_{1-40} . Em culturas organotípicas de hipocampo de camundongos c57Bl/6 de 12 meses de idade, foi observado aumento significativo da morte neuronal após incubação de βA (10 $\mu g/mL$). O tratamento com 10 μM de lítio protegeu as fatias de hipocampo da morte celular, independente do tratamento com rivastigmina. O tratamento das fatias com lítio não alterou a atividade da acetilcolinesterase, diferente do observado com rivastigmina, porém, houve aumento não significativo da densidade de BDNF, em relação às fatias não tratadas. Para os estudos *in vivo*, camundongos C57Bl/6 machos de 10 meses de idade foram submetidos a três sessões de aquisição de memória em esQUIVA ativa (EA) e, em seguida, à cirurgia estereotáxica para implante de minibomba osmótica contendo veículo ou βA (0,46 nmol). No dia seguinte, iniciou-se o tratamento com rivastigmina (Riv; 0,3 mg/kg/dia). Formaram-se 5 grupos: veículo, βA , Li, Riv e Li+Riv. Os grupos tratados com lítio receberam o fármaco (0,3 mg/kg/dia) desde os 2 meses de idade e o tratamento foi mantido até o final dos experimentos. Todos os grupos tratados com Li e/ou Riv foram infundidos com βA . O grupo veículo foi tratado com água. Os animais passaram por dois testes em EA, aos 7 e 35 dias após a cirurgia; a partir do 28º dia, foram realizadas avaliações de atividade motora e de memória de curta duração, utilizando-se caixa de atividade motora e teste de reconhecimento de objeto novo, respectivamente. Observou-se que o grupo βA apresentou perda de memória em EA

e no teste de reconhecimento de objeto novo, quando comparado ao grupo veículo. Nenhum dos tratamentos, no entanto, foi eficaz em prevenir esse prejuízo ou promover melhora no desempenho dos animais nos testes de memória. Não houve formação de placas amiloides em nenhum dos grupos, avaliada por meio da coloração com tioflavina S, sugerindo que o prejuízo cognitivo observado foi devido à forma solúvel do peptídeo. O peptídeo β A induziu o processo autofágico no grupo β A, verificado pelo aumento da formação de autofagossomos (avaliados por LC3-II) e níveis inalterados de p62 em relação ao veículo. Os tratamentos promoveram uma diminuição não significativa de autofagia, em relação ao grupo β A. Dados os resultados *in vivo* e *in vitro*, concluiu-se que ambos os fármacos, em monoterapia, promovem efeitos benéficos, porém, quando associados, os efeitos são perdidos.

Palavras-chave: Neurodegeneração. Lítio em microdose. Rivastigmina. Doença de Alzheimer. Neuroproteção.

ABSTRACT

SCHÖWE, N. M. Evaluation of mechanisms of prevention and treatment with lithium microdosis and association with rivastigmine in a neurodegeneration model by chronic infusion with amyloid- β . 2018. 96 f. Thesis (Ph. D. thesis in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia in the elderly. The first-choice treatment for patients with mild to moderate AD is a cholinesterase inhibitor, which leads to a modest cognitive improvement. Previous studies have shown that lithium also has a beneficial effect for the treatment of AD, but more effective if used to prevent the symptoms of dementia, even at lower doses than the therapeutic ones. The objective of this work was to evaluate the effect of a lithium microdose in association with a cholinesterase inhibitor on memory and neuroprotection in both *in vivo* and *in vitro* models of neurodegeneration induced by βA_{1-40} peptide. By using organotypic culture of hippocampus of 12-month-old c57Bl/6 mice, it was verified a significant increase in neuronal death after incubation with βA (10 μ g/ml). Treatment with 10 μ M lithium protected the hippocampal slices from cell death, independently of rivastigmine. Treatment with lithium in slices did not alter acetylcholinesterase activity, different from that observed with rivastigmine, however, there was a non-significant increase in BDNF density, in relation to untreated slices. For the *in vivo* evaluation, 10-month-old male C57Bl/6 mice underwent three sessions of active avoidance memory acquisition (AA) and then, stereotactic surgery for the implant of an osmotic minipump containing vehicle or βA (0.46 nmol). At the next day, the treatment with rivastigmine (Riv, 0.3 mg/kg/day) was started. Five groups were formed: vehicle, βA , Li, Riv and Li+iv. The lithium-treated groups received the drug (0.3 mg/kg/day) from 2 months of age and the treatment was kept until the end of the experiments. All drug-treated groups were infused with βA . Vehicle group was treated with water. The animals underwent two tests in AA: at 7 and 35 days after surgery; from the 28th day, motor activity and short-term memory evaluations were performed, using a motor activity cage and the novel object recognition test, respectively. βA group presented memory loss in AA and in the novel object recognition test when compared to vehicle group. None of the treatments, however, was effective in preventing this injury or promoting improvement in the performance of the animals in memory tests. There was no amyloid plaque

formation in any of the groups, which was evaluated by thioflavin S staining, suggesting that the observed cognitive impairment was due to the soluble forms of the peptide. β A peptide induced autophagic process in β A group, as evidenced by an increase in formation of autophagosomes (assessed by LC3-II) and unaltered levels of p62 when compared to vehicle group. The treatment with Li and Riv promoted a non-significant decrease of autophagy, in relation to β A group. Together, the results suggest that the drugs promote beneficial effects when used in monotherapy, however, when associated, the effects are no longer observed.

Keywords: Neurodegeneration. Lithium microdose. Rivastigmine. Alzheimer's disease. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Clivagem da APP.....	18
Figura 2 – Vias de sinalização em que o lítio atua.....	24
Figura 3 – Delineamento experimental.....	34
Figura 4 – Representação do posicionamento da minibomba osmótica em um camundongo.....	37
Figura 5 – Imagem ilustrativa da esquiva ativa.....	38
Figura 6 – Avaliação da morte celular induzida por βA_{1-40} em cultura organotípica..	46
Figura 7 – Avaliação da morte celular em cultura organotípica após tratamento com rivastigmina.....	47
Figura 8 – Avaliação da morte celular em cultura organotípica após tratamento com diferentes concentrações de lítio.....	48
Figura 9 – Avaliação da morte celular induzida por βA em cultura organotípica após o tratamento com lítio, rivastigmina ou associação.....	50
Figura 10 – Dosagem de BDNF em cultura organotípica de hipocampo.....	51
Figura 11 – Atividade da enzima AChE em cultura organotípica de hipocampo.....	52
Figura 12 – Registro do consumo de água ao longo dos oito meses de pré-tratamento, com água ou lítio.....	53
Figura 13 – Consumo de água, água com lítio, rivastigmina ou ambos ao longo das 4 semanas de infusão de veículo ou βA	54
Figura 14 – Avaliação da atividade motora em camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40} e tratados com lítio, rivastigmina ou ambos.....	55
Figura 15 – Aprendizagem dos camundongos em esquiva ativa após pré-tratamento com água ou lítio por 8 meses.....	56
Figura 16 – Avaliação da memória de longa duração de camundongos em esquiva ativa.....	57
Figura 17 – Avaliação da memória de curta duração pelo teste de reconhecimento de objeto novo.....	58
Figura 18 – Avaliação da morte neuronal no hipocampo e CPF de camundongos..	60
Figura 19 – Imagens representativas da imunomarcção para corpos neuronais no hipocampo de camundongos.....	61

Figura 20 – Imagens representativas da imunomarcaco para corpos neuronais no CPF de camundongos.....	62
Figura 21 – Avaliaco da densidade sinptica no hipocampo e CPF de camundongos.....	63
Figura 22 – Imagens representativas da imunomarcaco para sinaptofisina no hipocampo de camundongos.....	64
Figura 23 – Imagens representativas da imunomarcaco para sinaptofisina no CPF de camundongos.....	64
Figura 24 – Imagens representativas da coloraco para placas amiloides no hipocampo de camundongos infundidos com veculo ou βA_{1-40}	65
Figura 25 – Avaliaco da formaco de punctas de LC3 no hipocampo de camundongos infundidos com veculo ou βA_{1-40}	66
Figura 26 – Avaliaco da formaco de punctas de p62 no hipocampo de camundongos infundidos com veculo ou βA_{1-40}	66
Figura 27 – Avaliaco da formaco de punctas de LC3 e p62 no CPF de camundongos infundidos com veculo ou βA_{1-40}	67
Figura 28 – Avaliaco dos marcadores de autofagia no hipocampo de camundongos infundidos com βA_{1-42}	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Doença de Alzheimer</i>	15
1.2	<i>A hipótese colinérgica para a DA</i>	19
1.3	<i>O lítio como tratamento para a DA</i>	21
1.4	<i>O lítio e o sistema colinérgico</i>	26
1.5	<i>O lítio e a autofagia</i>	26
2	HIPÓTESE	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	<i>Geral</i>	30
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	<i>Estudos “in vitro”</i>	31
4.1.1	<i>Cultura organotípica de hipocampo de camundongos C57Bl/6</i>	31
4.1.2	<i>Dosagem de BDNF</i>	32
4.1.3	<i>Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase</i>	33
4.2	<i>Estudos “in vivo”</i>	33
4.2.1	<i>Delineamento experimental</i>	33
4.2.2	<i>Animais</i>	35
4.2.3	<i>Tratamentos</i>	35
4.2.4	<i>Registro do consumo de água</i>	36
4.2.5	<i>Cirurgia para implante de minibombas osmóticas</i>	36
4.2.6	<i>Avaliação da memória de longa duração</i>	37
4.2.7	<i>Avaliação da memória de curta duração</i>	38
4.2.8	<i>Avaliação da atividade motora</i>	39
4.2.9	<i>Perfusão transcardíaca, extração dos cérebros e preparo dos cortes histológicos</i>	39
4.2.10	<i>Imunohistoquímica para avaliação de corpos neuronais e sinapses</i>	40
4.2.11	<i>Imunofluorescência para avaliação de proteínas relacionadas ao processo autofágico</i>	41
4.2.12	<i>Aquisição de imagens</i>	42
4.2.13	<i>Análise de imagens</i>	42

4.2.14	<i>Coloração com Tioflavina S para identificação de placas amiloides</i>	43
4.2.15	<i>Western blot para avaliação de proteínas relacionadas ao processo autofágico</i>	44
4.2.16	<i>Análise estatística</i>	45
5	RESULTADOS	46
5.1	<i>Efeitos do tratamento com microdose de lítio para neuroproteção</i>	46
5.2	<i>Dosagem de BDNF</i>	51
5.3	<i>Avaliação da atividade da acetilcolinesterase</i>	51
5.4	<i>Consumo de água com lítio</i>	52
5.5	<i>Consumo de água durante os tratamentos</i>	53
5.6	<i>Avaliação da atividade motora</i>	54
5.7	<i>Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o desempenho em tarefas de memória</i>	55
5.8	<i>Densidade de corpos neuronais e sinapses</i>	58
5.9	<i>Identificação de placas amiloides</i>	65
5.10	<i>Efeitos do tratamento com microdose de lítio sobre os marcadores de autofagia</i>	65
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o XII Censo Demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2010 a população idosa brasileira era de 20,6 milhões de habitantes, o que corresponde a 11% da população total (IBGE, 2010). A projeção desse Instituto e de outros é que esse número cresça para 14% até 2030. Com o aumento da quantidade de anos vividos, entretanto, aumentam-se a incidência e prevalência de doenças crônicas e degenerativas, as quais têm como principal fator de risco a idade avançada. A doença de Alzheimer (DA) é uma dessas doenças e resulta em um processo demencial que, com sua evolução, leva à incapacidade de realização das atividades diárias, pois compromete a autonomia e a independência do indivíduo.

1.1 *Doença de Alzheimer*

A DA é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes na população idosa. Não se conhece, ainda, sua etiologia, porém, sabe-se que múltiplos fatores podem aumentar o risco para DA. Entre estes estão os fatores genéticos e, portanto, não modificáveis, como a presença do alelo APOE4, por exemplo, e os fatores ambientais, como a baixa estimulação cognitiva (pessoas de baixa escolaridade podem ser mais suscetíveis), o sedentarismo, o tabagismo, doenças vasculares, entre outros (revisado por JIANG et al., 2013).

De acordo com os critérios da Academia Brasileira de Neurologia, a DA pode ser diagnosticada como possível, provável ou definida. A DA possível é caracterizada por prejuízo em pelo menos dois domínios cognitivos, sejam estes amnésicos (relacionados à memória) ou não, como linguagem, domínio visual-espacial e funções executivas. Este diagnóstico não deve ser aplicado na presença de doença cerebrovascular, características centrais de demência frontotemporal ou com corpos de Lewy e quando o paciente está sob uso de medicamento com efeito sobre a cognição. No segundo caso, DA provável, o paciente apresenta características da demência de DA, mas também apresenta outras características que podem confundir o diagnóstico, como evidências de outras etiologias, início abrupto e/ou evolução rápida e informações insuficientes a respeito do início e evolução da doença. A DA

definida se baseia nos mesmos critérios da anterior e se complementa com exame patológico *post mortem* (FROTA et al., 2011).

No Brasil, ainda não há dados epidemiológicos da DA referentes à toda população, entretanto, alguns estudos populacionais regionais e de registros de caso contribuem com algumas sinalizações. Nitrini et al. (2004) verificaram que, na cidade de Catanduva, as taxas de incidência de demência e DA foram de 13,8 e 7,7, respectivamente, a cada 1000 pessoas com 65 anos e mais. Em 2008, Bottino e colaboradores avaliaram a prevalência de demência em uma amostra da cidade de São Paulo e estimaram que esta seria de 12,9%, dos quais 59,8% se referiam especificamente à doença de Alzheimer.

Histologicamente, a DA se caracteriza pela presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares nas regiões do hipocampo e córtex cerebral (GOREVIC et al., 1986; BUSCIGLIO et al., 1993; ALONSO et al., 1996). As placas senis são agregados de peptídeo β -amiloide (βA), derivado de clivagens sequenciais da proteína precursora de amiloide (APP) (SELKOE, 1994). A função fisiológica dessa proteína tem sido bastante estudada, mas ainda não se sabe exatamente seu papel. Tem-se sugerido que a APP atue no crescimento neuronal e sinaptogênese, tráfego de proteína ao longo do axônio e transdução de sinal, entre outros (ZHENG, KOO, 2006; JUNG, HERMS, 2011; MÜLLER et al., 2017).

A clivagem da APP (Figura 1) pode ocorrer, inicialmente, por três enzimas: η -, α - e β -secretase. A via da η -secretase, recentemente descrita (WILLEM et al., 2015), leva à liberação de dois peptídeos, o APPs η e o APPs α ou APPs β , de acordo com a clivagem subsequente, pela α - ou β -secretase. Não existem, até o momento, muitas informações sobre os fragmentos liberados por esse processamento da APP. Porém, neste mesmo trabalho, os autores mostraram que o acúmulo de CTF η (*C terminal fragment*) resultou em diminuição da potenciação de longa duração (LTP), mecanismo pelo qual acredita-se que as memórias sejam formadas. Ou seja, quando desbalanceada, essa via pode levar a prejuízo da formação de memórias.

A α -secretase age dentro do domínio βA (fragmento vermelho, Figura 1), dividindo-o, o que resulta na liberação de um peptídeo solúvel (APPs α) que exerce um papel neuroprotetor contra a excitotoxicidade e também na plasticidade neuronal (FURUKAWA et al., 1996; MATTSON, 1997). Em seguida, o domínio restante da APP

é clivado pela γ -secretase e ocorre a liberação de um segundo peptídeo, menor, o p3, cujo papel não está bem estabelecido (HAN et al., 2011; THINAKARAN, KOO, 2008). Esta é a via não amiloidogênica do processamento da APP. A β -secretase, por sua vez, age em um sítio de clivagem anterior ao domínio βA , liberando, assim, o peptídeo solúvel APPs β . Quando a γ -secretase cliva o fragmento restante, o domínio βA é liberado inteiro, podendo ter 40 ou 42 aminoácidos, que são os peptídeos βA_{1-40} e βA_{1-42} , respectivamente. Estes peptídeos, principalmente o βA_{1-42} , têm alta capacidade de agregação e formação das placas senis. Por isso, essa é a chamada via amiloidogênica do processamento da APP (LUDEWIG; KORTE, 2017).

Figura 1 - Clivagem da APP

Fonte: adaptada de Ludewig, Korte, 2017. A APP pode ser clivada por quatro secretases: a η, a α, a β e a γ. Pela via da η-secretase (painel esquerdo), quando a APP é clivada, libera-se o peptídeo solúvel APPs_η, enquanto o fragmento com o C-terminal (CTF) η permanece na membrana para ser novamente clivado pela α- ou β-secretase, com consequente liberação dos peptídeos A_η-α e A_η-β. Com a clivagem subsequente pela γ-secretase, libera-se no citosol o domínio intracelular da APP (AICD). Na via não-amiloidogênica (painel central), a α-secretase cliva a APP dentro do domínio βA (em vermelho), truncando-o. Assim, o peptídeo solúvel APPs_α contém um pedaço do fragmento βA e, com a clivagem seguinte pela γ-secretase, há a liberação de outro peptídeo solúvel, o p3. Na via amiloidogênica (painel direito), a APP é clivada inicialmente pela β-secretase, liberando o peptídeo solúvel APPs_β e deixando no fragmento restante os 42 aminoácidos que compõem o peptídeo βA (Aβ), que será liberado para o espaço extracelular após a clivagem pela γ-secretase.

Alguns trabalhos mostram que as placas senis são as responsáveis pela disfunção sináptica e morte neuronal, observadas na DA (SELKOE, 1994; SHANKAR, WALSH, 2009). Porém, evidências mostram que os oligômeros solúveis do peptídeo β-amiloide possuem importante papel na disfunção sináptica, dano neuronal e déficits cognitivos observados no início da doença (PODUSLO et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2013; KAYED, LASAGNA-REEVES, 2013).

O principal mecanismo de eliminação do peptídeo βA é a via de captação celular para degradação lisossomal. Trabalhos evidenciam a participação da microglia na eliminação do βA por meio da endocitose via receptores de lipoproteínas (LEE, LANDRETH, 2010), receptores de quimiocinas (LIU et al., 2010) e, ainda, via receptor

colinérgico nicotínico $\alpha 7$ (TAKATA et al., 2010). Não se sabe, no entanto, se o acúmulo de βA na DA é resultado do aumento da secreção do peptídeo, diminuição da eliminação ou uma combinação desses fatores.

Os emaranhados neurofibrilares, por sua vez, são formados pela agregação da proteína tau. A tau é encontrada principalmente no axônio neuronal e tem como função a estabilização de microtúbulos, que compõem o citoesqueleto e por onde é realizado o transporte axonal. A tau tem mais de 80 sítios de fosforilação e é altamente fosforilada durante o desenvolvimento. Em neurônios maduros, a hiperfosforilação da tau influencia de maneira negativa a estabilização de microtúbulos (BRION et al., 1996; FEINSTEIN, WILSON, 2005). Na DA, a tau passa a ser, por mecanismos desconhecidos, fosforilada tanto em seus sítios fisiológicos como em seus sítios patológicos, resultando em sua separação dos microtúbulos e comprometendo suas funções, o que pode contribuir para a doença (BALLATORE et al., 2007; KHAN, BLOOM, 2016). Após rompimento dos microtúbulos, as proteínas tau se agregam e formam os emaranhados neurofibrilares, que são localizados no espaço intracelular. Há evidências, no entanto, de que a tau possa ser prejudicial para as atividades neuronais antes mesmo de ocorrer a agregação, enquanto ainda está solúvel (SANTACRUZ et al., 2005; SHERMAN et al., 2016).

1.2 A hipótese colinérgica para a DA

Uma das hipóteses para a etiologia da DA é a que envolve o sistema colinérgico. É bem estabelecido o papel desse sistema em processos cognitivos, como memória e atenção (BARROS et al., 2004; NOTT; LEVIN, 2006; REZVANI et al., 2009, VIEL et al., 2012). Essa hipótese surgiu a partir de evidências de que os prejuízos cognitivos característicos dessa doença, mas não restritos a ela, como a perda da memória recente, estavam relacionados à disfunção colinérgica (BARTUS et al., 1982). De maneira geral, todo o sistema colinérgico encontra-se alterado na DA: observa-se diminuição da atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) (GAUTHIER, 2002; SERINIKI; VITAL, 2008), que sintetiza a acetilcolina, e aumento da acetilcolinesterase (AChE), que degrada a acetilcolina; alteração da densidade de receptores colinérgicos e, ainda, diminuição da captação de colina e liberação de

acetilcolina (SIVAPRAKASAM, 2006), além da perda de neurônios colinérgicos (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2008).

Estudos mostram que o peptídeo β A pode levar à degeneração de neurônios colinérgicos (ZUSSY et al., 2013; BAKER; NIGH, 2015) e pode formar complexos tanto com a AChE (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2008) quanto com o receptor nicotínico $\alpha 7$ (SALAMONE et al., 2014).

Alvarez et al. (1998) mostraram que o aumento da densidade de AChE estava colocalizado com as placas senis, dando suporte à teoria de que essa enzima pode estar envolvida na agregação do peptídeo. Ainda, o complexo AChE- β A torna as placas senis mais tóxicas e a enzima ali presente tem sua atividade e sensibilidade a inibidores de colinesterase alteradas. Isso ocorre provavelmente por uma questão física, isto é, os sítios de ligação do substrato e dos inibidores ficam indisponíveis, uma vez que a enzima está presa em uma estrutura fibrilar.

A partir de observações clínicas, sugeriu-se que os sintomas iniciais da DA são resultado da disfunção colinérgica induzida pelo peptídeo β A e não da perda neuronal (PARRI et al., 2011; FORNER et al., 2017). Dos 4 fármacos utilizados, atualmente, para o tratamento da DA, 3 são anticolinesterásicos, que aumentam os efeitos da acetilcolina por inibirem sua degradação (EHRET, CHAMBERLIN, 2015). O quarto fármaco é a memantina, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (n-metil-D-aspartato). Este é utilizado em casos de DA severa, geralmente em associação com um anticolinesterásico. Por esse receptor, há influxo de cálcio na célula, o que pode levar à excitotoxicidade. Assim, bloqueando-o, atinge-se diminuição desse íon intracelularmente.

Ainda, foi verificado que os inibidores de colinesterase (iAChE) também influenciam no processamento da β A, aumentando a formação do peptídeo solúvel e, assim, diminuindo a do não-solúvel (RACCHI et al., 2001; CAMPANARI et al., 2014). Portanto, além de favorecer a transmissão colinérgica, os iAChE também atuam na atenuação da formação de placas, uma vez que a ACh agirá por mais tempo em seus receptores e as vias acima descritas também estarão mais ativas.

Os iAChE disponíveis no mercado, hoje em dia, são a rivastigmina, o donepezil e a galantamina. A rivastigmina é um antagonista pseudoirreversível seletivo para AChE e butirilcolinesterase cerebrais e não tem ação alostérica em outros receptores, como é o caso do donepezil e da galantamina; o primeiro inibe receptores de

serotonina além de aumentar a disponibilidade de noradrenalina e dopamina e o segundo modula os receptores colinérgicos nicotínicos (IBACH; HAEN, 2004).

Birks et al (2015) fizeram uma extensa revisão de estudos clínicos que avaliaram a eficácia do tratamento com rivastigmina, em pacientes com DA, em comparação com placebo, além de comparar os efeitos da rivastigmina administrada por via oral ou transdérmica. Os autores concluem que esse anticolinesterásico promoveu melhora dos pacientes em testes cognitivos e atividades de vida diária, mas ressalta que os efeitos foram pequenos e, assim, questionam sua importância clínica. Em relação à via de administração, não houve diferença quanto à eficácia, mas sim quanto aos efeitos adversos, que foram mais presentes com o tratamento por via oral. Os efeitos colaterais do tratamento com iAChE incluem, mais frequentemente, diarreia e náuseas, dada a presença de receptores colinérgicos muscarínicos no trato gastrointestinal (BUDSON, SOLOMON, 2016).

Além de seu conhecido mecanismo de inibição da colinesterase, a rivastigmina também parece ter um efeito positivo sobre as sinapses e neurônios. Bailey e Lahiri (2010) observaram em um modelo celular de neurodegeneração que o tratamento com o anticolinesterásico resultou em aumento das proteínas sinápticas SNAP-25 (proteína sináptica de 25 kDa associada ao sinaptossoma) e sinaptofisina, além de aumentar a viabilidade celular. Mohamed et al. (2015) observaram, ainda, que a rivastigmina aumentou o clearance de βA_{1-40} em ratos que tiveram o peptídeo injetado no cérebro e no fígado por meio do aumento de glicoproteína-P e do receptor LRP-1 de LDL (lipoproteína de baixa densidade).

Contudo, a eficácia clínica da rivastigmina e dos outros anticolinesterásicos, observada por meio da melhora cognitiva e retardo na progressão da doença, fica abaixo de 50%, quando comparada com o placebo. Por isso, consideram-se modestos os efeitos do tratamento com os iAChE (IBACH; HAEN, 2004; BIRKS et al., 2015).

1.3 O lítio como tratamento para a DA

O lítio é um cátion monovalente cuja eficácia na estabilização do humor foi descoberta há mais de 50 anos. Desde então, este fármaco vem sendo a principal escolha no tratamento do transtorno afetivo bipolar (QUIROZ et al., 2004). Nunes et al. (2007) observaram, em um estudo realizado na cidade de São Paulo, que a

prevalência de doença de Alzheimer em pacientes idosos bipolares era menor entre aqueles sob tratamento com lítio (5%) em comparação àqueles tratados com outros estabilizadores de humor (33%).

Em um estudo retrospectivo, com mais de 40 mil pessoas atendidas pelo convênio *Medicaid*, nos Estados Unidos, Gerhard et al. (2015) também observaram menor taxa de incidência de demência entre as pessoas diagnosticadas com transtorno bipolar e tratadas com lítio por, pelo menos, um ano (1,38 por 100 pessoas-ano) em relação às pessoas tratadas com anticonvulsivantes (2,16 por 100 pessoas-ano), que foram consideradas o controle negativo. No entanto, pelo fato de os dados terem sido obtidos por análise de prontuários, os autores não fizeram diferenciação entre os tipos de demência, portanto, não há como afirmar a prevalência de DA nessa população especificamente.

Forlenza et al. (2011) argumentaram que o lítio poderia exercer seus efeitos protetores se administrado previamente à instalação da DA. Nesse sentido, realizaram um estudo com 45 idosos com comprometimento cognitivo leve, divididos em dois grupos: tratado com lítio ou placebo, ao longo de um ano. Os autores observaram que o tratamento com lítio resultou em melhor desempenho dos participantes em um teste de avaliação cognitiva, o *Alzheimer's Disease Assessment Scale - cognitive subscale* (ADAS-cog), e menor número de conversões para DA, porém, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Em estudo clínico publicado por nosso grupo, verificamos que o tratamento com íons de lítio em microdose, ou dose subterapêutica, quatrocentas vezes menor que a usada para transtorno bipolar, além dos iAChE, foi eficiente em impedir a progressão do declínio cognitivo de pacientes com diagnóstico clínico para a doença de Alzheimer, comparativamente aos pacientes tratados somente com iAChE. A avaliação foi realizada por meio do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), em que quanto maior a pontuação (máxima de 30), melhor a preservação cognitiva. Os pacientes foram tratados com microdose de lítio por 15 meses, período durante o qual mantiveram sua pontuação inicial no MEEM (média de 20 pontos), ao passo que os pacientes tratados somente com os iAChE tiveram queda média de 3 pontos (no início do acompanhamento, pontuavam 17 e, ao final, 14; NUNES et al., 2013).

Além disso, a fim de investigar como o lítio em microdose leva à neuroproteção, camundongos transgênicos que hiperexpressam a APP foram submetidos ao

tratamento crônico com lítio, em dose equivalente à usada na pesquisa clínica, a partir de dois e dez meses de idade. Foi observado que o lítio foi capaz de proteger os animais dos prejuízos cognitivos bem como eficaz em tratá-los, por meio da manutenção de corpos neuronais em áreas cerebrais relacionadas à memória, quais sejam o hipocampo e o córtex pré-frontal; aumento de BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*, fator neurotrófico que leva à plasticidade sináptica); diminuição da atividade da GSK-3 β no córtex e expressiva redução do número de placas amiloides. Já os animais que não possuíam a transgenia não tiveram diferença em seu desempenho cognitivo nem nos parâmetros analisados, independentemente do tratamento com lítio ou água (NUNES et al., 2015).

Ficou evidenciada, então, a eficácia da microdose de lítio em não somente prevenir e tratar os prejuízos cognitivos, mas também em modificar algumas características da DA, como a perda de neurônios e as placas amiloides.

Os efeitos moleculares e bioquímicos do lítio são diversos e relacionados à inibição de enzimas que participam de diversas vias de sinalização intracelular. Em sua forma catiônica, o lítio (Li⁺) possui raio atômico de tamanho parecido com o do magnésio (Mg²⁺), assim, ele pode se ligar em seu lugar em enzimas dependentes de magnésio e alterar sua atividade (DUTTA et al., 2014). Dentre essas enzimas, citam-se a inositol monofosfatase (IMPase) e a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) (Figura 2). Ao interagir com essas enzimas, o lítio as inibe, diminuindo as respostas intracelulares decorrentes de sua ativação (FORLENZA et al., 2014).

Figura 2 – Vias de sinalização em que o lítio atua

Fonte: Adaptada de Quiroz et al., 2010. Diversas são as vias de sinalização intracelulares em que o lítio atua. O cAMP, resultante da atividade da adenililciclase, ativa a PKA, levando à fosforilação de CREB e consequente transcrição de BDNF, um importante fator neurotrófico. Trabalhos mostram que o lítio inibe essa via, em situações em que há aumento basal de sua ativação. O lítio também inibe as enzimas IMPase e IPPase, que estão envolvidas na reciclagem de inositol na célula. Como resultado, há diminuição de cálcio intracelular e inibição de genes relacionados à apoptose (MARCKS e GAP-43), promovendo a neuroproteção. Ainda, o lítio inibe a GSK-3β, diminuindo a fosforilação da tau e da β-catenina, que reforça a plasticidade sináptica de longa duração.

A IMPase está envolvida na reciclagem de inositol na célula, o qual é importante na cascata de sinalização do fosfoinositol, necessário para formar segundos mensageiros, como o inositoltrifostato (IP3; QUIROZ et al., 2004). O IP3, ao interagir com seus receptores na membrana do retículo endoplasmático, leva à liberação intracelular de cálcio. Este, por sua vez, ativa cascatas intracelulares relacionadas a diversos eventos, como a formação de memória. Porém, verificou-se que há um aumento excessivo desse cátion em camundongos e ratos velhos e em animais transgênicos para a DA, o que pode levar à excitotoxicidade e, em último caso, à morte celular (WALLACE, 2014). Damri et al. (2015) utilizaram camundongos *knockout* para IMPase e *wild type* tratados com lítio a fim de comprovar os efeitos neuroprotetores do lítio pela inibição dessa enzima, especificamente. Os autores comprovaram sua

hipótese ao avaliar a expressão dos genes *Bcl-2* e *MARCKS*, relacionados à apoptose e neuroplasticidade, respectivamente no hipocampo e córtex pré-frontal. Ambos os grupos apresentaram redução da expressão gênica em ambas as áreas, evidenciando que a inibição da IMPase pelo lítio pode promover a neuroproteção.

A GSK-3 regula diversos processos celulares, como a neuroinflamação e a apoptose (PHIEL; KLEIN, 2001). Existem duas isoformas da enzima: a GSK-3 α e a GSK-3 β , que se diferenciam, principalmente, por um trecho rico em glicina presente no N terminal da primeira. Ambas estão envolvidas na patogênese da DA, porém, há grande número de evidências suportando o papel da isoforma β em processos celulares relacionados à doença, como a fosforilação da tau e de enzimas que participam de vias que levam à formação de placas amiloides (LOVESTONE et al., 1994; DENG et al., 2015; YAN et al., 2015). A GSK-3 β também fosforila a β -catenina, inativando-a. A β -catenina, quando ativada pela via canônica da Wnt, promove o reforço da consolidação da memória e a plasticidade sináptica (VALLÉE; LECARPENTIER, 2016). Assim, a inibição da GSK-3 β pelo lítio resulta no aumento de β -catenina ativa e seus consequentes efeitos neuroprotetores.

Ambas as isoformas passam por modificações pós-traducionais, que levam à sua ativação (fosforilação em Tyr216 ou Tyr279, para a GSK-3 α e GSK-3 β , respectivamente) ou inibição (fosforilação em Ser21 ou Ser9, respectivamente) (SARASWATI et al., 2018). A fosforilação da enzima nessas serinas específicas fazem com que a cauda N terminal da própria GSK-3 atue como um pseudosubstrato, assim, seu substrato real fica impedido de se ligar. Esse é, então, o mecanismo pelo qual outras quinases, como a Akt, PKA e PKC podem inibir a GSK-3 (BEUREL et al., 2015).

Apesar de tais efeitos benéficos, o lítio possui estreita faixa terapêutica (0,6 – 1,0 mmol/L) e ação de longa duração, o que pode levar à intoxicação, se não houver monitoração constante da litemia (BALDESSARINI; TARAZI, 2001; RANG et al., 2008; ORUCH et al., 2014). Além disso, sua toxicidade é ainda maior na população idosa por causa da alteração farmacocinética inerente ao processo de envelhecimento como, por exemplo, baixa função renal, o que dificulta ainda mais a excreção do lítio (REJ et al., 2014). Nesse sentido, observa-se a importância de se estabelecer uma

dose ótima para a utilização desse cátion de maneira que seus efeitos terapêuticos sejam alcançados sem causar toxicidade ao indivíduo.

1.4 O lítio e o sistema colinérgico

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

Alguns grupos vêm mostrando que a GSK-3 β também leva ao aumento da expressão de AChE. Jing et al. (2008) induziram apoptose em células PC12 e observaram que, nessas condições, havia aumento desta enzima. Para verificar se esse aumento estava relacionado com a GSK-3 β , o grupo usou dois inibidores da enzima, um dos quais era o lítio, e o aumento da expressão e atividade da AChE deixou de ocorrer. Assim, a inibição da GSK-3 β pode ser vantajosa não só por reduzir a hiperfosforilação da tau, mas também por inibir a hiperexpressão da AChE, que acelera a deposição de placas.

1.5 O lítio e a autofagia

A autofagia é o processo celular pelo qual proteínas e organelas da própria célula são degradadas. Existem três tipos de autofagia: a macroautofagia, a autofagia mediada por chaperona e a microautofagia. A autofagia mediada por chaperona envolve a translocação seletiva de proteínas do citosol marcadas com o domínio KFERQ e a microautofagia é a menos compreendida, em que as proteínas são invaginadas diretamente pela membrana do lisossomo (RAVIKUMAR et al., 2010). A macroautofagia é o tipo mais estudado e foi o foco neste projeto. Assim, para se referir à macroautofagia, neste trabalho, será utilizado o termo autofagia.

Esse processo acontece fisiologicamente nas células, em condições basais, para manter a homeostase, degradar proteínas malformadas e fazer a reciclagem de

material citoplasmático. Além disso, a autofagia pode ser estimulada por fatores estressantes, como privação de nutrientes (com a reciclagem das proteínas, novos “blocos” de aminoácidos podem ser formados para compensar a privação), doenças ou intervenções farmacológicas.

O início da autofagia se dá pela formação do fagóforo, uma estrutura de membrana, que se alonga conforme se adicionam novas proteínas do citoplasma, formando uma estrutura de membrana dupla, os autofagossomos (AFG). Durante a formação dos AFG, as proteínas e organelas que serão degradadas também são engolfadas nessa estrutura. Depois de formados, os AFG são direcionados por meio dos microtúbulos para a região perinuclear, onde há maior concentração de lisossomos, com quem os AFG se fundem para formar o autofagolisossomo (AFL). Nos lisossomos se encontram as enzimas responsáveis pela degradação do conteúdo do AFL (MOTOI et. al., 2014).

Diversas proteínas estão envolvidas na autofagia. A formação dos AFG requer a atividade da PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) de classe III, a Vps34, a qual é responsável pela formação do PI3-P (fosfatidilinositol-3-fosfato). Não se sabe ao certo o papel do PI3-P na autofagia, porém, sabe-se que este é essencial, pois em sua ausência, não há formação do AFG, como foi verificado no trabalho de Jaber et al. (2012). A LC3 (*light chain 3*) é uma proteína associada a microtúbulo e precursora da LC3-I que, quando conjugada com a fosfatidiletanolamina, forma a LC3-II. Esta, por sua vez, se liga especificamente à membrana alongadora do AFG, onde permanece até a fusão do AFG com o lisossomo. Em seguida, se a LC3-II estiver na face citoplasmática da membrana do AFL, poderá ser reciclada; se estiver na face interna, será degradada com o restante do conteúdo do AFL. A associação entre LC3-II e AFG é muito específica, assim, essa proteína é um bom marcador de autofagia. Outra proteína participante do processo autofágico é a p62, que atua como um sinalizador de degradação de maneira semelhante à ubiquitina, isto é, ela se liga à proteína que deve ser degradada e indica o alvo para o AFG (RAVIKUMAR et al., 2010).

As vias de sinalização que participam da regulação da autofagia podem ser dependentes de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ou independentes de mTOR. A via dependente de mTOR é considerada a via “clássica” de inibição de autofagia, pois o mTOR inibe o complexo ULK1, que atua no início do processo autofágico. As

vias independentes de mTOR, por sua vez, incluem a de AMPK, JKN1, IP3 (receptor de IP3), Erk1/2 e cálcio (RAVIKUMAR et al., 2010).

A autofagia é um processo muito importante para a célula. Assim, condições nas quais esse processo encontra-se alterado, o prejuízo celular certamente será sentido. Em doenças com acúmulo intracelular de proteínas, como na doença de Alzheimer, por exemplo, é razoável supor que o *clearance* não ocorra de maneira adequada, sugerindo que o processo autofágico não esteja eficiente. Essa hipótese foi comprovada em trabalhos como o de Schaeffer et. al. (2012), em que os autores avaliaram a autofagia em um modelo animal de tauopatia, isto é, com camundongos transgênicos que apresentavam disfunção e agregação da proteína tau. Neste trabalho, observou-se que, com a ativação da autofagia, houve diminuição do nível de tau solúvel e do número de neurônios com emaranhados neurofibrilares. Outro trabalho identificou AFGs e vacúolos autofágicos pré-lisossomais não maduros no neocórtex de cérebros de humanos com DA, sugerindo que seu transporte e maturação a lisossomos podiam estar prejudicados (NIXON et. al., 2005).

Sarkar et. al. (2005) mostraram que o lítio (10 mM) é capaz de induzir a autofagia ao inibir a IMPase, o que resulta em depleção do inositol livre na célula. Altos níveis de inositol e IP3 inibem a autofagia, o que é revertido pelo tratamento com lítio. Consequentemente, houve aumento do *clearance* dos agregados de huntingtina e α -sinucleína mutadas, objeto do estudo. No mesmo sentido, Shimada et. al. (2012) caracterizaram os efeitos do tratamento a longo prazo com lítio (concentração plasmática média de lítio: $0,23 \pm 0,01$ mEq/L, 4 meses) sobre os déficits funcionais relacionados ao acúmulo de tau, em camundongos transgênicos. Os autores observaram que este tratamento diminuiu a hiperfosforilação e agregação da tau, além de aumentar a marcação de neurônios positivos para LC3.

2 HIPÓTESE

Considerando trabalhos anteriores, do grupo e de outros descritos na literatura, sabe-se que o lítio possui efeitos benéficos e modificadores de características da DA. No entanto, o principal tratamento para DA leve e moderada consiste no uso de anticolinesterásicos. Nesse sentido, esse trabalho foi baseado na hipótese de que combinar o uso de um anticolinesterásico clássico, que leva à melhora da função colinérgica, com o lítio em microdose, pode resultar em efeito sinérgico, proporcionando alterações histológicas e moleculares não observadas com os tratamentos isolados.

Em pesquisa clínica do grupo, observou-se retardo na progressão da doença em pacientes tratados com lítio e iAChE, porém, as características da interação farmacológica e os efeitos moleculares resultantes do tratamento combinado não foram ainda analisados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficácia do tratamento com lítio isoladamente nos processos de memória e mecanismos de neuroproteção e comparar com o tratamento combinado desse fármaco com um anticolinesterásico em um modelo animal de DA.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do lítio, rivastigmina e associação para:

1. A neuroproteção, atividade da enzima acetilcolinesterase e densidade de BDNF na presença de β A, em culturas organotípicas de hipocampo de camundongos.
2. As memórias de curta e longa duração de camundongos infundidos com β A.
3. A densidade de corpos neuronais e sinapses em córtex e hipocampo de camundongos infundidos com β A.
4. A formação de placas senis em córtex e hipocampo de camundongos infundidos com β A.
5. O processo de autofagia, com foco na densidade de LC3 e p62, marcadores desse processo em cérebro de camundongos infundidos com β A.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção foi dividida em duas partes, nas quais são descritos os estudos *in vitro* e *in vivo*.

4.1 Estudos “*in vitro*”

Os estudos *in vitro* são relacionados aos experimentos realizados a partir da cultura organotípica de hipocampo de camundongos.

4.1.1 Cultura organotípica de hipocampo de camundongos C57Bl/6

Camundongos C57Bl/6 de 12 meses de idade foram anestesiados e mortos por decapitação. O cérebro foi extraído e mantido em tampão fosfato salina gelado. Em seguida, secções coronais de 300 μm foram obtidas em vibrátomo e as fatias de hipocampo foram dissecadas, totalizando 16 a 18 fatias por animal. As fatias foram colocadas em insertos para cultura de 0,4 mm (Millicell-CM, Millipore; 2 a 3 fatias por inserto), em placas de seis poços e mantidas em incubadora de CO₂ umidificada. O meio de cultura, composto por 50% MEM com glutamax-1 (Gibco, 42360032), 25% HBBS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco 14025-092), 25% soro de cavalo inativado (Gibco, 26050-088), 35 mM de glicose, 1% de antibiótico e antimicótico (Anti-Anti Gibco, 15240-062), foi trocado três vezes por semana e as fatias foram mantidas por pelo menos 7 dias para estabilização antes do início dos tratamentos.

Após esse período, as fatias foram incubadas com concentrações crescentes do peptídeo β -amiloide₁₋₄₀ (1-100 $\mu\text{g/mL}$) para verificação da concentração a produzir aproximadamente 50% de neurodegeneração ou com concentrações crescentes do anticolinesterásico rivastigmina (1-100 μM) para determinação da concentração a ser utilizada nos ensaios subsequentes. Em placas paralelas, as fatias foram incubadas com concentrações crescentes de carbonato de lítio (Li₂CO₃; 1-100 μM) para verificar o efeito neuroprotetor. Todos os tratamentos foram mantidos por 15 dias.

Após determinação das concentrações ótimas do peptídeo βA , da rivastigmina e do lítio, uma nova bateria de culturas organotípicas foi preparada para verificação

dos efeitos dos tratamentos isolados e combinados (Lítio + β A; Rivastigmina + β A; Lítio + Rivastigmina + β A).

Após duas semanas de tratamento, os meios de cultura foram separados e as fatias foram incubadas com 1 μ g/mL de iodeto de propídeo (marcador de morte neuronal) durante 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, as imagens das fatias foram adquiridas em sistema de aquisição de imagem fluorescente (ZoeTM Fluorescent Cell Imager Bio-Rrad, Hercules, California, USA). A quantificação da morte neuronal foi realizada utilizando-se o programa ImageJ 1.51j8 (*National Institutes of Health, EUA*).

Após esse procedimento, os tecidos de hipocampo foram coletados, homogeneizados em tampão de lise (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 (Complete EDTA-free, Roche, 11 873 580 001), centrifugados a 12.000 rpm, 4 °C, e armazenados em freezer -80 °C para determinações moleculares posteriores.

4.1.2 Dosagem de BDNF

A dosagem de BDNF foi realizada pelo método de ELISA, utilizando-se o kit Bdnf (Mouse) (KA0331, version 70, Abnova, Taipei, Taiwan). Brevemente, as amostras de sobrenadante dos homogenatos das fatias de hipocampo, diluídas 50x em tampão de ensaio, foram colocadas na placa previamente preparada com o anticorpo anti-BDNF e esta foi incubada por 90 min a 37 °C. Em seguida, o anticorpo anti-BDNF biotilado foi adicionado e a placa foi incubada por 60 min a 37 °C. Foi feita uma lavagem da placa em TBS 0,01 M (3x, 1 min), a solução ABC foi incubada por 30 min a 37 °C. Após esse período foram feitas 5 lavagens (1 min) com TBS 0,01 M. Em seguida a solução de TMB foi adicionada e as amostras incubadas por 30 min a 37 °C. Ao término, foi adicionada a solução finalizadora da reação e a absorbância lida a 450 nm. Os valores de absorbância foram comparados a uma curva padrão com diferentes concentrações de BDNF (0 – 2000 pg/mL) e normalizados pela quantidade total de proteínas da solução, obtendo-se, ao final, os valores em pg/ μ g. Foram utilizadas amostras de 3 animais por grupo, com exceção do grupo Lítio, para o qual foram utilizadas amostras de 6 animais.

4.1.3 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi medida a partir do sobrenadante das fatias de hipocampo, utilizando-se o kit Acetylcholinesterase Assay (ab138871, Abcam). Brevemente, 50 μ L de solução de ensaio (DTNB e acetiltiocolina diluídos em tampão de ensaio) e 50 μ L das amostras, 100x diluídas em tampão de ensaio, foram adicionadas a uma placa de 96 poços e incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, protegida da luz. A absorbância foi lida em 410 nm. Os valores de absorbância foram plotados em uma curva padrão e os dados foram obtidos na unidade de mU/mL. Foram utilizadas amostras de três animais por grupo, com exceção do grupo Lítio, do qual foram utilizadas amostras de seis animais. Foram utilizadas amostras de 3 animais por grupo, com exceção do grupo Lítio, para o qual foram utilizadas amostras de 6 animais.

4.2 Estudos “*in vivo*”

Os estudos *in vivo* são relacionados aos experimentos de comportamento realizados com camundongos. Ainda, nesta seção, são descritos os ensaios histológicos e moleculares realizados nas amostras de cérebro desses animais.

4.2.1 Delineamento experimental

A fim de avaliar os efeitos preventivos do lítio *in vivo*, um grupo de animais recebeu o fármaco dissolvido na água de beber desde os dois meses de idade (n=25). Outro grupo recebeu somente água (n=39). Após oito meses desse pré-tratamento, os animais foram subdivididos em 5 grupos (Quadro 1):

- Pré-tratado com água, a ser infundido com veículo;
- Pré-tratado com água, a ser infundido com β A;
- Pré-tratado com água, a ser infundido com β A e tratado com rivastigmina;
- Pré-tratado com lítio, a ser infundido com β A e tratado com lítio;
- Pré-tratado com lítio, a ser infundido com β A e tratado com lítio e rivastigmina.

A infusão de β A foi realizada utilizando-se minibombas osmóticas, implantadas por cirurgia estereotáxica, e teve duração de 28 dias. Durante esse período, os animais receberam os tratamentos, lítio e/ou rivastigmina, em sua água de beber.

Ao final do período de infusão, os animais foram submetidos à avaliação de sua mobilidade e memórias de curta e longa duração, por meio dos testes de reconhecimento de objeto novo e esquiva ativa, respectivamente. Após a realização das avaliações de comportamento, os animais foram anestesiados, perfundidos e tiveram seu cérebro extraído. A figura 3 representa o delineamento experimental descrito.

Quadro 1 – Grupos formados de acordo com pré-tratamento, infusão e tratamento.

Grupo	Veículo	β A	Riv	Lítio	Li+Riv
Pré-tratamento	Água	Água	Água	Lítio	Lítio
Infusão	Veículo	β A	β A	β A	β A
Tratamento	Água	Água	Rivastigmina	Lítio	Lítio + Rivastigmina
n	13	14	12	13	12

Fonte: autor. β A: peptídeo β -amiloide; Riv: rivastigmina; Li+Riv: tratamento associado de lítio e rivastigmina.

Figura 3 – Delineamento experimental

Fonte: autor. Linha do tempo que representa o delineamento experimental. O pré-tratamento foi iniciado quando os animais completaram 2 meses de idade e teve duração de 8 meses. Aos 10 meses de idade, os animais foram submetidos à cirurgia de implante da minibomba osmótica. No dia seguinte, iniciou-se o tratamento com água, lítio e/ou rivastigmina. Após o período de infusão, que durou 28 dias, realizaram-se os testes comportamentais para avaliação das memórias de curta e longa duração (reconhecimento de objeto novo e esquiva ativa) e avaliação de locomoção (actômetro). A eutanásia foi realizada a seguir e os cérebros foram extraídos.

4.2.2 Animais

Os camundongos C57Bl/6 foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da USP, com seis semanas de idade, e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, onde foram realizados os ensaios experimentais. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os “princípios éticos para uso de animais de laboratório” descritos pela Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL, antigo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA) e de acordo com a Lei Arouca, aprovada em 2008. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 90, nas fls. 22 do livro 03.

Os camundongos foram mantidos agrupados, de 3 a 6 animais por caixa, em mini-isoladores, em rack ventilado, com água e ração *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12h.

4.2.3 Tratamentos

Os íons de lítio foram administrados na forma de carbonato de lítio (Li_2CO_3), na dose de 0,3 mg/kg/dia. Essa dose foi estabelecida de acordo com a utilizada em pesquisa anterior do grupo, realizada com humanos, em que o Li_2CO_3 foi administrado a 1,5 mg/dia (NUNES et al., 2013). Além disso, trabalhos mostram que a farmacocinética do lítio em camundongos varia com relação aos humanos, sendo necessária a adaptação da dose, que deve ser dez vezes maior nos camundongos, uma vez que a meia-vida e o volume de distribuição são menores que em humanos (WOOD et al., 1986; LEDOUX, 2003).

Foi preparada uma solução de Li_2CO_3 em água filtrada a 1,5 mg/L e oferecida *ad libitum* aos animais. Esta concentração foi estabelecida a partir da avaliação da quantidade média de água ingerida por camundongo (em torno de 5 mL/camundongo/dia) em trabalho anterior, onde o volume de água com lítio ingerido por animal conferiu com o volume necessário para que a dose diária de lítio pretendida fosse administrada. A quantidade ingerida foi monitorada semanalmente para que esse controle fosse feito também nesse trabalho.

O início do pré-tratamento, aos 2 meses de idade, foi determinado de acordo com estudo anterior, na dissertação de mestrado desenvolvida pela própria doutoranda, em que o tratamento crônico com lítio por 7 meses foi suficiente para diminuir a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo de *E. coli*. Portanto, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado anteriormente, com o acréscimo de 1 mês (8 meses no total) devido à mudança de espaço físico do biotério, o que impossibilitou a realização de experimentos no tempo previsto.

A rivastigmina foi administrada na forma de tartarato de rivastigmina (Sigma Aldrich, SML0881), na dose de 0,3 mg/kg/dia (FURUKAWA-HIBI, 2011), após o implante da minibomba. Assim, dissolveu-se 1,5 mg de tartarato de rivastigmina em 1 litro de água filtrada e essa solução foi oferecida *ad libitum* aos animais.

4.2.4 Registro do consumo de água

O consumo de água foi registrado semanalmente, pesando os bebedouros de cada caixa. A estimativa de consumo por animal foi obtida ao dividir o consumo total da caixa pelo número de animais na caixa. O consumo mensal foi estimado ao somar os dados de consumo semanal, totalizando um mês, e dividir pelo número de animais na caixa.

4.2.5 Cirurgia para implante de minibombas osmóticas

A cirurgia para implante de minibombas osmóticas (Alzet, modelo 1004, Cupertino, CA, EUA) foi realizada seguindo método descrito anteriormente (FRAUTSCHY et al., 1998) e validado por nosso grupo em ratos e camundongos (VIEL et al., 2008; AMARAL et al., 2010, VIEL et al., 2012). Para isso, a indução e manutenção da anestesia foram feitas com isoflurano (3% e 1,5%, respectivamente). As minibombas foram preenchidas com veículo (4 mM HEPES, pH 8.0), peptídeo βA_{1-40} (Tocris, 1191; 0,46 nmol, mais 0,22 nmol de E-64) ou peptídeo βA_{1-42} (Sigma, A9810; 0,46 nmol, mais 0,22 nmol de E-64, um inibidor de cisteína proteinases). Após a anestesia, o animal foi posicionado em equipamento estereotáxico. Uma cânula de aço inoxidável foi implantada no ventrículo lateral direito, seguindo as coordenadas 0,8 mm ântero-posterior, 1 mm mediolateral em relação ao bregma e 2 mm na direção

dorsoventral (FRANKLIN E PAXINOS, 2008). A outra extremidade da cânula foi conectada a um cateter de polivinilcloreto, ligado à minibomba osmótica que foi implantada na região subcutânea, no pescoço do animal. O conteúdo da minibomba foi liberado durante 28 dias, de acordo com as instruções do fabricante. A Figura 4 ilustra a posição da minibomba e cânula no camundongo.

Figura 4 - Representação do posicionamento da minibomba osmótica em um camundongo.

Fonte: autor. Com o animal anestesiado, faz-se um corte na cabeça, por onde se coloca a minibomba no dorso e implanta-se a cânula no ventrículo lateral direito.

4.2.6 Avaliação da memória de longa duração

A avaliação da memória de longa duração foi realizada com os animais infundidos com veículo ou βA_{1-40} . Para tanto, utilizou-se o equipamento de esquiva ativa (Ugo Basili, Comerio, Itália), o qual possui dois compartimentos intercomunicados por uma passagem na parede divisória. O chão é formado por barras metálicas, que permitem a passagem de uma corrente elétrica com intensidade controlável. Na tampa da caixa, estão fixadas a campainha e uma lâmpada de cada lado (Figura 5). O experimento foi realizado com a luz da sala apagada, para que não houvesse interferência no condicionamento.

Cada animal foi colocado individualmente no equipamento e teve 5 min de habituação antes de cada sessão, composta por 50 provas de condicionamento com 20 s de intervalo entre cada uma. Cada prova consistiu em um estímulo condicionado (EC) com duração de 6 s (campainha de 70 dB, 670 Hz e lâmpada acesa), dos quais os 4 segundos finais contavam também com o estímulo não condicionado (ENC; choque de 0,5 mA). Foram consideradas respostas condicionadas as provas em que o animal mudou de lado durante os dois primeiros segundos de EC, quando o choque ainda não havia sido deflagrado. Em cada sessão, registrou-se o número de respostas

condicionadas. Foram realizadas três sessões de aquisição em três dias consecutivos, antes da cirurgia de implante da minibomba osmótica, e dois testes para a avaliação da memória de longa duração: 7 e 28 dias após a cirurgia. Na primeira sessão de aquisição, houve uma pausa de 5 min entre a 25ª e 26ª provas para promover a reconsolidação da memória (TELLES, 2015). Todas as sessões foram conduzidas sempre no mesmo período. Os animais que não atingiram, no mínimo, 10% de respostas condicionadas, foram excluídos da análise de esquiva ativa, mas seus cérebros foram extraídos e utilizados para as análises histológicas. Foram utilizados 7 animais para o grupo Veículo; 6 para o grupo βA ; 5 para o grupo Lítio; 6 para o grupo Riv e 6 para o grupo Li+Riv.

Figura 5 – Imagem ilustrativa da esquiva ativa

Fonte: autor.

4.2.7 Avaliação da memória de curta duração

Para a avaliação da memória de curta duração dos animais infundidos com veículo ou βA_{1-40} , utilizou-se o teste de reconhecimento de objeto novo (DEGASPARI et al., 2015). O protocolo consistiu em três etapas. Primeiramente, os animais foram expostos a um objeto, que permaneceu em sua gaiola por 16 horas. Este objeto, uma cuba de vidro, foi considerado o objeto familiar. Após a familiarização, os animais

foram expostos, individualmente, por dez minutos, ao ambiente em que foi realizado o teste, uma caixa de plástico (41cm x 34 cm x 16 cm; comprimento x largura x altura) contendo também a cuba. Três horas depois, acrescentou-se a essa caixa o objeto novo, um suporte de tubos, disposto ao lado da cuba de vidro. O animal pôde explorar livre e individualmente os objetos durante cinco minutos e registrou-se o tempo dispendido em cada objeto. Considerou-se que o animal explorava o objeto quando seu focinho estava a menos de um centímetro do objeto. Com os dados de tempo dispendido nos objetos novo e familiar, calculou-se o índice de discriminação, de acordo com a seguinte fórmula: tempo no objeto novo – tempo no objeto familiar / tempo no objeto novo + tempo no objeto familiar (ANTUNES; BIALA, 2012). Ambos os objetos foram limpos com álcool 70% entre um animal e outro. Foram utilizados 13 animais para o grupo Veículo; 14 para o grupo β A; 13 para o grupo Lítio; 12 para o grupo Riv e 12 para o grupo Li+Riv.

4.2.8 Avaliação da atividade motora

A atividade motora dos animais infundidos com veículo ou β A₁₋₄₀ foi avaliada em caixa de atividade motora, a fim de eliminar qualquer possibilidade de que caso houvesse mau desempenho nas provas, este fosse devido a déficit motor. A caixa de atividade motora (Ugo Basili, Comerio, Itália) é uma caixa acrílica com fotorreceptores nas laterais que quantificam a deambulação e exploração vertical dos animais, em unidades arbitrárias. Os camundongos permaneceram individualmente no equipamento por cinco minutos, com registro de atividade a cada um minuto. Foram utilizados 13 animais para o grupo Veículo; 14 para o grupo β A; 13 para o grupo Lítio; 12 para o grupo Riv e 12 para o grupo Li+Riv.

4.2.9 Perfusão transcardíaca, extração dos cérebros e preparo dos cortes histológicos

Após a finalização dos testes comportamentais, os quais foram realizados somente com os animais infundidos com veículo ou β A₁₋₄₀, os animais receberam lidocaína 1% (Hipolaber, São Paulo, SP, Brasil; i.p.) e, em seguida, foram

anestesiados com tiopental (Cristália, São Paulo, SP, Brasil; 250 mg/kg, i.p.). A perfusão transcardíaca foi realizada com solução salina tamponada (5 min, 10 ml/min) seguida de paraformaldeído (PFA) a 4% (3 min, 10 ml/min) para fixação dos tecidos. Os cérebros foram, então, extraídos e armazenados em solução fixadora (PFA 4%) por 24 h. Após esse período, a solução fixadora foi substituída por uma solução de sacarose a 30%, em que os cérebros permaneceram por 48h. Em seguida, estes foram congelados em dimetilbutano e armazenados a -80 °C até o momento do uso.

Cortes histológicos (40 µm) foram obtidos em um criostato e dispostos em placas de cultura celular contendo solução *anti-freezing* (acetato de potássio 0,1 M, etilenoglicol 40 %, polivinilpirrolidona 1 %) e armazenados a -20 °C.

4.2.10 Imunohistoquímica para avaliação de corpos neuronais e sinapses

Os cortes foram lavados em tampão fosfato salina (PBS, 3x, 5 min) e incubados em PBS com Tween-20 a 0,1% e peróxido de hidrogênio a 0,3% por 30 minutos. Em seguida, foram lavados novamente em PBS (3x, 5 min) e bloqueados por 1 hora em soro normal de cabra (kit ABC Vectastain Elite, código PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Incubou-se o anticorpo primário, contra NeuN (ABN78, Millipore, Temecula, CA, EUA) ou sinaptofisina (ab68851, Abcam, EUA), na concentração de 1:2000, *overnight*, a 4 °C, sob agitação. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBS (3x, 5 min), incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit ABC Vectastain Elite) e lavados novamente (PBS, 3x, 5 min). Em seguida, foram incubados com Vectastain (kit ABC Vectastain Elite) por 30 minutos, lavados novamente com PBS (3x, 5 min) e revelados com diaminobenzidina (DAB a 0,1% em PBS e peróxido de hidrogênio 0,3%). Após duas lavagens breves em água destilada, os cortes foram montados sobre lâminas silanizadas, as quais permaneceram a temperatura ambiente por 2 dias, para que toda a água secasse. Prosseguiu-se, então com a sequência de desidratação, tal como segue: água destilada, brevemente; etanol 50% (3 min); etanol 70% (3 min), etanol 90% (3 min), etanol 90% (3 min), etanol 100% (3 min), etanol 100% (3 min), xilol (3 min) e xilol (3 min). Em seguida, colocaram-se algumas gotas de D.P.X e fecharam-se as lâminas com lamínulas de vidro.

Utilizaram-se 2 cortes de cada animal (Veículo: n=9, β A: n=10, Li: n=9, Riv: n=8, Li+Riv: n=7): um em que estivesse presente o córtex pré-frontal e um em que estivesse presente o hipocampo em seu início.

4.2.11 Imunofluorescência para avaliação de proteínas relacionadas ao processo autofágico

Este ensaio foi realizado no Buck Institute for Research on Aging (Novato, Califórnia, EUA), em colaboração com a Dra. Julie K. Andersen.

Os cortes foram lavados em TBS (*Tris Buffered Saline*, Trizma Base 100 mM, cloreto de sódio 0,9%, pH 7,6) por 20 minutos, a temperatura ambiente e, em seguida, em TBST (TBS com Tween-20 0,1%, 2 vezes de 20 minutos). A recuperação de antígeno foi realizada com tampão Tris-EDTA (10 mM-1 mM), solução na qual os cortes foram incubados e aquecidos em micro-ondas (potência máxima, cinco vezes de 5 s). Após esfriarem até a temperatura ambiente, os cortes foram lavados em TBS (uma vez, 10 min) e TBST (duas vezes, 10 min). Em seguida, os cortes foram incubados em solução de cloreto de amônia 20 mM por 45 minutos, a fim de diminuir a autofluorescência. Após duas lavagens com TBST (20 minutos cada), o bloqueio foi realizado por 1 hora com soro de cabra a 10% em TBS. Os anticorpos primários (anti-p62/SQSMT1 1:50, H00008878-M01, Abnova, Taiwan, e anti-LC3 1:250, NB 100-2220, Novus, EUA) foram diluídos em soro de cabra a 5% em TBS, solução em que os cortes foram incubados *overnight*, a 4 °C. Foram realizadas três lavagens (20 minutos cada) em TBS, a temperatura ambiente e, em seguida, incubaram-se os anticorpos secundários (555 Alexa Fluor, A21428, Life Technologies; 488 Alexa Fluor, A11001, Life Technologies), diluídos em soro de cabra a 5% em TBS, por 1 hora. Foram realizadas mais 3 lavagens de 30 minutos em TBS, a temperatura ambiente. Os cortes foram, então, montados sobre lâminas e, após a secagem completa, foi colocada a lamínula, utilizando Prolong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) como meio de montagem.

4.2.12 Aquisição de imagens

As imagens de imunohistoquímica para NeuN e Syn-2 foram adquiridas utilizando-se um microscópio Leica DMI8 e o software LAS X, com objetiva de 5x.

As imagens de imunofluorescência foram adquiridas no Buck Institute for Research on Aging, utilizando-se um microscópio confocal (Laser Scanning Microscope, LSM-780, Zeiss) e o software Zen 2011, da mesma empresa. A configuração utilizada foi adaptada de Lamb et al. (2017): as imagens foram adquiridas em *z stacks*, com a objetiva de 40x com óleo de imersão, *zoom* de 5x, intervalo de *slices* de 0,8 μm e *laser power* de 14% para o comprimento de onda de 405 nm (DAPI), 6% para 488 nm e 9% para 555 nm. As áreas no corte (PoDG, GrDG e CPF) foram localizadas com base somente na marcação para DAPI, assim, a mesma região anatômica foi identificada e ali, realizado o *z stack*, de modo que a aquisição de imagens não fosse enviesada pela presença ou não das estruturas de interesse, as *puncta* de LC3 e p62. O *z stack* teve início quando os primeiros núcleos apareceram e terminou quando os últimos núcleos desapareceram. Com isso, os *z stacks* dos diferentes animais podiam possuir diferentes números de *slices*. Foi adquirido um *z stack* por área cerebral de cada animal.

4.2.13 Análise de imagens

As imagens de imunohistoquímica para NeuN e Syn-2 foram analisadas utilizando-se o software ImageJ versão 1.51j8 (*National Institutes of Health*, EUA). As imagens foram invertidas, subtraiu-se o *background* e ajustou-se o *threshold*. Para as imagens de NeuN, utilizaram-se os dados de área proporcional marcada, com base na seleção das áreas do hipocampo: Py de CA1 e CA3 e camada granular do giro denteado (GrDG). Para as imagens de sinaptofisina, as áreas analisadas foram as mesmas, mas utilizando-se os dados de densidade.

Os *z stacks* foram analisados utilizando-se o software Imaris 7.1.0 (Bitplane) e uma adaptação da análise sugerida por Lamb et al. (2017). Analisou-se um intervalo de 7 *slices* (*slice* mediano ± 3), onde as células *puncta*-positivas foram identificadas e analisadas. Para que o programa pudesse identificar as *puncta*, estabeleceram-se critérios em relação ao seu diâmetro e intensidade mínima de fluorescência. O

diâmetro médio foi encontrado medindo-se diversas puncta de p62 e LC3, de vários animais, utilizando o próprio software. O valor resultante foi de 0,830 μm . Para a identificação da intensidade mínima de fluorescência, foram feitas diversas tentativas até que fosse encontrado um valor com o qual somente as puncta fossem identificadas e não outros artefatos. Com isso, chegou-se ao valor de 45.000 para as puncta de LC3 e 65.000 para as puncta de p62. Dessa maneira, o programa identificava pontos que tivessem o diâmetro médio e a intensidade mínima estabelecidos. A fim de tornar a análise mais acurada, determinaram-se ROIs (*Region of Interest*) com a função *Surface* do programa, de modo que foi possível rodar a análise somente nas regiões de interesse, que eram as células. Assim, pontos fluorescentes localizados fora das células, nas regiões PoDG e CPF, não foram contabilizados. Ainda decorrente dessa função, foi possível relacionar cada puncta à célula onde ela se localizava, levando à apresentação do resultado como puncta por célula. Foram analisados somente os grupos Veículo e βA (GrDG e PoDG: $n=8$ para ambos os grupos; CPF: $n=7$ para o grupo Veículo e $n=8$ para o grupo βA).

4.2.14 Coloração com Tioflavina S para identificação de placas amiloides

Os cortes foram lavados em água e, em seguida, montados sobre a lâmina. Após secarem completamente (aproximadamente 1 dia), as lâminas foram incubadas com xilol (5 min) e reidratadas em uma série de soluções de álcool etílico (100 %, 95 %, 80 % e 70 %, 2 minutos em cada). Em seguida, foram lavadas brevemente em água destilada e incubadas, por 1 hora, com a solução de tioflavina S (0,5 % em água destilada). Seguiu-se com uma série de desidratação em soluções de álcool etílico (70%, 80%, 95%, 100%, 100%, dois minutos em cada) e clareamento com xilol (5 min). Por fim, as lâminas foram cobertas com Prolong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (RAJAMOHAMEDSAIT; SIGURDSSON, 2012). Foram utilizados 4 cortes por animal (4 animais por grupo), onde era possível identificar as áreas do hipocampo.

4.2.15 Western blot para avaliação de proteínas relacionadas ao processo autofágico

As áreas cerebrais relacionadas à memória, dos animais infundidos com veículo ou βA_{1-42} , foram separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. A partir do sobrenadante foi realizada a quantificação de proteínas, 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 (Tris 25 mM, Glicina 0,192 M e 0,1% de SDS) a 100 V por aproximadamente 2 h. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF em tampão Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% de SDS e metanol 20%, a 400 mA por 1 h. Terminada a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com tampão TBST com leite desnatado a 5% (tampão de bloqueio) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio das reações não específicas do anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p62 (Cell Signaling, 5114, 1:1000), anti-LC3 (Cell Signaling, 2775, 1:1000) e anti-actina (Sigma-Aldrich, A2103, 1:1000) por 16 h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas (3 vezes, 10 minutos) em tampão de bloqueio e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP (*HorseRadish Peroxidase*, Millipore, AP187P, 1:4000) por 2 horas à temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens (10 min) em tampão de bloqueio seguidas de uma breve lavagem em TBST para retirar o excesso de leite. As marcações foram detectadas por quimioluminescência (Western Lightning ECL Pro, Perkin Elmer, NEL120001EA) por meio da exposição das membranas no equipamento LAS500 (GE). A análise das imagens foi realizada utilizando-se o programa ImageJ 1.51j8 (*National Institutes of Health*, EUA). A actina foi utilizada como padrão interno para p62 e LC3. Os dados são apresentados com média $\pm$ erro-padrão. Para as análises de p62, o n foi de 8 para o grupo Veículo; 9 para o grupo βA ; 8 para o grupo Lítio; 12 para o grupo Riv e 8 para o grupo Li+Riv. Para as análises de LC3, o n foi de 8 para o grupo Veículo; 9 para o grupo βA ; 6 para o grupo Lítio; 5 para o grupo Riv e 6 para o grupo Li+Riv.

4.2.16 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias $\pm$ erros-padrão. Os dados do consumo mensal de água bem como os dados obtidos nas sessões de aquisição em esQUIVA ativa foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, considerando como fatores o tempo e o pré-tratamento (água ou lítio).

Para todos os dados obtidos após a cirurgia, as análises foram divididas em duas partes: inicialmente, os grupos Água veículo e Água β A foram comparados utilizando-se o teste t de Student, para avaliar os efeitos da infusão do peptídeo sobre o comportamento e parâmetros de autofagia. Para a avaliação da influência dos tratamentos, todos os grupos infundidos com β -amiloide foram comparados conjuntamente, considerando os medicamentos lítio e rivastigmina como os fatores da ANOVA de duas vias. Para os dados da esQUIVA ativa, utilizou-se ANOVA de duas vias para medidas repetidas, considerando o terceiro dia de aquisição (pré-cirurgia) e os testes realizados aos 7 e 28 dias após a cirurgia.

A diferença foi considerada significativa para valores de P menores que 0,05.

5 RESULTADOS

Primeiramente, apresentam-se os resultados relacionados aos experimentos *in vitro*, seguidos, então, dos resultados obtidos com a análise comportamental dos animais e a partir das amostras de cérebros.

5.1 Efeitos do tratamento com microdose de lítio para neuroproteção

Com o objetivo de se avaliar o mecanismo neuroprotetor do lítio em microdose administrado isoladamente ou em associação com o anticolinesterásico rivastigmina, foram estabelecidas culturas organotípicas de hipocampo de camundongos adultos, de acordo com o descrito por nosso grupo recentemente (Toricelli et al., submetido)¹.

Durante os ensaios de padronização do protocolo de neurodegeneração por incubação das fatias com o peptídeo βA , foi verificado aumento crescente da morte celular e dependente da concentração de βA adicionado ao meio de cultura (Figura 6).

Figura 6 – Avaliação da morte celular induzida por βA_{1-40} em cultura organotípica

Fonte: autor. Morte neuronal em área CA1 hipocampal medida como fluorescência celular total corrigida, obtida após a incubação de fatias organotípicas de hipocampo com concentrações crescentes do peptídeo βA . Os símbolos e barras verticais são as médias $\pm$ erros-padrão de 4 a 5 repetições de cada concentração.

¹ Toricelli, M; Evangelista, SR; Oliveira, RL; Viel TA; Buck HS. Bradykinin treatment increased the longevity of hippocampal organotypic cultures from old mice. Submetido: Neurobiology of Aging.

A concentração efetiva 50% de β A (EC_{50}) foi de 11,6 μ g/mL (IC: 5,9 μ g/mL a 22,9 μ g/mL). A partir desses ensaios, foi escolhida a concentração de 10 μ g/mL (equivalente a 2,3 μ M) para os ensaios seguintes.

Para a determinação da concentração de rivastigmina a ser utilizada nos tratamentos, as fatias de hipocampo foram tratadas com concentrações crescentes do fármaco anticolinesterásico. Foi verificada uma redução não significativa da morte celular em todas as concentrações testadas (Figura 7). Dessa forma, e de acordo com a literatura, foi elencada a concentração de 10 μ M para os ensaios subsequentes.

Figura 7 – Avaliação da morte celular em cultura organotípica após tratamento com rivastigmina

Fonte: autor. Morte neuronal em área CA1 hipocampal medida como fluorescência celular total corrigida, obtida após a incubação de fatias organotípicas de hipocampo com concentrações crescentes do fármaco anticolinesterásico rivastigmina. Não houve alteração da morte celular com as concentrações testadas. Os histogramas e barras verticais são as médias $\pm$ erros-padrão de 4 a 5 repetições de cada concentração.

Para a verificação inicial do potencial neuroprotetor do lítio em microdose e determinação da concentração a ser utilizada nos experimentos seguintes, outras fatias de hipocampo foram colocadas em cultura e tratadas com concentrações crescentes do metal (1 a 100 μ M) por 15 dias. Verificou-se que o tratamento com 10 μ M e 30 μ M de lítio promoveu uma redução não significativa da perda neuronal na

área CA1 do hipocampo. Porém, uma redução significativa (65,9% e 69,7%, respectivamente; $P < 0,05$) foi observada na densidade neuronal da área CA3 hipocampal. O mesmo foi observado na camada granular do giro denteado (GrDG), uma vez que 10 μM do lítio preservou as fatias, reduzindo a densidade de morte neuronal nessa região cerebral (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação da morte neuronal em cultura organotípica após tratamento com diferentes concentrações de lítio

Fonte: autor. A) Morte neuronal avaliada em fatias organotípicas de hipocampo tratadas com concentrações crescentes de lítio. Os dados foram obtidos como fluorescência celular total corrigida, emitida após marcação com iodeto de propídeo. Os histogramas e as barras verticais são as médias $\pm$ erros-padrão. *: $P < 0,05$. Escala: 100 μm . B) Imagens fluorescentes de fatias de hipocampo de camundongos C57Bl/6 marcadas com iodeto de propídeo. Barra de escala: 100 μm .

Após determinação das concentrações ideais de β A, rivastigmina e Li_2CO_3 , outras três placas contendo fatias de hipocampo foram preparadas e os tratamentos combinados foram realizados. Como esperado, as fatias incubadas com β A apresentaram aumento significativo da morte celular na área CA1 do hipocampo, em relação às fatias controle (Figura 9A). O aumento não significativo da morte celular também foi observado nas áreas CA3 e GrDG hipocampais (Figura 9C, E). Nas fatias com neurodegeneração induzida por β A (10 $\mu\text{g/mL}$) e tratadas com lítio (10 μM), rivastigmina (10 μM) e lítio+rivastigmina, verificou-se que a presença do lítio promoveu a neuroproteção, reduzindo significativamente em 39,1% e 45,1% a morte celular nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo, respectivamente, em relação às fatias incubadas com o peptídeo β A ($P < 0,05$; Figura 9B, D). Em GrDG, um efeito não significativo do lítio também foi observado. A rivastigmina sozinha não alterou significativamente a morte celular em CA1 e CA3, o que sugere que o efeito neuroprotetor observado foi devido ao tratamento com o lítio. Em GrDG, entretanto, é sugerido o efeito protetor da Rivastigmina na ausência ou presença do lítio (Figura 9F).

Figura 9 – Avaliação da morte neuronal induzida por β A em cultura organotípica após o tratamento com lítio, rivastigmina ou associação

Fonte: autor. Morte neuronal em áreas hipocâmpais medida como fluorescência celular total corrigida, obtida após a incubação de fatias organotípicas de hipocampo com o peptídeo β A na ausência e na presença de lítio, rivastigmina e do tratamento combinado. Os histogramas e barras verticais são as médias $\pm$ erros-padrão de 4 a 5 repetições de cada concentração. *: $P < 0,05$.

5.2 Dosagem de BDNF

Considerando que o tratamento com lítio nas culturas organotípicas conferiu proteção em relação à morte neuronal, realizou-se a dosagem de BDNF (Figura 10). Não houve diferença estatística entre os grupos veículo e β A, avaliada pelo teste de Mann Whitney, indicando que a presença do peptídeo β A não alterou os níveis da neurotrofina. Nas amostras tratadas com lítio foi observado um aumento não significativo da neurotrofina (interação: $F_{(1,9)} = 0,3356$, $P = 0,5766$), .

Figura 10 – Dosagem de BDNF em cultura organotípica de hipocampo

Fonte: autor. A dosagem de BDNF foi realizada no meio de cultura das fatias de hipocampo. A: o peptídeo β A não influenciou os níveis de BDNF. B: os tratamentos com lítio, rivastigmina ou ambos, nas fatias que receberam β A promoveram aumento não-significativo dos níveis de BDNF. As colunas e as barras correspondem às médias $\pm$ erros-padrão.

5.3 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi avaliada pela quantificação de tiocolina, produzida a partir da hidrólise da ACh pela AChE. A presença do peptídeo β A não interferiu na atividade da enzima, em comparação ao grupo controle (Figura 11A, $t_4 = 0,4936$, $P > 0,05$). No entanto, o tratamento com rivastigmina promoveu uma diminuição não

significativa da atividade da AChE (Figura 11B, rivastigmina: $F_{(1,11)}=3,960$, $P = 0,0720$), independentemente de estar associada ao lítio ou não.

Figura 11 – Atividade da enzima AChE em cultura organotípica de hipocampo

Fonte: autor. A atividade da AChE foi avaliada no sobrenadante dos homogenatos das fatias de hipocampo que ficaram em cultura por 15 dias. A: Atividade da AChE nos grupos controle e βA . B: Atividade da AChE nos grupos tratados com lítio, rivastigmina ou ambos, todos na presença de βA . As colunas e as barras são as médias $\pm$ erro padrão.

5.4 Consumo de água com lítio

Avaliaram-se também os efeitos do lítio *in vivo*. Para tanto, um grupo de camundongos foi submetido ao pré-tratamento de 8 meses com lítio. Fez-se o registro da ingestão semanal de água pelos animais e, com isso, obteve-se um valor médio por animal. Durante o tempo de acompanhamento (Figura 12), prévio à realização da cirurgia para implante da minibomba, houve efeito significativo do tempo sobre o consumo, caracterizado por uma pequena queda no segundo (grupo Lítio) e terceiro mês em relação aos outros meses (grupo Água; $F_{(7,287)}=5,36$, $P < 0,0001$). Embora tenha havido diferença estatística, essa queda no consumo não interferiu no comportamento natural dos animais. O pré-tratamento com lítio, por sua vez, não influenciou na quantidade de água ingerida ($F_{(1,287)}= 0,45$, $P = 0,508$).

Figura 12 - Registro do consumo de água ao longo dos oito meses de pré-tratamento, com água ou lítio

Fonte: autor. A presença de lítio na água não alterou o padrão de ingestão de água, porém, observa-se uma queda significativa da ingestão de água no terceiro mês de observação do grupo Água e no segundo mês do grupo Lítio. Os símbolos e barras correspondem à média $\pm$ erro-padrão. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Bonferroni. Água: $n=26$; Lítio: $n=17$. ***: $P < 0,001$ Grupo Água, mês 3 vs todos os outros meses. #: $P < 0,05$ Grupo Lítio, mês 2 vs meses 4, 5, 6 e 7.

5.5 Consumo de água durante os tratamentos

No dia seguinte à cirurgia, iniciou-se o período chamado de tratamento, que foi realizado com água, lítio, rivastigmina ou lítio+rivastigmina associados. Manteve-se o registro do consumo de água ao longo dos 28 dias de infusão e o resultado pode ser observado na figura 13. A adição da rivastigmina à água do grupo Riv fez com que o consumo do grupo fosse maior na primeira semana em relação aos outros grupos (Figura 13, interação: $F_{(3,120)} = 3,13$, $P < 0,017$). Na segunda semana, porém, o consumo diminuiu e equivaleu ao dos outros grupos ($F_{(1,30)} = 95,41$, $P < 0,001$).

Figura 13 - Consumo de água, água com lítio, rivastigmina ou ambos ao longo das 4 semanas de infusão de veículo ou β A.

O consumo de água foi registrado semanalmente desde a cirurgia até a morte dos animais. A infusão do peptídeo per se não altera o consumo de água. Porém, entre os animais infundidos com β A, o grupo tratado com rivastigmina apresentou um consumo maior de água, na primeira semana, em relação aos outros grupos. Na segunda semana, o consumo deste mesmo grupo diminuiu e se igualou ao dos outros. Os símbolos e barras correspondem à média $\pm$ erro-padrão. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de Bonferroni. Veículo: n=9, β A: n=9, Lítio: n=9, Riv: n=8, Li+Riv: n=8. ***: $P < 0,0001$ na semana 1, Riv vs β A, Lítio e Li+Riv; #: $P < 0,001$ grupo Riv, semana 1 vs semanas 2, 3, 4 e 5.

5.6 Avaliação da atividade motora

A atividade motora dos animais foi avaliada ao final do período da infusão a fim de verificar se os animais tinham sua mobilidade íntegra para a realização dos testes comportamentais. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 14). Assim, pode-se afirmar que nem o peptídeo β A nem os tratamentos influenciaram na capacidade de exploração horizontal e vertical dos animais (Exploração horizontal - Água veículo vs. Água β A: $t_{16} = 0,6573$, $P > 0,05$; Tratamentos: $F_{(1,30)} = 2,639$, $P > 0,05$; Exploração vertical: Água veículo vs. Água β A: $t_{16} = 1,737$, $P > 0,05$; Tratamentos: $F_{(1,30)} = 2,608$, $P > 0,05$). Com isso, confirma-se que o desempenho dos grupos nos testes de memória se deu pela ação do peptídeo e dos fármacos sobre os processos de memória em si e não por alteração motora.

Figura 14 – Avaliação da atividade motora em camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40} e tratados com lítio, rivastigmina ou ambos

Fonte: autor. Avaliação da atividade locomotora horizontal (A e B) e vertical (C e D), realizada após a última semana de infusão de veículo ou βA_{1-40} . Não houve influência do peptídeo βA ou dos tratamentos sobre a locomoção dos animais. Teste t de Student (A e C) e ANOVA de duas vias (B e D). Veículo: n=13; βA : n=14; Lítio: n=13; Riv: n=12; Li+Riv: n=12.

5.7 Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o desempenho em tarefas de memória

Sabe-se que as alterações cerebrais, como as sinápticas, e a perda neuronal presentes na DA resultam em prejuízo de funções cognitivas. No início, tal prejuízo é mais evidente nos processos de memória. Assim, grande parte dos modelos animais utilizados no estudo dessa doença buscam reproduzir estas alterações e, consequentemente, os danos cognitivos.

Considerando, então, que a infusão do peptídeo resultaria em prejuízo no desempenho de uma dada tarefa mnemônica, antes do início da infusão, os animais

foram submetidos a três sessões de aquisição na esQUIVA ativa, para que fossem devidamente condicionados, ou seja, aprendessem a tarefa. As respostas condicionadas são as esquivas realizadas durante a sessão que impedem o animal de levar o choque.

Na figura 15, pode-se observar que ambos os grupos, pré-tratados com água ou lítio foram condicionados, pois o número de respostas condicionadas aumentou significativamente na SA3 em relação à SA1 ($F_{(2,82)} = 41,04$, $P < 0,0001$).

Figura 15 – Aprendizagem dos camundongos em esQUIVA ativa após pré-tratamento com água ou lítio por 8 meses

Na semana anterior à cirurgia de implante da minibomba osmótica, os animais foram submetidos a três sessões de aquisição em esQUIVA ativa (SA 1, 2 e 3) para que fossem condicionados, o que ficou evidente na SA 3, quando a porcentagem de respostas condicionadas teve um aumento significativo em relação à SA1, primeiro contato do animal com o equipamento. As colunas e barras correspondem à média $\pm$ erro-padrão. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. ***: $P < 0,0001$

Com relação à influência do peptídeo βA sobre a memória de longa duração, foram realizados dois testes em esQUIVA ativa: 7 e 35 dias após a cirurgia. Observou-se que, 7 dias após o início da infusão do peptídeo, o grupo βA apresentou uma queda significativa da porcentagem de respostas condicionadas em relação ao terceiro dia da sessão de aquisição (SA 3), quando o βA ainda não havia sido infundido. Após essa queda, o grupo não se recuperou e permaneceu com um baixo desempenho no teste 2, realizado 35 dias depois da cirurgia (interação: $F_{(2,22)} = 3,50$, $P < 0,05$; Figura 16A). Nenhum dos tratamentos, no entanto, foi eficaz em evitar a queda observada ou contribuir para a recuperação do desempenho, embora algumas tendências

tenham sido observadas, o que será discutido adiante (Lítio: $F_{(1,19)} = 1,203$, $P > 0,05$; Rivastigmina: $F_{(1,19)} = 0,071$, $P > 0,05$; Lítio + Rivastigmina: $F_{(1,19)} = 1,244$, $P > 0,05$; Figura 16B).

Figura 16 – Avaliação da memória de longa duração de camundongos em esQUIVA
ativa

Avaliação da memória relacionada a estímulo aversivo ao longo do período de infusão do peptídeo βA_{1-40} ou veículo. Em A, observa-se que os animais infundidos com βA tiveram uma queda significativa e permanente na porcentagem de respostas condicionadas em comparação à SA 3, evidenciando o papel do βA no prejuízo desse tipo de memória (ANOVA para medidas repetidas, *: $P < 0,05$). Em B, apresenta-se o desempenho dos grupos infundidos com βA de acordo com os tratamentos. Não houve diferença significativa (ANOVA de duas vias para medidas repetidas). Água Veículo: $n = 7$; Água βA : $n = 6$; Lítio βA : $n = 5$; Rivas βA : $n = 6$; Li+Riv βA : $n = 6$. Rivas: rivastigmina; Li+Riv: tratamento associado de lítio e rivastigmina. SA 3: Sessão de Aquisição 3, realizada antes da cirurgia. 7d: 7 dias após a cirurgia. 35d: 35 dias após a cirurgia.

A fim de verificar o efeito do peptídeo βA sobre a memória de curta duração, após o período de infusão, foi realizado o teste de reconhecimento de objeto novo. Observou-se que o grupo βA dispendeu menos tempo explorando o objeto novo em relação ao grupo veículo, indicado pelo índice de discriminação negativo, evidenciando que o peptídeo prejudicou a formação desse tipo de memória (Veículo vs. βA : $t_{25} = 1,817$, $P = 0,0812$; Figura 17A). Nenhum dos tratamentos, no entanto, foi capaz de evitar ou reverter esse prejuízo, embora o grupo tratado com lítio+rivastigmina tenha apresentado um aumento não-significativo do índice de discriminação. Com esse efeito é possível sugerir que o tratamento combinado possui

um maior potencial de impedir o prejuízo da memória causado pela presença do peptídeo βA (interação: $F_{(1,47)} = 0,1165$, $P = 0,7344$; Figura 17B).

Figura 17 - Avaliação da memória de curta duração pelo teste de reconhecimento de objeto novo

Fonte: autor. A avaliação da memória de curta duração, por meio do teste de reconhecimento de objeto novo, foi realizada após o período de infusão de veículo ou βA_{1-40} . O índice de discriminação foi calculado de acordo com a fórmula: (tempo no objeto novo – tempo no objeto familiar)/(tempo no objeto novo + tempo no objeto familiar). No teste, realizado três horas após a familiarização com o ambiente e o objeto familiar, os animais infundidos com βA e tratados com água apresentaram menor interesse pelo objeto novo em comparação aos animais infundidos com veículo (A; teste t de Student; $P < 0,05$). Nenhum dos tratamentos, no entanto, foi eficiente em recuperar ou evitar o prejuízo causado pelo peptídeo (B; ANOVA de duas vias). Veículo: $n=13$; βA : $n=14$; Lítio: $n=13$; Riv: $n=12$; Li+Riv: $n=12$. As colunas e as barras são as médias $\pm$ erro-padrão.

5.8 Densidade de corpos neuronais e sinapses

A fim de verificar se a neuroproteção observada com o tratamento com lítio na cultura organotípica se replicaria *in vivo*, realizou-se a imunomarcagem para NeuN, proteína encontrada no núcleo de neurônios, no hipocampo (Figura 19) e córtex (Figura 20) dos animais.

De acordo com a análise da densidade, observou-se que na camada granular do giro denteado (GrDG), a infusão do peptídeo βA_{1-40} levou a uma diminuição não significativa da densidade de corpos neuronais (Figura 18A, veículo vs. βA : $t_{17}=1,691$, $P=0,1092$). O tratamento com rivastigmina, por sua vez, foi eficaz em evitar essa perda quando utilizada sozinha. Por outro lado, na presença de lítio, a prevenção da morte

neuronal pelo anticolinesterásico não ocorreu (Figura 18B, interação: $F_{(1,30)}=6,925$, $P=0,0133$). O tratamento com lítio, somente, também parece evitar a perda de neurônios, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa.

No córtex pré-frontal e na camada Py de CA1 e CA3 do hipocampo, a infusão do peptídeo não resultou em perda neuronal (Figura 18C a 18H; Veículo vs. βA , CPF: $t_{15}=0,0013$, $P>0,05$; PyCA1: $t_{17}=0,1830$, $P>0,05$; PyCA3: $t_{17}=0,2895$, $P>0,05$). Os tratamentos com lítio e/ou rivastigmina também não influenciaram na densidade de neurônios, embora se observe no CPF a mesma tendência de GrDG (CPF, interação: $F_{(1,31)}=3,928$, $P=0,0564$; PyCA1: $F_{(1,30)}=0,9511$, $P>0,05$; PyCA3: $t_{(1,30)}=1,053$, $P>0,05$).

Figura 18 – Avaliação da morte neuronal no hipocampo e CPF de camundongos

Fonte: autor. A avaliação da densidade de neurônios foi realizada no cérebro dos animais que foram infundidos com veículo ou βA_{1-40} e tratados com lítio, rivastigmina ou ambos. Veículo: n=9, βA : n=10, lítio, n=9, rivastigmina: n=8, lítio+rivastigmina, n=7. A, C, E e G: Teste t de Student. B, D, F e H: Anova de duas vias, seguida de Bonferroni. As colunas e as barras são as médias $\pm$ erro-padrão.

Figura 19 – Imagens representativas da imunomarcação para corpos neuronais no hipocampo de camundongos

Fonte: painel esquerdo superior: Franklin, Paxinos (2008). Escala: 100 μ m. hif: fissura hipocampal; LMol: *lacunosum moleculare*; MoDG: camada molecular do giro denteado.

Figura 20 – Imagens representativas da imunomarcação para corpos neuronais no CPF de camundongos

Fonte: painel esquerdo superior: Franklin, Paxinos (2008). Escala: 100 μ m. S1J: córtex somatossensorial; Fr3: córtex frontal, área 3; M1: córtex motor primário; M2: córtex motor secundário; Cg1: córtex cingulado, área 1; PrL: córtex pré-límbico.

Avaliou-se, ainda, a densidade de sinapses, utilizando-se imunomarcção para sinaptofisina, encontrada em vesículas sinápticas, no hipocampo (Figura 22) e córtex (Figura 23). Observou-se que a infusão do peptídeo βA_{1-40} levou à diminuição da densidade de sinapses no CPF (Figura 21G, veículo vs. βA : $t_{14}=3,731$, $P=0,0022$), o que não foi impedido por nenhum dos tratamentos (Figura 21H, interação: $F_{(1,31)}=0,2549$, $P>0,05$).

Nas áreas hipocampais de GrDG, PyCA1 e PyCA3, a infusão de βA_{1-40} não influenciou a densidade sináptica, embora pareça haver um pequeno aumento em PyCA3 (Figura 21E, veículo vs. βA : $t_{16}=1,256$, $P>0,05$). Os tratamentos com lítio, rivastigmina ou ambos também não influenciaram na densidade sináptica nessas áreas.

Figura 21 – Avaliação da densidade sináptica no hipocampo e CPF de camundongos

Fonte: autor. A avaliação da densidade sináptica foi realizada no cérebro dos animais que foram infundidos com veículo ou βA_{1-40} e tratados com lítio, rivastigmina ou ambos. Veículo: n=7, βA : n=9, lítio: n=9, rivastigmina: n=9, lítio+rivastigmina, n=8. A, C, E e G: Teste t de Student. B, D, F e H: Anova de duas vias, seguida de Bonferroni. As colunas e as barras são as médias $\pm$ erro-padrão.

Figura 22 – Imagens representativas da imunomarcção para sinaptofisina no hipocampo de camundongos

Fonte: painel esquerdo superior: Franklin, Paxinos (2008). Escala: 100 μ m. hif: fissura hipocampal; LMol: *lacunosum moleculare*; MoDG: camada molecular do giro denteado.

Figura 23 – Imagens representativas da imunomarcção para sinaptofisina no CPF de camundongos

Fonte: painel esquerdo superior: Franklin, Paxinos (2008). Escala: 100 μ m. S1J: córtex somatossensorial; Fr3: córtex frontal, área 3; M1: córtex motor primário; M2: córtex motor secundário; Cg1: córtex cingulado, área 1; PrL: córtex pré-límbico.

5.9 Identificação de placas amiloides

Com o objetivo de verificar se havia placas amiloides, formadas pela agregação do peptídeo βA_{1-40} , realizou-se a coloração com Tioflavina S. Nenhum dos grupos apresentou placas, ao contrário do que se esperava, ao menos para o grupo βA . Na Figura 24, mostra-se um painel com imagens representativas do ensaio.

Figura 24 – Imagens representativas da coloração para placas amiloides no hipocampo de camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40}

Fonte: autor. A avaliação da densidade de placas amiloides foi realizada por meio da coloração das placas com tioflavina S. Utilizou-se como controle positivo um corte de camundongo transgênico que hiperexpressa a APP (TG APP) e apresenta placas amiloides, indicadas pelas setas brancas. Nenhum dos grupos experimentais apresentou placas. n=4 para todos os grupos.

5.10 Efeitos do tratamento com microdose de lítio sobre os marcadores de autofagia

Uma vez que não houve formação de placas amiloides, investigou-se se houve alteração do processo autofágico, meio pelo qual o peptídeo βA poderia estar sendo degradado. Por meio da imunofluorescência para p62 e LC3, verificou-se que a infusão do peptídeo βA_{1-40} não influenciou na formação de punctas desses

marcadores em GrDG (Figuras 25 e 26) e CPF (Figura 27), indicando que não houve aumento do processo autofágico.

Figura 25 – Avaliação da formação de punctas de LC3 no hipocampo de camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40}

Fonte: autor. A formação de punctas de LC3 foi avaliada na área GrDG do hipocampo dos grupos veículo e βA . No painel à esquerda, apresenta-se o gráfico da quantificação das punctas por célula. Nos painéis à direita, que são projeções do z stack (z médio $\pm$ 3), observam-se as punctas em verde e, em azul, o núcleo das células, marcado com DAPI. n=8 para ambos os grupos, que foram comparados por teste t de Student.

Figura 26 – Avaliação da formação de punctas de p62 no hipocampo de camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40}

Fonte: autor. A formação de punctas de p62 foi avaliada na área GrDG do hipocampo dos grupos veículo e βA . No painel à esquerda, apresenta-se o gráfico da quantificação das punctas por célula. Nos painéis à direita, que são projeções do z stack (z médio $\pm$ 3), observam-se as punctas em verde e, em azul, o núcleo das células, marcado com DAPI. n=8 para ambos os grupos, que foram comparados por teste t de Student.

Figura 27 – Avaliação da formação de punctas de LC3 e p62 no CPF de camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-40}

Fonte: autor. A formação de punctas de p62 foi avaliada no CPF dos grupos veículo e βA . Nos painéis superiores, apresentam-se os gráficos da quantificação das punctas de p62 e LC3 por célula. Nos painéis inferiores, que são projeções do z stack (z médio $\pm$ 3), observam-se as punctas de p62 em verde, as punctas de LC3 em vermelho (indicadas pelas setas brancas) e, em azul, o núcleo das células, marcado com DAPI. n=8 para ambos os grupos, que foram comparados por teste t de Student.

Uma vez que alterações no processo autofágico podem ser difíceis de observar histologicamente, dada a dinamicidade do processo de formação das punctas, foram avaliadas, ainda, as densidades de p62 e LC3 por western blot em camundongos infundidos com o peptídeo βA_{1-42} .

A infusão do peptídeo βA_{1-42} não influenciou nos níveis de p62 (Figura 28A, veículo vs. βA : $t_{14}=0,3433$, $P>0,05$). O tratamento com rivastigmina nos animais infundidos com βA_{1-42} , por sua vez, resultou em diminuição dos níveis desse marcador,

indicando que o anticolinesterásico promoveu diminuição dos processos autofágicos (Figura 28B, rivastigmina: $F_{(1,31)}=4,403$, $P=0,0441$), no entanto, essa diferença não apareceu com o pós-teste de Bonferroni.

Observou-se que a infusão do peptídeo βA_{1-42} levou a aumento de LC3 (Figura 28C, veículo vs. βA : $t_{15}=2,172$, $P=0,0463$), indicando, portanto, o aumento da formação de autofagossomos ou o acúmulo de LC3 devido ao bloqueio do processo autofágico após essa etapa. O tratamento com rivastigmina, por sua vez, na presença ou não de lítio, resultou em diminuição dos níveis de LC3, diminuindo, assim, o processo autofágico (Figura 28D, rivastigmina: $F_{(1,22)}=9,158$, $P=0,0063$).

Figura 28 – Avaliação dos marcadores de autofagia no hipocampo de camundongos infundidos com βA_{1-42}

Fonte: autor. Os marcadores de autofagia p62 (A e B) e LC3 (C e D) foram avaliados por western blot em camundongos C57Bl/6 submetidos ao mesmo delineamento experimental descrito até então, porém, com infusão do peptídeo βA_{1-42} . No painel à direita, imagens representativas do ensaio. p62: Veículo: n=8, βA : n=8, lítio: n=8, rivastigmina: n=11, lítio+rivastigmina, n=8. LC3: Veículo: n=8, βA : n=9, lítio: n=6, rivastigmina: n=5, lítio+rivastigmina, n=6. A e C: teste t de Student. B e D: Anova de duas vias, seguida de Bonferroni. As colunas e as barras são as médias $\pm$ erro-padrão. *: $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A DA é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes na população idosa e a demência decorrente dessa doença leva a comprometimento da autonomia e independência do indivíduo.

Os prejuízos cognitivos característicos da doença são decorrentes do acúmulo de proteínas, como a β A e a tau, que podem estar em sua forma solúvel, inicialmente, e agregadas nas placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, ambos os quais são os principais marcadores histológicos da DA. Essas são, portanto, as características que os modelos animais e celulares buscam reproduzir a fim de mimetizar a DA.

Os primeiros estudos com microdose de lítio de nosso grupo foram realizados com humanos, onde foi observado que o tratamento com lítio impediu a progressão da doença, ao longo de 15 meses (NUNES et al., 2013). Assim, prosseguiu-se para o estudo em um modelo animal, a fim de se investigar os efeitos histológicos e moleculares do tratamento (NUNES et al., 2015). Nesse trabalho, utilizou-se um modelo transgênico que hiperexpressa a proteína precursora do amiloide (Cg-Tg(PDGFB-APP^{SwInd})20Lms/2J). Esses animais apresentam prejuízo cognitivo a partir de 7 meses de idade e, a partir dos 10 meses, apresentam a formação de placas amiloides. O tratamento com microdose de lítio a partir de 2 meses de idade impediu o declínio cognitivo, a formação de placas e a morte neuronal em animais de 18 meses de idade.

A fim de confirmar a neuroproteção observada *in vivo* por Nunes e colaboradores (2015) e verificar os mecanismos responsáveis por essa neuroproteção, foram estabelecidas culturas organotípicas de animais com 12 meses de idade. Esse protocolo ainda é pouco utilizado na literatura, uma vez que a maioria dos trabalhos mostra essas culturas estabelecidas a partir de animais neonatos (BRUCE et al., 1996; CIMAROSTI et al., 2001). Em nosso grupo, validamos recentemente esse protocolo, mostrando que as fatias de hipocampo se mantêm viáveis por, pelo menos 30 dias (TORICELLI et al., submetido). A partir disso, em ensaios semelhantes, realizados no presente projeto, padronizou-se a concentração do peptídeo β A necessária para matar 50% das células (10 μ g/mL; Figura 6). Essa concentração foi sensivelmente menor que a relatada em literatura para matar 25%

das células de fatias isoladas de animais neonatos (100 µg/mL; BRUCE et al., 1996). Isso indica que, possivelmente, a idade e a estruturação cerebral, que sofre alterações substanciais ao longo do envelhecimento, contribuem para a toxicidade provocada pelo peptídeo, o que condiz com o fato de a DA ser observada principalmente em indivíduos velhos – quando o fator genético não é o determinante para seu desenvolvimento (GEULA et al., 1998; FJELL et al., 2014).

Foi observado que o tratamento com lítio, nas concentrações de 10 uM e 30 uM foi eficiente em proteger o tecido da agressão com o βA_{1-40} (Figura 9), assim como o observado com os animais Tg no trabalho de Nunes e colaboradores (2015). Cismaroti et al. (2001) também observaram o efeito protetor do lítio contra a morte neuronal, a qual foi induzida por privação de oxigênio e glicose. No entanto, vale ressaltar que as concentrações testadas pelos autores foram, pelo menos, dez vezes mais altas que as do presente trabalho. Assim, destaca-se que é possível alcançar os efeitos benéficos do lítio para neuroproteção em doses mais baixas, o que confere maior segurança em relação à toxicidade do fármaco.

Não há relatos na literatura sobre os efeitos da rivastigmina em cultura organotípica. Pode-se afirmar que, nesse trabalho, o anticolinesterásico não impediu a morte celular induzida por βA_{1-40} , como observado na Figura 9. No entanto, sua associação com lítio não impediu que este exercesse seu efeito protetor e nem ampliou o efeito.

Um dos mecanismos propostos para explicar a neuroproteção observada com o lítio é o aumento de BDNF, resultado do aumento de cAMP, que ativa PKA, a qual, por sua vez, fosforila CREB, levando à transcrição do fator neurotrófico (QUIROZ et al., 2010). Nesse sentido, Croce et al. (2014) utilizaram um modelo celular de neuroblastoma humano, com as células da linhagem SH-SY5Y, para mostrar que os tratamentos com lítio e valproato de sódio foram eficazes em proteger as células da neurodegeneração induzida por excesso de glutamato. Os autores associaram a neuroproteção ao aumento da síntese e expressão de RNAm de BDNF. Da mesma maneira, Nunes et al. (2015) também constataram aumento de BDNF no córtex dos camundongos transgênicos para DA tratados com lítio. No presente trabalho também se observou preservação celular, com o aumento não significativo da neurotrofina (Figura 10).

Novamente, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura relacionando a rivastigmina a esse fator neurotrófico. Alguns trabalhos mostram que a rivastigmina também confere neuroproteção, levando a aumento de viabilidade celular (BAILEY, LAHIRI, 2009) e a manutenção da matéria branca cerebral, conferida pela inibição tanto de AChE quanto de BuChE (VENNERI, LANE, 2009). Zhou et al. (2009) demonstraram, em células SH-SY5Y submetidas a danos por choque térmico, que o tratamento com rivastigmina impediu a morte celular em torno de 40%, com envolvimento do fator de transcrição hsf1, que possui participação na manutenção do equilíbrio das formas solúvel e insolúvel de β A. Os autores argumentam que esse mecanismo pode ser ativado em doenças com acúmulo de proteínas, como a DA, porém, nesse trabalho, isso não foi observado *in vitro*.

O trabalho de Oliveira et al. (2011) mostra que o lítio também é capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase. Os autores fizeram essa avaliação em cérebros de zebrafish tratados com 1, 5 ou 10 mg/L de cloreto de lítio e concluíram que havia diminuição de aproximadamente 20% da atividade da AChE. Ainda, avaliaram a ação do lítio sobre a expressão do gene *ache*, que codifica a enzima, e não houve diferença, sugerindo que o lítio não altera a expressão da enzima e sim, sua atividade. No presente trabalho, observou-se que o lítio não alterou a atividade da AChE, nas fatias de hipocampo, ressaltando-se que foi utilizada uma concentração menor. Portanto, se o lítio de fato inibe a enzima, isso ocorre em concentrações maiores, o que seria elucidado com a realização de uma curva dose-resposta. Em contrapartida, o que se observou foi a inibição da AChE, nas fatias de hipocampo, pela rivastigmina, como era esperado (Figura 11). O tratamento associado Li+Riv não modificou a resposta observada com o anticolinesterásico sozinho, confirmando que a inibição enzimática foi resultado da rivastigmina per se.

Para avaliar os efeitos comportamentais do lítio e da associação com a rivastigmina, a ideia inicial era utilizar o mesmo modelo dos animais Tg usado por Nunes et al. (2015), porém, por dificuldades com a reprodução desses animais, utilizou-se um protocolo de infusão crônica (28 dias) de β A₁₋₄₀ em camundongos C57Bl/6 de 10 meses de idade. Esse protocolo já tinha sido utilizado em trabalhos anteriores do grupo (VIEL et al., 2008; AMARAL et al., 2010; Viel et al., 2012; Telles

et al., submetido²), em que se observou, tanto com o uso de βA_{1-40} quanto βA_{1-42} , pior desempenho em tarefas de memória, formação de placas senis e redução da neuroplasticidade em animais que receberam o peptídeo em relação aos que receberam veículo.

Uma vez que, nesse modelo, a infusão é realizada por 28 dias e os efeitos benéficos do lítio em microdose são observados somente após longo período de tratamento, optou-se por iniciar o tratamento previamente à infusão de βA . Diversas vias de administração podem ser utilizadas a fim de se obter o nível plasmático desejado para uma substância. Os critérios de escolha incluem facilidade de administração, adesão ao tratamento (quando se trata de pacientes), se há metabolismo de primeira passagem ou não, entre outros. Neste trabalho, considerando esse longo tempo de pré-tratamento, de oito meses, optou-se por dissolver os medicamentos na água que os animais consumiam diariamente.

Durante o tratamento, não houve influência do lítio na quantidade de água ingerida pelos animais (Figura 12), ao contrário do que se esperaria se o tratamento fosse com doses terapêuticas, uma vez que um dos efeitos colaterais do lítio é a polidipsia. Trabalhos mostram que o tratamento com lítio diminui a capacidade dos rins de concentrar a urina devido à diminuição da expressão de aquaporina 2 (AQP₂), responsáveis pela reabsorção de água nos ductos coletores. A polidipsia seria secundária à poliúria observada (GRÜNFELD, ROSSIER, 2009; GITLIN, 2016). Uma vez que não foi observado aumento do consumo de água pelo grupo tratado com lítio em comparação ao tratado com água, infere-se que essa reação adversa não esteve presente nesses animais, na dose utilizada, que foi quatrocentas vezes menor que a dose terapêutica mais baixa, de 600 mg.

Em relação ao tratamento com tartarato de rivastigmina, a polidipsia não é um efeito colateral ou adverso (THIBAUT et al., 2015). No entanto, o grupo Riv apresentou aumento do consumo de água durante a primeira semana de tratamento (Figura 13), o que levou à hipótese de o fármaco ter alterado o sabor da água. Por outro lado, o aumento do consumo não ocorreu para o outro grupo tratado com

² Telles M; Schöwe NM; Cipolli GC; Malerba HN; Pierrobon MF; Buck HS; Viel TA. Attention training rescues memory deficit in an animal model of neurodegeneration by mechanisms dependent on $\alpha 7$ nicotinic receptors. Submetido: British Journal of Pharmacology.

rivastigmina (Li+Riv). Em tempo, se o lítio modificasse o sabor da água, mascarando assim o gosto da rivastigmina, o padrão de consumo teria se alterado quando da primeira adição de lítio à água, o que não foi observado.

De qualquer maneira, refez-se o cálculo da dose tanto de rivastigmina quanto de lítio, uma vez que os animais puderam beber água livremente, podendo resultar em dose consumida diferente da dose pretendida (0,3 mg/kg para ambos os fármacos). Com base no consumo diário médio, que foi de 5,6 mL para rivastigmina e 4 mL para lítio, o grupo Rivastigmina ingeriu 84% da quantidade esperada (0,0084mg consumido vs. 0,01 mg esperado) ao passo que o grupo lítio ingeriu 60% da quantidade esperada (0,006mg de Li_2CO_3 consumido vs. 0,01 mg esperado). Os cálculos foram realizados considerando a dose de 0,3 mg/kg e um peso médio dos camundongos de 35g. Vale ressaltar, no entanto, que essa é uma estimativa, pois os animais não ficaram em caixas individuais durante o tratamento.

Com base em um trabalho do nosso grupo, realizado para a padronização da técnica de quantificação de lítio em sangue total, avaliou-se a litemia de 5 pessoas que receberam doses escalonadas (1,5, 3,0 e 4,5 mg/dia) de lítio ao longo de 4 semanas. Foi realizada uma coleta de sangue antes do início da administração do lítio, em que se verificou que o nível de lítio estava abaixo do limite de quantificação. Conforme o fármaco foi administrado e sua dose, aumentada, observou-se aumento proporcional da litemia, que retornou aos níveis iniciais após a retirada do tratamento (dados não publicados). Considerando que a dose utilizada nos camundongos foi calculada e ajustada com base na utilizada em humanos, infere-se que a concentração plasmática de lítio nos animais também teve um aumento e poderia ser quantificável. Essa quantificação será realizada, em breve, em projetos que estão em andamento (onde foi feito o tratamento de camundongos, com a mesma dose de lítio, durante 8 meses) utilizando-se espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), que detecta a presença de metais em tecidos biológicos na ordem de parte por trilhão (SUAREZ et al., 2009).

A fim de avaliar os efeitos do lítio sobre tarefas de memória de longa e curta duração, a avaliação da memória aversiva em esquivo ativa e o reconhecimento de objeto novo foram realizados, respectivamente, como mostram as figuras 16 e 17. Inicialmente, foi verificado se a infusão do peptídeo βA_{1-40} levou ao prejuízo cognitivo esperado. Isso foi confirmado na esquivo ativa, em que o grupo infundido com βA e

tratado com água teve diminuição das respostas condicionadas, após 7 dias de infusão, em relação ao grupo infundido com veículo. É interessante observar, ainda, que os sete dias iniciais de infusão foram suficientes para causar a queda no desempenho dos animais, sugerindo que o peptídeo interferiu, de alguma maneira, na evocação da memória.

No mesmo sentido, de acordo com o desempenho do grupo βA no teste de reconhecimento de objeto novo, em que os animais não se recordaram do objeto familiar, conclui-se que o βA_{1-40} também influenciou de maneira negativa a formação da memória de curta duração. O mecanismo pelo qual esses prejuízos na formação e evocação da memória ocorrem é provavelmente pelo efeito do βA sobre a potenciação de longa duração (do inglês "*long-term potentiation*" ou LTP). Esses dados vão ao encontro de outros artigos que mostram que a presença do peptídeo βA leva a prejuízo do condicionamento de medo (AMARAL et al. 2010; KAHN et al., 2012; VIEL et al., 2012; DURK et al., 2014) e, portanto, da memória de longa duração, por inibir a LTP (CHEN et al., 2000; TSAI et al., 2015).

Inicialmente, hipotetizou-se que os prejuízos cognitivos observados eram decorrentes da formação de placas amiloides, pois trabalhos mostram que, apesar de ser menos propenso à agregação que o peptídeo βA_{1-42} , o peptídeo βA_{1-40} também se agrega (IORES-MARÇAL et al., 2006; VIEL et al., 2008; QIU et al., 2015; ZHENG et al., 2016). De acordo com estudos *in vitro* de Bitan et al. (2003), a diferença nos mecanismos de agregação seria a razão pela qual o βA_{1-42} , com apenas dois aminoácidos a mais que o βA_{1-40} , forma placas mais rapidamente. O peptídeo menor se encontra preferencialmente na forma de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros, os quais estão em equilíbrio; já o peptídeo βA_{1-42} encontra-se em formas maiores, com no mínimo cinco monômeros ligados, o que torna sua agregação mais rápida (BITAN et al., 2003).

No entanto, o grupo βA não apresentou placas amiloides, como era esperado. Assim, sugere-se que o prejuízo cognitivo observado nesse grupo seja devido à forma solúvel do peptídeo. Essa é uma hipótese relativamente recente na literatura e diversos trabalhos a sustentam (JIN et al., 2011; VIOLA; KLEIN, 2015). Li et al. (2009) mostraram, com experimentos eletrofisiológicos em fatias de cérebros de camundongo, que os oligômeros solúveis facilitaram a depressão de longa duração

(*long-term depression*) no hipocampo ao inibir a recaptação de glutamato. Figueiredo et al. (2013) mostraram que o prejuízo cognitivo causado pela injeção de oligômeros de alto peso molecular, em camundongos, foi recuperado com o tratamento com memantina, um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA, ao passo que a injeção com oligômeros de baixo peso molecular levou a prejuízos sinápticos irreparáveis.

Diversos trabalhos mostram que os oligômeros de β A interferem negativamente nas sinapses, cuja plasticidade compõe o mecanismo molecular da memória. Lacor et al. (2007) avaliaram os efeitos dos oligômeros sobre as sinapses, em células hipocâmpais em cultura, e observaram que estes se ligam preferencialmente a neurônios piramidais excitatórios, diminuindo a densidade de receptores NMDA na membrana. Com isso, o prejuízo na transmissão sináptica durante a LTP é inevitável. Em trabalho mais recente, Sinnen et al. (2016) avaliaram mais detalhadamente a interação entre os oligômeros e os receptores NMDA e concluíram que a função dos receptores foi mais prejudicada quando a sinapse estava ativa. Esse prejuízo se deu em termos de influxo de cálcio, o qual diminuiu drasticamente, antes ainda de diminuir a densidade dos receptores na membrana.

Ferreira et al. (2015) publicaram uma revisão em que reuniram diversos mecanismos pelos quais o peptídeo pode causar sinaptotoxicidade e neurotoxicidade. Além da ação nos receptores NMDA, os oligômeros levam à aglomeração de receptores metabotrópicos para glutamato mGluR5, resultando no aumento do influxo de cálcio e, conseqüentemente, em neurotoxicidade.

Vale lembrar que o influxo de cálcio pelos receptores NMDA leva à ativação de cascatas intracelulares que favorecem a plasticidade sináptica e, portanto, a LTP. Assim, diminuir o influxo deste íon através desses canais é prejudicial. O influxo de cálcio causado pela ativação de receptores mGluR5 também leva à ativação de cascatas intracelulares relacionadas à plasticidade celular, porém, por serem metabotrópicos, produzem uma resposta mais lenta em relação aos canais iônicos. De qualquer maneira, o influxo de cálcio deve ser finamente controlado, de modo que não seja pequeno a ponto de não ativar as vias necessárias, nem grande a ponto de ser tóxico para a célula.

Além disso, o peptídeo β A também leva à ativação de astrócitos e microglia (MCGEER; MCGEER, 2004; ORRE et al., 2014), resultando em aumento dos níveis

de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, as quais também podem contribuir para o prejuízo cognitivo. A resposta inflamatória é mediada, em parte, pela ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF κ B, que leva à produção de citocinas como o fator neurotrófico tumoral (TNF) e a interleucina 1 β (IL-1 β , NEWTON; DIXTI, 2012). Belarbi et al. (2012) avaliaram o efeito do TNF sobre a cognição de ratos infundidos com LPS por 28 dias e observaram um pior desempenho desse grupo, em comparação ao controle, em tarefas de memória e aprendizagem espacial, relacionado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias. No mesmo sentido, o tratamento com um inibidor de TNF recuperou as funções cognitivas ao diminuir os níveis desta citocina.

Em ensaios preliminares do nosso grupo, utilizando culturas organotípicas de hipocampo de camundongos com envelhecimento acelerado (SAMP-8), foi observado que o tratamento com 2 μ M e 20 μ M de Li₂CO₃ reduziu a produção de TNF após duas semanas. Da mesma forma, o mesmo tratamento com 2 μ M reduziu a produção de IL-6 ao longo de quatro semanas (dados não publicados), sugerindo que os íons de lítio promovem um efeito anti-inflamatório significativo, o que pode contribuir para a neuroproteção.

Como citado anteriormente, em trabalho anterior de nosso grupo (NUNES et al., 2015), observou-se que o tratamento com lítio, em animais transgênicos para DA, desde os dois meses de idade, foi eficaz em prevenir o declínio cognitivo observado no grupo transgênico sem tratamento, equiparando-se ao grupo WT. O grupo transgênico tratado com lítio desde os dez meses de idade, quando já há depósito de placas e prejuízo cognitivo, apresentou um desempenho melhor nos testes de memória que o grupo transgênico não tratado, mas não tão bom quanto os grupos WT e o transgênico tratado desde os dois meses de idade. Por essa razão, no presente trabalho, o tratamento preventivo com lítio se iniciou aos dois meses de idade. Assim, esperava-se que o grupo Lítio, tratado com o fármaco desde os dois meses de idade, não apresentasse o mesmo declínio cognitivo observado no grupo β A.

No entanto, apesar de não haver diferença estatística em relação aos tratamentos, devido à grande variabilidade intragrupos nos testes de comportamento, o grupo Lítio parece esboçar uma recuperação ao longo dos 28 dias seguintes ao teste de 7 dias na esQUIVA ativa. De acordo com a experiência prévia do grupo, sugere-

se que o tempo de infusão do peptídeo βA não foi o suficiente para produzir o mesmo grau de neurodegeneração observado nos animais transgênicos para a DA.

Outros trabalhos mostram o efeito protetor do lítio sobre a memória. Álvarez-Ruiz e Carrillo-Mora (2013) utilizaram um modelo de injeção única de βA_{25-35} em ratos previamente tratados com Li_2CO_3 (350 mg/kg) e observaram que o peptídeo não causou o mesmo prejuízo nestes animais quando comparados ao grupo sem tratamento, avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos. No entanto, no presente trabalho, o tratamento com lítio também não preveniu a perda da memória de curta duração, avaliada pelo mesmo teste, o reconhecimento de objeto novo, embora pareça haver um pequeno aumento no índice de discriminação, sugerindo que o lítio ajudou a evitar um prejuízo tão grande quanto o induzido pelo βA (Figura 17).

Mury et al. (2016) trataram ratos (8-10 semanas) com 5 ou 50 mg de cloreto de lítio por 100 dias e observaram que o tratamento prolongou a duração da memória de uma tarefa previamente aprendida, em esQUIVA INIBITÓRIA, pois o grupo sem tratamento não foi capaz de lembrar a tarefa após esse tempo, ao contrário dos dois grupos tratados. Os autores sugerem que esse efeito positivo foi devido ao aumento de proteínas da família das fosfolipases PLA2, iPLA2 e sPLA2, as quais estão envolvidas em processos de memória.

Em relação ao efeito da rivastigmina sobre o desempenho dos grupos na esQUIVA ATIVA, destaca-se que, além de evitar a queda do número de respostas condicionadas do grupo Riv, o fármaco foi eficaz em mantê-lo ao longo dos 35 dias de infusão do peptídeo (Figura 16). Portanto, é razoável supor que o aumento de acetilcolina proporcionado pela rivastigmina favoreceu projeções e/ou vias celulares que sustentam esse tipo de memória. O mesmo pode ser dito para o teste de reconhecimento de objetos, em que o grupo Riv teve um leve aumento, porém não significativo, no índice de discriminação em relação aos outros grupos (Figura 17).

Furukawa-Hibi et al. (2011) avaliaram os efeitos da rivastigmina (0,3 mg/kg) em camundongos injetados i.c.v. com βA_{1-40} e observaram uma melhora dos animais tratados, em comparação ao grupo controle, no teste de reconhecimento de objetos. Os autores propõem que o efeito benéfico observado foi devido à inibição mútua de acetil- e butirilcolinesterase e, ainda, que essa ação ocorreu em processos de

aprendizagem ou consolidação, mas não na evocação da memória. No presente trabalho, de acordo com o comportamento observado do grupo Riv na esquiva ativa (Figura 16), o papel do sistema colinérgico é reforçado na consolidação e evocação da informação, pois a tarefa foi aprendida antes da infusão, período durante o qual a rivastigmina foi administrada.

Unal et al. (2015) sugerem, com base em seus dados de eletrofisiologia e optogenética, que a acetilcolina atue facilitando a associação entre estímulo condicionado e estímulo não condicionado na amígdala, quando o pareamento temporal não é tão eficiente para a indução da plasticidade. Alguns trabalhos sugerem que, em termos de vias intracelulares, haja aumento da ativação de MAPK em decorrência da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos ou, ainda, do influxo de cálcio pelos receptores nicotínicos, levando à ativação de cascatas intracelulares e promovendo a plasticidade sináptica (FAYUK, YAKEL, 2007; CESTARI et al., 2014; MEDEIROS et al., 2014).

Em relação ao tratamento com a associação de lítio e rivastigmina, as respostas comportamentais na esquiva ativa e no teste de reconhecimento de objeto novo foram opostas. Enquanto no primeiro teste, a associação parece prejudicar a resposta ainda mais, em relação ao grupo βA e aos fármacos individualmente, no segundo, a associação resultou na melhor resposta obtida dentre os tratamentos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Uma vez que a transmissão colinérgica, aumentada pela rivastigmina, é essencial para a consolidação de memórias emocionais, como a de medo, aparentemente o lítio pode ter interferido negativamente nessa transmissão, o que justificaria a pior performance em esquiva ativa, observada nos animais com o tratamento combinado. Essa resposta comportamental não era esperada e, ademais, contraria todos os trabalhos da literatura que mostram a melhora na resposta de memória e neuroproteção após tratamento com esse metal. Dessa forma, esses dados deverão ser melhor investigados.

Confirmando esse raciocínio, nas fatias de hipocampo mantidas em cultura, observou-se que o tratamento com βA levou à morte neuronal nas áreas CA1, CA3 e GrDG (nas duas últimas áreas houve aumento não significativo da morte, Figura 6). Essa morte celular foi evitada pelo tratamento com lítio e Li+Riv. Nas fatias tratadas somente com rivastigmina, a neuroproteção em CA1 e CA3 não ocorreu, indicando

que a neuroproteção foi obtida em função do lítio (Figura 9). Por outro lado, sugere-se um efeito sinérgico da Rivastigmina ao lítio na redução da morte celular em GrDG. Em contrapartida, no hipocampo dos animais que foram submetidos à infusão com βA , não houve redução significativa da densidade de neurônios, mas houve aumento não-significativo dessa densidade com os diversos tratamentos nas três áreas analisadas (com exceção de que a rivastigmina aumentou significativamente a densidade de NeuN em GrDG).

A contradição observada entre os resultados com a adição do peptídeo βA em cultura organotípica e os obtidos com os cortes de cérebro de animais infundidos com βA evidencia o papel do ambiente sobre a resposta, isto é, quando se fala em cultura de fatias de hipocampo, o ambiente é muito restrito. Conexões com outras áreas foram interrompidas, além de o tecido estar exposto diretamente aos tratamentos. Por outro lado, quando se analisa um corte de cérebro, em que as intervenções foram realizadas enquanto o cérebro estava no animal inteiro, sujeito à influência de outros fatores, analisam-se as respostas aos tratamentos com todo o suporte do organismo. Vários trabalhos discutem, por exemplo, um aumento de neurogênese em cérebros de pacientes de Alzheimer e em modelos animais de neurodegeneração (MU; GAGE, 2011; WINNER; WINKLER, 2015)

Avaliou-se, ainda, a densidade de sinaptofisina, proteína encontrada em vesículas pré-sinápticas nos neurônios (Figura 21). Como os prejuízos sinápticos ocorrem antes da deposição de placas e morte neuronal, na DA, esperava-se uma diminuição de sinaptofisina no grupo βA , indicando uma degeneração sináptica - o que daria suporte, ainda, aos resultados obtidos nos testes de memória. De fato, houve diminuição dessa proteína no córtex pré-frontal, área também relacionada com os processos de memória, mas não no hipocampo, onde parece ter havido um leve aumento (não significativo) de sinaptofisina em relação ao grupo veículo. Harwell e Coleman (2016) demonstram, em cultura organotípica de hipocampo de camundongos transgênicos para DA, que, ao passo que ocorre o acúmulo de βA_{1-40} e βA_{1-42} intraneuronal, proteínas sinápticas, como a sinaptofisina e punctas diminuem, indo ao encontro dos dados obtidos no córtex pré-frontal nesse trabalho.

Os tratamentos, por sua vez, surpreenderam por não impedir esse prejuízo sináptico, embora haja um aumento não significativo da densidade de sinaptofisina na

área CA3 do hipocampo. Bailey e Lahiri (2011) observaram aumento de proteínas pré-sinápticas, como a sinaptofisina e a SNAP-25, decorrente do tratamento com o anticolinesterásico, indicando que esse pode ser um mecanismo de neuroproteção da rivastigmina. O lítio também promoveu crescimento dendrítico, avaliado pela densidade de proteínas sinápticas em um modelo celular, em que se observou aumento dos níveis de sinaptofisina e outras proteínas pré-sinápticas após o tratamento com o fármaco (PARK et al., 2015), ao contrário dos dados obtidos nesse trabalho.

Existem outros mecanismos de neuroproteção propostos para o lítio, como por exemplo a indução de autofagia. Além disso, como não houve formação de placas amiloides em nenhum dos grupos infundidos com βA , poderia ter havido aumento de autofagia nesses grupos a fim de eliminar o peptídeo.

Para a avaliação do processo autofágico, uma opção é utilizar a proteína LC3-II, que está presente na membrana de autofagossomos (AFGs), e um substrato do processo, como a proteína p62. Nos ensaios de imunofluorescência (Figuras 25 a 27), não foi observada diferença entre os grupos veículo e βA , tanto para formação de punctas de LC3-II quanto de p62, indicando que não houve alteração do processo autofágico.

Uma vez que não foi possível avaliar os efeitos dos tratamentos neste ensaio, a autofagia foi reavaliada por *western blot* no hipocampo de camundongos infundidos com veículo ou βA_{1-42} , em que foi observado um aumento de LC3-II no grupo βA (Figura 28). O aumento de LC3-II pode indicar tanto indução como bloqueio da autofagia: em casos de indução, haverá aumento da formação de autofagossomos; por outro lado, se houver bloqueio da autofagia, também pode ser observado aumento de LC3, indicando que, dada a interrupção do fluxo, o processo está bloqueado naquele ponto e, com isso, há o acúmulo de AFG e, portanto, de LC3-II (KLIONSKY et al., 2012). Por isso, deve-se avaliar um outro ponto do fluxo, como um substrato do processo. Como não houve diferença em relação ao substrato p62, entre veículo e βA , infere-se que o peptídeo induziu o processo autofágico, ao contrário do que se esperava e do que outros trabalhos mostram (REDDY et al., 2018; SALMINEN et al., 2013).

Por outro lado, o trabalho de Son et al. (2012) demonstrou que o β A induziu a formação de vacúolos autofágicos, detectada pelo aumento de LC3-II, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, mediada pela sinalização de cálcio/proteína quinase quinase β dependente de calmodulina. Os autores concluíram, ainda que o fluxo da autofagia não estava bloqueado, pois não houve alteração dos níveis de p62. Por fim, os autores sugerem que o β A promove neurodenervação por ativar a via RAGE-CaMKK β -AMPK. RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) é um receptor da superfamília de imunoglobulinas, que interage com diversos ligantes, sendo um deles o β A. Sua ativação pelo peptídeo leva a aumento de cálcio intracelular, o qual ativa a via de CaMKK β -AMPK, levando à formação de AFG, além de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), resposta inflamatória e apoptose (SON et al., 2012).

O β A leva à produção de espécies reativas de oxigênio por interação direta com o complexo I da cadeia respiratória, inibindo-o, o que, por sua vez, resulta em danos também no complexo IV (BOBBA et al., 2014). Outros trabalhos, realizados em cérebros de pessoas com DA, corroboram esse fato, de que o complexo I encontra-se danificado nessa doença, diminuindo a produção de energia e aumentando os níveis de EROs (AKSENOV et al., 1999; SULLIVAN, BROWN, 2005). As EROs podem induzir a autofagia atuando como sinalizadores celulares, por meio, principalmente, do ânion superóxido, que leva a aumento do marcador LC3-II (CHEN et al., 2009). Essa é uma possível via para explicar a indução de autofagia observada nesse trabalho, embora não se tenha medido os níveis de EROs nesses animais. Por outro lado, uma vez que houve aumento da autofagia no grupo β A, supõe-se que essa foi a razão pela qual não houve formação de placas amiloides, ou seja, o *clearance* do peptídeo foi eficiente.

O tratamento com lítio impediu a indução de autofagia promovida pelo β A e a manteve no mesmo nível do grupo veículo. Grande parte da literatura mostra que o lítio induz autofagia de maneira independente de mTor, ao diminuir os níveis de inositol na célula (SARKAR et al., 2005; SHIMADA et al., 2012; HOU et al., 2015). Vale ressaltar que a dose utilizada nesse trabalho é menor que a terapêutica, sugerindo que em microdose, o lítio não é capaz de induzir autofagia.

O tratamento com rivastigmina, por sua vez, inibiu o processo autofágico, uma vez que houve diminuição dos níveis de LC3-II e p62. Esse resultado é intrigante, considerando que, nesse caso, a autofagia seria um processo benéfico para as células, como tentativa de eliminar peptídeo, mas houve diminuição. Além disso, nos testes de memória, os grupos tratados com o anticolinesterásico tiveram um bom desempenho. Apesar de haver na literatura trabalhos que mostram alguns efeitos neuroprotetores desse tratamento, não foi encontrado nenhum trabalho que avaliasse os efeitos da rivastigmina sobre o processo autofágico. A resposta autofágica do grupo Li+Riv seguiu a do grupo Riv, evidenciando que a rivastigmina foi a responsável pelo efeito.

Em alternativa, Jiang et al. (2018) avaliaram os efeitos do tratamento com a galantamina, outro anticolinesterásico, sobre o processo autofágico em um modelo celular, utilizando a linhagem PC-12, tratada com βA_{1-42} . Nesse trabalho, os autores argumentam que o βA pode levar ao excesso de autofagia e, de fato, observaram que o peptídeo resultou em aumento de autofagia. O tratamento com galantamina, por sua vez, preveniu esse aumento, além de diminuir a produção de EROs nesse modelo. Os autores associaram o aumento de autofagia à apoptose (autofagia citotóxica), por isso o bloqueio foi benéfico. Não obstante, destaca-se que se o tipo de autofagia induzida pelo βA pode levar à apoptose e, assim, morte neuronal, novamente o lítio promoveu neuroproteção, assim como observados na cultura organotípica a proteção do lítio na morte neuronal.

Por fim, considerando o trabalho de Nunes et al. (2015), a partir do qual se desenhou esse, esperava-se que os efeitos neuroprotetores do lítio fossem mais pronunciados, em relação aos aspectos cognitivos e moleculares. Vale lembrar, no entanto, que foram utilizados modelos animais diferentes. No trabalho de 2015, em que o tratamento com lítio levou a grandes efeitos protetores, utilizaram-se camundongos transgênicos que hiperexpressam a APP, ao passo que, no presente trabalho, utilizou-se um modelo de infusão de βA . Essa é uma diferença importante, pois ao comparar os resultados de ambos os trabalhos, pode-se sugerir que o lítio exerça seu papel protetor em etapa anterior ao acúmulo de βA , como no processamento da APP, o que não pôde ser observado com esse modelo, já que se infunde o peptídeo em sua forma final e tóxica. Essa hipótese ganha força com o

trabalho de Wilson et al. (2017), em que os autores demonstram que uma formulação de microdose de lítio (40 µg/kg), nomeado NP03, foi capaz de restabelecer a memória e o aprendizado em um modelo animal transgênico para DA, por meio da inibição da BACE e inativação da GSK-3β.

Alguns pontos podem ser estudados em maior profundidade, como os efeitos da microdose de lítio no processamento da APP e os efeitos da rivastigmina sobre a autofagia. Compreender melhor como esses fármacos levam à neuroproteção abre novas possibilidades terapêuticas, para que se possa conferir mais qualidade de vida às pessoas com DA e seus familiares.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que tanto o tratamento com lítio quanto com a rivastigmina promovem efeitos benéficos, não havendo uma diferença significativa entre os dois para a melhora da condição experimental estabelecida. Dessa forma, o tratamento com lítio foi melhor em prevenir a morte celular em fatias de hipocampo em cultura e aumentar, mesmo que de forma não-significativa, a densidade da neurotrofina BDNF. O lítio não apresentou atividade anticolinesterásica, diferente do observado (e esperado) com a rivastigmina.

A associação Li+Riv, por sua vez, não promoveu um efeito sinérgico notável *in vivo* ou *in vitro*, sendo observado, inclusive um pior desempenho dos animais em um dos testes de memória e um melhor desempenho em outro teste. O tratamento combinado, assim como a rivastigmina per se, reduziu o processo autofágico estimulado pela presença do peptídeo βA , mas não produziu diferença na densidade de neurônios ou de terminais sinápticos.

Com isso, conclui-se que, no modelo experimental utilizado, não há uma diferença de potência entre os dois fármacos e que a associação dos medicamentos não altera de forma significativa a proteção conferida por ambos, isoladamente.

REFERÊNCIAS³

AKSENOV, M. Y. et al. The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease. **Neurochem Res**, New York, v. 24, p. 767–774, 1999.

ALONSO, A.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IGBAL, K. Alzheimer's Disease Hyperphosphorylates tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. **Nat Med**, New York, v. 2, n. 7, p. 783-787, 1996.

ALVAREZ, A. et al. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. **J Neurosci**. Baltimore, v. 18, n. 9, p. 3213-23, 1998.

ÁLVAREZ-RUIZ, Y.; CARRILLO-MORA, P. Amyloid beta 25-35 impairs reconsolidation of object recognition memory in rats and this effect is prevented by lithium carbonate. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 548, p. 79-83, 2013.

AMARAL, F. A. et al. Participation of kinin receptors on memory impairment after chronic infusion of human amyloid-beta 1-40 peptide in mice. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 44, n. 2, p. 93-7, 2010.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**, v. 13, p. 93–110, 2012.

BAILEY, J. A.; LAHIRI, D. K. A novel effect of rivastigmine on pre-synaptic proteins and neuronal viability in a neurodegeneration model of fetal rat primary cortical cultures and its implication in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, Oxford, n. 112, p. 943-53, 2010.

BAKER-NIGH, A. et al. Neuronal amyloid- β accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. **Brain**, London, n. 138, pt 6, p. 1722-37, 2015.

BALDESSARINI, R. J.; TARAZI, F. I. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap.20, p. 485-520.

BALLATORE, C.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nat Rev Neurosci**, London, v. 8, p. 663–72, 2007.

³ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BARROS, M. D. et al. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. **Neurosci**, v. 126, n. 3, p. 651-6, 2004.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, Washington, v. 217, n. 4558, p. 408-14, 1982.

BELARBI, K. et al. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. **J Neuroinflammation**, London, p. 9-23, 2012.

BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. **Pharmacol Ther**, Oxford, v. 148, p. 114-31, 2015.

BIRKS, J. S.; CHONG, L. Y.; GRIMLEY EVANS, J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 22, n. 9, CD001191, 2015.

BITAN, G. et al. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 100, n. 1, p. 330-5, 2003.

BOBBA et al. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 13, p. 298-311, 2014.

BOTTINO, C. M. C. Estimate of Dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. **Dement Geriatr Cogn Disor**, v. 26, p. 291-299, 2008.

BRION, J. P. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, Oxford, v. 61, p. 2071-80, 1996.

BUDSON, A. E.; SOLOMON, P. R. Cholinesterase Inhibitors. In: Memory loss, Alzheimer's Disease, and Dementia. A practical guide for clinicians. _____:Elsevier. Capítulo 16, p. 160-73, 2016.

BUSCIGLIO, J. et al. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 90, n. 5, p. 2092-96, 1993.

BRION, J. P. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, Oxford, v. 61, p. 2071-80, 1996.

BRUCE, A. J.; MALFROY, B., BAUDRY, M. β -Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 93, p. 2312-6, 1996.

CAMPANARI, M. L. et al. Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and γ -secretase activity. **J Alzheimers Dis**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 911-24, 2014.

CASTRO, C.; MARTINEZ, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 12, p. 4377-87, 2006.

CESTARI, V. et al. The MAP(K) of fear: from memory consolidation to memory extinction. **Brain Res Bull**, Phoenix, v. 105, p. 8-16, 2014.

CHEN, Q. S. et al. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid β -peptides. **J Neurosci Res**, New York, v. 60, p. 65-42, 2000.

CHEN, Y.; AZAD, M. B.; Gibson, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. **Cell Death Differ**, Oxford, v. 16, p. 1040-52, 2009.

CIMAROSTI, H. et al. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 315, p. 33-6, 2011.

CROCE, N. et al. Effects of lithium and valproic acid on BDNF protein and gene expression in an in vitro human neuron-like model of degeneration. **J Psycopharm**, v. 28, n. 10, p. 964-72, 2014.

DAMRI, O. et al. Effects of lithium and valproic acid on BDNF protein and gene expression in an in vitro human neuron-like model of degeneration. **Eur Neuropsychopharmacol**, Amsterdam, v. 25, p. 425-34, 2015.

DEGASPARI, S. et al. Altered KLOTHO and NF- κ B-TNF- α Signaling Are Correlated with Nephrectomy-Induced Cognitive Impairment in Rats. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n.5, e0125271, 2015.

DENG, J. et al. Soluble amyloid precursor protein alpha (sAPP α) inhibits tau phosphorylation through modulation of GSK3 β signaling pathway. **J Neurochem**, Oxford, v. 135, n. 3, p. 630-7, 2015.

DURK, M. R. et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces cerebral amyloid- β accumulation and improves cognition in mouse models of Alzheimer's Disease. **Neurobiol Dis**, Orlando, v. 34, n. 21, p. 7091-101, 2014.

DUTTA, A. et al. Structural elucidation of the binding site and mode of inhibition of Li⁺ and Mg²⁺ in inositol monophosphatase. **FEBS J**, Oxford, v. 281, p. 5309-24, 2014.

EHRET, M. J.; CHAMBERLIN, K. W. Current practices in the treatment of Alzheimer Disease: where is the evidence after the phase III trials?. **Clin Ther**, Princeton, v. 37, n. 8, p. 1604-16, 2015.

FAYUK, D.; YAKEL, J. L. Dendritic Ca²⁺ signalling due to activation of alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. **J Physiol**, London, v. 582, p. 597-611, 2007.

FEINSTEIN, S. C.; WILSON, L. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1739, p. 268-79, 2005.

FERREIRA, S. T. et al. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Front Cell Neurosci**, Lausanne, v. 9, n. 191, 2015.

FIGUEIREDO, C. P. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight $\alpha\beta$ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. **J Neurosci**, Baltimore, v. 33, n. 23, p. 9626-34, 2013.

FJELL, A. M. et al. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. **Prog Neurobiol**, Oxford, v. 117, p. 20-40, 2014.

FORLENZA, O. V. et al. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. **Br J Psychiatry**, London, v. 198, p. 351-6, 2011.

FORLENZA, O. V.; DE-PAULA, V. J. R.; DINIZ, B. S. O. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's Disease and related neurodegenerative disorders. **ACS Chem Neurosci**, Washington, v. 5, n. 6, p. 443-50, 2014.

FORNER, S. et al. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony. **Trends Neurosci**, Cambridge, v. 40, n. 6, p. 347-57, 2017.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3. ed. Elsevier Inc, 2008.

FRAUTCHY, S. A. Protease inhibitor coinfusion with amyloid beta-protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain. **J Neurosci**, Baltimore, v. 18, n. 20, p. 8311-21, 1998.

FROTA, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, São Paulo, v. 5, p. 5-10, 2011. Supplement 1.

FUJII, T. et al. Enhancement of hippocampal cholinergic neurotransmission through 5-HT_{1A} receptor-mediated pathways by repeated lithium treatment in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 78, p 392-9, 2000.

FURUKAWA, K. et al. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. **J Neurochem**, Ottawa, v. 67, p. 1882-96, 1996.

FURUKAWA-HIBI, Y. et al. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 222-9, 2011.

GARCÍA-AYLLÓN, M. S.; SILVEYRA, M. X.; SÁEZ-VALERO, J. Association between acetylcholinesterase and beta-amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 175, n. 1-3, p. 209-15, 2008.

GAUTHIER, S. Advances in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **CMAJ**, Ottawa, v. 166, n. 5, p.616-23, 2002.

GERHARD, T. et al. Lithium treatment and risk for dementia in adults with bipolar disorder: population-based cohort study. **Br J Psychiatry**, London, v. 207, n. 1, p. 46-51, 2015.

GEULA, C. et al. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. **Nat Med**, New York, v. 4, n. 7, p. 827-31, 1998.

GITLIN, M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies. **Int J Bipolar Disord**, v. 4, n. 27, 2016.

GOREVIC, P. et al. Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque cores in Alzheimer's disease: immunohistological studies. **J Neuropathol Exp Neurol**, Baltimore, v. 45, n. 6, p. 647-64, 1986.

GRÜNFELD, J. P.; ROSSIER, B. C. Lithium nephrotoxicity revisited. **Nat Rev Nephrol**, Londond, v. 5, p. 270–6, 2009.

HAN, W. et al. Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. **Medical Hypothesis**, v. 76, p. 543-6, 2011.

HARWELL, C. S.; COLEMAN, M. P. Synaptophysin depletion and intraneuronal A β in organotypic hippocampal slice cultures from huAPP transgenic mice. **Mol Neurodegener**, v. 11, p. 44, 2016.

HOU, L. et al. Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement. **BMC Neurosci**, London, v. 16, p. 82, 2015.

IBACH, B.; HAEN, E. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 10, p. 231-51, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Projeção da População do Brasil por sexo e Idade para o Período 1980-2050. Rio de Janeiro; 2010.

IORES-MARÇAL, L. M. et al. Bradykinin release and inactivation in brain of rats submitted to an experimental model of Alzheimer's disease. **Peptides**, New York, v. 27, n. 12, p. 3363-9, 2006.

JABER, N. et al. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 109, n. 6, p. 2003-8, 2012.

JIANG, T. et al. Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors. **Curr Alzheimer Res**, v. 10, n. 8, p. 852-67, 2013.

JIANG, S. et al. Galantamine inhibits β -amyloid-induced cytostatic autophagy in PC12 cells through decreasing ROS production. **Cell Prolif**, Oxford, v. 51, n. 3, e12427, 2018.

JIN, M. et al. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 108, n. 14, p. 5819-24, 2011.

JING, P. et al. GSK3 β mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. **J Neurochem**, Oxford, v. 104, p. 409-19, 2008.

JOPE, R. S. Effects of lithium treatment in *vitro* and in *vivo* on acetylcholine metabolism in rat brain. **J Neurochem**, Oxford, v. 33, p. 487-97, 1979.

JUNG, C.K.; HERMS, J. Role of APP for dendritic spine formation and stability. **Exp Brain Res**, Berlin, v. 217, n.3-4, p. 463-70, 2012.

KAYED, R.; LASAGNA-REEVES, C. A. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. **J Alzheimers Dis**, Amsterdam, v. 33, p. S67-S78, 2013.

KAHN, M. S. et al. Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 229, p. 176-84, 2012.

KHAN, S. S.; BLOOM, G. S. Tau: the center of a signaling nexus in Alzheimer's disease. **Front Neurosci**, Lausanne, v. 10, n. 31, 2016.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, Georgetown, v. 8, n. 4, p. 445-544, 2012.

LACOR, P. N. et al. A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, Orlando, v.27, n. 4, p. 796-807, 2007.

LAMB, C. A.; JOACHIM, J.; TOOZE, S. A. Quantifying autophagic structures in mammalian cells using confocal microscopy. **Methods enzymol**, New York, v. 587, p. 21-42.

LEDOUX, J. M. Features of the comparative pharmacokinetics of lithium; a potential application of its use in livestock farming. **Med Hypotheses**, Edinburgh, v. 61, n.2, p. 278-81, 2003.

LEE, C. Y.; LANDRETH, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. **J Neural Transm**, Wien, v. 117, n. 8, p. 949-60, 2010.

LI, S. et al. Soluble oligomers of amyloid beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. **Neuron**, Cambridge, v. 62, n. 6, p.788-801, 2009.

LIU, Z. et al. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β phagocytosis. **J Neurosci**, Baltimore, v. 30, n. 50, p. 17091-101, 2010.

LOVESTONE, S. et al. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. **Curr Biol**, London, v. 4, n. 12, p. 1077-86, 1994.

LUDEWIG, S.; KORTE, M. Novel insights into the physiological function of the APP (gene) family and its proteolytic fragments in synaptic plasticity. **Front Mol Neurosci**, Lausanne, v. 9, n. 61, 2017.

MATTSON, M. P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 77, p. 1081-1132, 1997.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation and the Degenerative Diseases of Aging. **Ann N Acad Sci**, New York, v. 1035, p. 104–16, 2004.

MEDEIROS, R. et al. $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist enhances cognition in aged 3xTg-AD mice with robust plaques and tangles. **Am J Pathol**, New York, v. 184, n. 2, p. 520-9, 2014.

MOHAMED, L. A.; QOSA, H.; KADDOUMI, A. Age-related decline in brain and hepatic clearance of amyloid-beta is rectified by the cholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine in rats. **ACS Chem Neurosci**, Washington, v. 6, n. 5, p. 725-36, 2015.

MOTOI, Y. et al. Lithium and autophagy. **ACS Chem Neurosci**, Washington, v. 5, n. 6, p. 434-42, 2014.

MU, Y.; GAGE, F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener**, v. 6, n. 85, 2011. doi: 10.1186/1750-1326-6-85.

MÜLLER, U. C.; DELLER, T.; KORTE, M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. **Nat Rev Neurosci**, London, v. 18, n. 5, p. 281-298, 2017.

MURY, F. B. et al. Lithium activates brain phospholipase A2 and improves memory in rats: implications for Alzheimer's disease. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, Berlin, v. 266, p. 607–18, 2016.

NEWTON, K.; DIXTI, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, a006049, 2012.

NITRINI, R. et al. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, Hagerstown, v. 18, p. 241-246, 2004.

NIXON, R. A. et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. **J Neuropathol Exp Neurol**, Baltimore, v. 64, n. 2, p. 113-22, 2005.

NOTT, A.; LEVIN, E. D. Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and memory. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1081, n.1, p. 72-8, 2006.

NUNES, P. V.; FORLENZA, O. V.; GATTAZ, W. F. Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnesic mild cognitive impairment. **Rev Psiq Clín**, v. 34, n. 6, p. 294-5, 2007.

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

NUNES, M. A. et al. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 11, e0142267, 2015.

OLIVEIRA, R. L. et al. Inhibitory effect of lithium on nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Neurotoxicol Teratol**, New York, v. 33, p. 651-7, 2011.

ORUCH, R. et al. Lithium: A review of pharmacology, clinical uses, and toxicity. **Eur J Pharmacol**, Berlin, v. 740, p. 464-73, 2014.

ORRE, M. et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. **Neurobiol Aging**, New York, v.35, p. 2746-2760, 2014.

PARK, S. W. et al. Effects of mood-stabilizing drugs on dendritic outgrowth and synaptic protein levels in primary hippocampal neurons. **Bipolar Disord**, Copenhagen, v. 17, p. 278-290, 2015.

PARRI, H. R.; HERNANDEZ, C. M.; DINELEY, K. T. Research update: $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 82, p. 931-42, 2011.

PHIEL, C. J.; KLEIN, P. S. Molecular targets of lithium action. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 789-813, 2001.

PODUSLO, J. F. et al. HH domain of Alzheimer's Disease $A\beta$ provides structural basis for neuronal binding in PC12 and mouse cortical/hippocampal neurons. **PloS One**, San Francisco, v. 5, n. 1, e8813. doi:10.1371/journal.pone.0008813

QIU, T. et al. $A\beta 42$ and $A\beta 40$: similarities and differences. **J Pept Sci**, Chichester, v. 21, p. 522-9, 2015.

QUIROZ, J. A.; GOULD, T. D.; MANJI, H.K. Molecular effects of lithium. **Mol Interv**, Bethesda, v. 4, n.5, p. 259-72, 2004.

QUIROZ, J. A. et al. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. **Neuropsychobiology**, Basel, v. 62, p. 50–60, 2010.

RACCHI, M. et al. Short- and long-term effect of acetylcholinesterase inhibition on the expression and metabolism of the amyloid precursor protein. **Mol Psychiatry**, Houndmills, v. 6, p. 520–528, 2001.

RAJAMOHAEDSAIT, H. B.; SIGURDSSON, E. M. Histological Staining of Amyloid and Pre-Amyloid Peptides and Proteins in Mouse Tissue. **Methods Mol Biol**, Totowa, v. 849, p. 411-24, 2012.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 90, n. 4, p.1383-435, 2010.

REDDY, P. H. et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, Oxford, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy154>.

REJ, S. et al. Lithium dosing and serum concentrations across the age spectrum: from early adulthood to the tenth decade of life. **Drugs Aging**, Auckland, v. 31, p. 911–916, 2014.

REZVANI, A. H. et al. 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**, Oxford, v. 33, p. 269–75, 2009.

SALAMONE, A. et al. Inhibitory effects of beta-amyloid on the nicotinic receptors which stimulate glutamate release in rat hippocampus: the glial contribution. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 723, p.314–21, 2014.

SALMINEN, A. et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. **Prog Neurobiol**, Oxford, v. 106–107, p. 33–54 2013

SANTACRUZ, K. et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. **Science**, Washington, v. 309, p.476–81, 2005.

SARASWATI, A. P. et al. Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: potential target for various therapeutic conditions. **Eur J Med Chem**, Paris, v. 144, 843e858, 2018.

SARKAR, S. et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. **J Cell Biol**, New York, v. 170, n. 7, p. 1101-11, 2005.

SCHAEFFER, V. et al. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. **Brain**, London, v. 135, n. 7, p. 2169-77, 2012.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. **J Neuropathol Exp Neurol**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 438-47, 1994.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A Doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr RS**, v. 30, n. 1, supl., 2008.

SHERMAN, M. A. et al. Soluble conformers of A β and tau alter selective proteins governing axonal transport. **J Neurosci**, Baltimore, v. 36, n. 37, p. 9647–9658, 2016.

SHANKAR, G. M.; WALSH, D. M. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . **Mol Neurodegener**, v. 4, p. 48, 2009.

SHIMADA, K. et al. Long-term oral lithium treatment attenuates motor disturbance in tauopathy model mice: implications of autophagy promotion. **Neurobiol Dis**, Orlando, v. 46, n.1, p. 101-8, 2012.

SINNEN, B. L. et al. Local and use-dependent effects of β -amyloid oligomers on NMDA receptor function revealed by optical quantal analysis. **Neurobiol Dis**, Orlando, v. 36, n. 45, p. 11532-43, 2016.

SIVAPRAKASAM, K. Towards a unifying hypothesis of Alzheimer's Disease: cholinergic system linked to plaques, tangles and neuroinflammation. **Curr Med Chem**, Schiphol, v. 13, p. 2179-88, 2006.

SON, S. M. et al. A β -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK β -AMPK signaling. **Neurobiol Aging**, New York, v. 33, 1006.e11–1006.e23, 2012.

SUAREZ, C. et al. Sequential Injection Analysis (SIA) for Arsenic Speciation by Capillary Electrophoresis Hyphenated to Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry (CE-ICP-SFMS). **Spectrosc Lett** (Print), v. 42, p. 376-382, 2009.

SULLIVAN, P. G., BROWN, M. R. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. **Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, p. 407–410, 2005.

TAKATA, K. et al. Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 285, n. 51, p. 40180-91, 2010.

TELLES, M. **Relação entre sistema colinérgico e formação de reserva cognitiva após treino de atenção semanal em camundongos infundidos cronicamente com peptídeo β -amiloide**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THIBAULT, B. A. et al. Adverse effects of cholinesterase inhibitors in dementia, according to the pharmacovigilance databases of the United States and Canada. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 12, e0144337, 2015.

THINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 283, p. 29615-9, 2008.

TSAI, F. S. et al. Ferulic acid reverses the cognitive dysfunction caused by amyloid β peptide 1-40 through anti-oxidant activity and cholinergic activation in rats. **Am J Chin Med**, Garden City, v. 43, n. 2, p. 1-17, 2015.

UNAL, C. T.; PARE, D.; ZABORSZKY, L. Impact of basal forebrain cholinergic inputs on basolateral amygdala neurons. **J Neurosci**, Baltimore, v. 35, n. 2, p. 853– 863, 2015.

VALLÉE, A.; LECARPENTIER, Y. Alzheimer Disease: crosstalk between the canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. **Front Neurosci**, Lausanne, v. 10, n. 459, 2016. doi: 10.3389/fnins.2016.00459 2016

VENNERI, A.; LANE, R. Effects of cholinesterase inhibition on brain white matter volume in Alzheimer's disease. **Neuroreport**, Oxford, v. 20, p. 285–288, 2009.

VIEL, T. A. et al. Chronic infusion of amyloid- β peptide and sustained attention altered $\alpha 7$ nicotinic receptor density in the rat brain. **Curr Alzheimer Res**, v. 9, n. 10, p. 1210-20, 2012.

VIEL, T. A. et al. Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats. **Neurobiol Aging**, New York, v. 29, p. 1805-14, 2008.

VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta Neuropathol**, v. 129, p. 183–206, 2015.

WALLACE, J. Calcium dysregulation, and lithium treatment to forestall Alzheimer's disease – a merging of hypotheses. **Cell Calcium**, Edinburgh, v. 55, p. 175-181, 2014.

WILLEM, M. et al. β -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. **Nature**, London, v. 526, n. 7573, p. 443-7, 2015.

WILSON, E. N. et al. BACE1 inhibition by microdose lithium formulation NP03 rescues memory loss and early stage amyloid neuropathology. **Transl Psychiatry**, v. 7, e1190, 2017. doi:10.1038/tp.2017.169

WINNER, B.; WINKLER, J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 4, a021287, 2015. doi:10.1101/cshperspect.a021287

WOOD, A. J. et al. The pharmacokinetic profile of lithium in rat and mouse; an important factor in psychopharmacological investigation of the drug. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1285-88, 1986.

YAN, J. et al. Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, New York, v. 36, p. 211-27, 2015.

ZHENG, H.; KOO E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. **Molecular Neurodeg**, p. 1-5, 2006.

ZHENG, W. et al. Exploring the aggregation free energy landscape of the amyloid- β protein (1–40). **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 113, n. 42, p. 11835-40, 2016.

ZHOU, X. et al. Acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine enhances cellular defenses in neuronal and macrophage-like cell lines. **Transl Res**, New York, v. 153, n. 3, p. 132-41, 2009.

ZUSSY, C. et al. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, e53117, 2013.