FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSIQUIATRIA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMUSP

GIANCARLO DE MATTOS CARDILLO

**Comprimento telomérico no sistema nervoso central de um modelo de
doença de Alzheimer tratado com lítio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2018

GIANCARLO DE MATTOS CARDILLO

**Comprimento telomérico no sistema nervoso central de um modelo de
doença de Alzheimer tratado com lítio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cardillo, Giancarlo de Mattos
Comprimento telomérico no sistema nervoso
central de um modelo de doença de Alzheimer tratado
com lítio / Giancarlo de Mattos Cardillo. -- São
Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Orestes Vicente Forlenza.

Descritores: 1.Telômeros 2.Doença de Alzheimer
3.Camundongos transgênicos 4.Lítio 5.Hipocampo
6.Logo parietal 7.Mucosa olfatória

USP/FM/DBD-068/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Aos meus pais e meu irmão, por não
medirem esforços para que todas as
minhas conquistas fossem possíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador Prof. Orestes Vicente Forlenza pela orientação e paciência, bem como por ter abarcado prontamente no projeto. Todas as discussões e considerações se fizeram inestimáveis e parte integrante do meu desenvolvimento acadêmico.

Sou muito grato ao Prof. Daniel Shikanai Kerr, meu Co-orientador de consideração, por ter permitido que o projeto saísse do mundo das ideias e se concretizasse no que é hoje. Agradeço por todo treinamento técnico e científico, inúmeras discussões e esparecimentos, e toda assistência tanto presente quanto remota.

Agradeço à Dra. Vanessa de Paula por todas as conversas e por ler e discutir o trabalho tantas vezes. Sou especialmente grato por sempre ter a disposição de ouvir e a sinceridade de falar. Obrigado por me inspirar a buscar patamares cada vez maiores.

Agradeço à Carolina Argondizo Correia, minha namorada e parceira incondicional nessa e em tantas outras etapas da minha vida. Cada crítica, puxão de orelha, conversa e abraço me deu a confiança e impulso para concretizar esse trabalho, bem como projetar tantas outras possibilidades.

Agradeço ao Gabriel Polho por toda ajuda e discussões de protocolo, que foram fundamentais para a minha maturidade científica e entendimento de todas as metodologias. E aqui ficam também minhas desculpas por ter introduzido os telômeros na sua vida, certamente os seus encurtaram nesse tempo de iniciação científica.

Meus mais sinceros agradecimentos a toda equipe do LIM-27, por se fazerem sempre presentes e solícitos. Gostaria de agradecer especialmente à Eliza e Luciana pelo apoio imprescindível no tratamento dos animais.

Agradeço e dedico este trabalho a todos os animais de pesquisa, tão fundamentais para o avanço do conhecimento.

Agradeço às agências de fomento FAPESP e CNPq (através da Chamada Universal) pelo financiamento do projeto.

*“The music is all around us,
All you have to do is listen”*

August Rush

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de figuras, tabelas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Telômeros	1
1.1.1.	Histórico.....	1
1.1.2.	Estrutura dos telômeros.....	3
1.1.3.	Encurtamento telomérico	5
1.1.4.	Manutenção do comprimento telomérico: Telomerase	6
1.2.	Doença de Alzheimer	7
1.2.1.	Epidemiologia e Fisiopatologia	7
1.2.2.	Histórico.....	8
1.2.3.	Aspectos moleculares da DA.....	10
1.3.	Telômeros na doença de Alzheimer.....	14
1.4.	Lítio	16
1.4.1.	Aspectos neuroprotetores.....	16
1.4.2.	Lítio e telômeros	16
1.5.	Modelos animais no estudo da doença de Alzheimer	19
1.5.1.	Histórico.....	19
1.5.2.	Modelo triplo-transgênico (3xTg-AD)	20
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1.	Objetivo Geral	23
3.2.	Objetivos Específicos	23
4	MÉTODOS.....	24
4.1.	Tratamento dos Animais.	24
4.2.	Determinação da litemia.....	24
4.3.	Extração do DNA.....	25
4.4.	Avaliação da integridade do DNA genômico	25
4.5.	PCR em tempo real.....	26
4.6.	Curva padrão e quantificação absoluta do tamanho telomérico.....	26

4.7.	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	29
5.1.	Avaliação do comprimento telomérico em diferentes estruturas cerebrais	29
5.2.	Análise do comprimento telomérico no córtex parietal	30
5.3.	Análise do comprimento telomérico no hipocampo	32
5.4	Análise do comprimento telomérico no epitélio olfatório	34
6	DISCUSSÃO.....	35
7	CONCLUSÃO	39
8	REFERÊNCIAS	40
ANEXOS		56
	Artigos publicados durante o mestrado.....	56
	Trabalhos apresentados em conferências.....	56
	Artigos aceitos para publicação durante o mestrado.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Duplicação do DNA	2
Figura 2 - Relação entre o complexo shelterina e telômero.	5
Figura 3 - Marcos fisiopatológicos da doença de Alzheimer.	12
Figura 4 - Processamento da proteína precursora de amiloide (APP).	13
Figura 5 - Mecanismo indireto de influência do lítio sobre a telomerase	18
Figura 6 - Linha do tempo dos achados fisiopatológicos do modelo triplo transgênico para a DA (3xTg-AD)	21
Tabela 1 - Representação dos valores de comprimento telomérico nas diferentes estruturas cerebrais de animais TG e WT.	29
Figura 7 – Comparação do comprimento telomérico no córtex parietal dos animais	31
Figura 8 - Comparação do comprimento telomérico no hipocampo dos animais	33
Figura 9 - Comparação do comprimento telomérico no epitélio olfatório dos animais	34

LISTA DE SIGLAS

3xTg-AD	Modelo Animal Triplo Transgênico Para a Doença de Alzheimer
APP	Amyloid Precursor Protein
A β	β -amiloide
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Ct	Threshold Cycle
DA	Doença de Alzheimer
DP	Desvio Padrão
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Quinta Edição
ENFs	Emaranhados Neurofibrilares
EO	Estresse Oxidativo
FAD	Familial Alzheimer's Disease
GQN	Genomic Quality Number
GSK-3 β	Glicogênio Sintase Kinase 3 Beta
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
Li	Lítio
LRP-1	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PLD	Potencial de Longa Duração
POT1	Protection of Telomeres1
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
Rap1	Ras-Proximate-1

TCF4	Transcription Factor4
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
Tg	Transgênico
TIN2	TRF1-Interactin Nuclear Factor 2
TPP1	Tripeptidyl Peptidase 1
TRF	Telomeric Repeat-Binding Protein Factor 1
WT	Wild type

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
g	Gramas
h	Horas
Kb	Quilobases
Kg	Quilogramas
L	Litro
Li ₂ CO ₃	Carbonato de lítio
mM	Milimolar
mmol	Milimol
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
pg	Picogramas

α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
ε	Epsilon

Resumo

Cardillo GM. Comprimento telomérico no sistema nervoso central de um modelo de doença de Alzheimer tratado com lítio [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Telômeros são complexos DNA-proteína presentes nas extremidades dos cromossomos. Os telômeros se encurtam a cada divisão celular, sendo o comprimento telomérico, portanto, considerado um biomarcador do envelhecimento celular. Esse encurtamento é vinculado a diversas doenças relacionadas à idade avançada. Na doença de Alzheimer (DA), têm sido associados com diversas vias fisiopatológicas, como a neuroinflamação e o estresse oxidativo, porém seus mecanismos ainda são pouco conhecidos. A maioria dos estudos sobre comprimento telomérico na DA é realizada em DNA leucocitário, pouco se sabendo sobre seu estado no sistema nervoso central. O lítio é um importante estabilizador de humor, com efeitos neuroprotetores amplamente evidenciados, mas pouco se sabe sobre seu efeito na manutenção do comprimento telomérico. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento crônico com lítio no comprimento telomérico em diferentes regiões cerebrais (córtex parietal, hipocampo e epitélio olfatório) de camundongos triplo transgênicos para DA (3xTg-AD) e selvagens. Dezoito animais transgênicos e 22 selvagens foram tratados por oito meses com ração contendo 1,0 g (Li1) ou 2,0 g (Li2) de carbonato de lítio/kg, ou ração padrão (Li0). O comprimento telomérico do DNA extraído destes tecidos foi quantificado por PCR em tempo real. O tratamento crônico com lítio foi associado a telômeros mais longos no córtex parietal (Li1, $p=0,04$) e

hipocampo (Li2, $p=0,02$) dos camundongos 3xTg-AD comparados com os respectivos selvagens. Nossos achados sugerem que o tratamento crônico com lítio afeta a manutenção do comprimento telomérico, mas que a magnitude desse efeito depende da concentração de lítio ministrada e das características do tecido envolvido. Esse efeito foi apenas observado quando comparando os animais triplo transgênicos com os selvagens, indicando que a presença da patologia, no caso a DA, se faz necessária para a modulação do comprimento telomérico promovida pelo lítio.

Descritores: telômeros; doença de Alzheimer; camundongos transgênicos; lítio; hipocampo; logo parietal; mucosa olfatória

Summary

Cardillo GM. Telomere length in the central nervous system of a model for Alzheimer's disease treated with lithium [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Telomeres are DNA-protein complexes present in the extremities of chromosomes. Telomeres shorten at each cell division, being the telomere length, therefore, considered a cell aging biomarker. This telomere shortening is associated to several age-related diseases. In Alzheimer's disease (AD), telomere length has been linked to several pathophysiological pathways, such as neuroinflammation and oxidative stress, though its mechanism are still poorly understood. Majority of studies regarding telomere length in AD are based in leucocyte DNA, with little information about its status in the central nervous system. Lithium is an important mood stabilizer, with neuroprotective effects widely evidenced, but little is known about its effects in telomere length maintenance. The objective of this present study was to evaluate the effect of chronical lithium treatment on telomere length in different brain regions (parietal cortex, hippocampus and olfactory epithelium) of wild type and triple transgenic mice model for AD (3xTg-AD). Eighteen transgenic and 22 wild type male mice were treated for eight months with chow containing 1.0g (Li1) or 2.0g (Li2) of lithium carbonate/kg, or standard chow (Li0). Telomere length of extracted DNA from theses tissues was quantified by real-time PCR. Chronic lithium treatment was associated with longer telomeres in the parietal cortex (Li1, $p=0.04$) and in the hippocampus (Li2, $p=0.02$) of 3xTg-AD compared with the respective wild type. Our findings suggest that chronic lithium treatment does affect telomere

maintenance, but the magnitude of this effect depends on the working concentrations of lithium and characteristics of the involved tissue. This effect was only observed when comparing triple transgenic with wild type mice, suggesting that the presence of AD pathology was required for the lithium modulation of telomere length.

Descriptors: telomere; Alzheimer's disease; mice, transgenic; lithium; hippocampus; parietal lobe; olfactory mucosa.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Telômeros

1.1.1. Histórico

Em 1938, o geneticista Herman Muller observou que os cromossomos de moscas de frutas (*Drosophila melanogaster*), depois de irradiados com raios-X, não produziam rearranjos com deleção de suas estruturas terminais. Muller então supôs que essas estruturas deveriam ser importantes para a estabilidade cromossômica, cunhando o termo “telômero” (das palavras gregas “telos” – τέλος – “fim”; e “meros” – μέρος – “parte ou porção”) para nomeá-las (apud BOUKAMP; MIRANCEA, 2007). Posteriormente o mesmo foi observado por McClintock em cromossomos de milho (*Zea mays*), que deduziu que uma das funções essenciais dos telômeros era a proteção contra a função intra- e inter-cromossômicas (McCLINTOCK, 1941).

A descrição da estrutura em dupla-hélice do DNA por Watson e Crick em 1953 permitiu a formulação do mecanismo da duplicação do DNA. Nela, cada fita age como um “molde” para a síntese de sua fita complementar. No entanto, a caracterização da DNA polimerase nos anos 70 por Watson trouxe um paradigma para o que poderia ocorrer nos terminais da dupla fita, uma vez que ela só é capaz de sintetizar na direção 5' - 3', e não é capaz de iniciar a replicação *de novo* (WATSON, 1972). Dessa forma, a síntese da fita contínua, que tem sentido 5'-3', é feita de forma ininterrupta. Por outro lado, a fita descontínua - que consiste de fragmentos de Okazaki - é sintetizada também no sentido 5'-3', porém contra o sentido de abertura da dupla-hélice (Figura 1). Após o término da síntese das fitas, os oligonucleotídeos de RNA iniciadores da síntese (*primers* de RNA) são degradados e os espaços internos formados são preenchidos por sequências de DNA pela enzima DNA ligase. Nota-se, no entanto, que não é possível preencher o espaço deixado no final dos cromossomos após a remoção dos *primers*, levando a uma replicação incompleta. Esse fato é conhecido como “problema de replicação final”, e

determina a progressiva perda de DNA cromossômico a cada divisão celular. E, dessa forma, uma das funções mais importantes dos telômeros é fornecer substrato para suportar essa progressiva perda e evitar danos ao material genético.

Figura 1 –Duplicação do DNA. Esquema representando a duplicação do DNA. O DNA mãe (azul) serve como molde para a síntese das fitas complementares (vermelho). A favor da abertura da forquilha de replicação, tem-se a síntese da fita contínua (a partir da inserção de um *primer* de RNA – verde). Contra o sentido da abertura, tem-se a síntese da fita descontínua, com progressivas inserções de *primers* e síntese em fragmentos (fragmentos de Okazaki).

Em 1965, Hayflick observou que a proliferação de fibroblastos limitava-se a um determinado número em cultura celular (HAYFLICK, 1965). O termo “limite de Hayflick” determina o número máximo de divisões que uma célula pode atingir *in vitro*. Após atingir esse limite, as células passam por mudanças bioquímicas e morfológicas, que culminam na cessão de suas capacidades proliferativas, processo denominado “senescência celular”.

Então, em 1973, Olonikov juntou os conceitos de senescência celular com o problema de replicação final, propondo que o encurtamento progressivo do material telomérico funcionaria como um relógio intrínseco de envelhecimento celular, que marcaria o número de divisões celulares antes do término do seu crescimento e o estabelecimento da senescência (OLOVNIKOV, 1973).

Com o advento do sequenciamento do DNA, deu-se início a era molecular da biologia telomérica. Em 1978, Blackburn e Gall sequenciaram a estrutura molecular dos telômeros do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, encontrando longas unidades repetitivas ricas em timina e guanina (BLACKBURN; GALL, 1978). A estrutura foi então sequenciada em diversas outras espécies, que, embora diferentes, apresentavam unidades similares (KLOBUTCHER et al., 1981). Finalmente, em 1984, Blackburn e Szostak isolaram a telomerase, enzima responsável pela manutenção e aumento do comprimento telomérico (BLACKBURN; SZOSTAK, 1984). Em 1996, Greider e Blackburn reportaram que a enzima telomerase encontrava-se quase ausente em células somáticas (GREIDER; BLACKBURN, 1996). O trabalho de caracterização da sequência telomérica, juntamente com a descoberta da telomerase e seus mecanismos de manutenção do comprimento telomérico renderam à Blackburn, Greider e Szostak o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2009.

1.1.2. Estrutura dos telômeros

Telômeros são sequências repetitivas em *tandem* do hexanucleotídeo TTAGGG, na maioria dos vertebrados, associados a diversas proteínas que formam um complexo denominado “shelterina”. Em microscopia eletrônica, observa-se que a fita 3', rica em guanina, insere-se nas repetições complementares da fita dupla, formando um laço denominado volta-T (GRIFFITH et al., 1999; STEWART; WEINBERG, 2006; Figura 2).

Em humanos, essa conformação de laço é estabilizada pelas proteínas TRF1 (*Telomeric Repeat-Binding Protein Factor*), TRF2, POT1 (*Protection Of Telomeres 1*), TIN2 (*TRF1-Interactin Nuclear Factor 2*), TPP1 (*Tripeptidyl Peptidase 1*) e Rap1 (*Ras-Proximate-1*) (LIN et al., 2014). As proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se às repetições teloméricas formando homodímeros, enquanto a proteína POT1 liga-se à extremidade 3' de fita simples. A TIN2 liga-se à TRF1 e TRF2, estabilizando-as, enquanto a TPP1 une a POT1 ao complexo TRF1/TRF2/TIN2. Por fim, a Rap1 associa-se ao telômero por interação com a TRF2 (DE LANGE, 2005; LIN et al., 2014).

Essa conformação estrutural impede que a extremidade telomérica seja reconhecida como quebra da dupla fita, inibindo a ativação da cascata de sinalização dos pontos de checagem de danos ao DNA e, por fim, evitando fusões intra- e inter-cromossômicas (DE LANGE, 2005; QI et al., 2005).

Ainda, as proteínas do complexo shelterina estão envolvidas na manutenção do comprimento telomérico, restringindo ou permitindo a ação da enzima telomerase (DE LANGE, 2005; Figura 2). A inibição *in vitro* da proteína TRF1 ou TPP1, redução dos níveis de TIN2 e Rap1, ou ainda distúrbios na interação TPP1-POT1 mostraram aumentar o comprimento telomérico, enquanto a hiperexpressão de TRF1 e TRF2 promovem o encurtamento telomérico, ambos os processos ocorrendo sem alteração na expressão ou atividade da telomerase (VAN STEENSEL; DE LANGE, 1997; DE LANGE, 2005; HUG; LINGNER, 2006).

Figura 2 - Relação entre o complexo shelterina e telômero. [A] Representação da volta-T. [B] Shelterinas envolvidas na formação da volta-T e suas interações. [C] Interação entre a volta-T e a telomerase (adaptado de DE LANGE, 2005).

1.1.3. Encurtamento telomérico

Os telômeros encurtam-se a cada divisão celular devido à síntese incompleta da fita que sofre replicação descontínua (VON ZGLINICKI, 2002). Após extinguir seu potencial de replicação, momento em que os telômeros encontram-se no máximo de seu encurtamento, perde-se a estrutura da volta-T, provocando o recrutamento de diversos sensores de dano ao DNA (HERBIG; SEDIVY, 2006) e a célula entra em senescência (ZHOU et al., 2006; GUPTA et al., 2007; TSOLOU et al., 2008). Hayflick (HAYFLICK, 1965) mostrou que esse limite de encurtamento em humanos ocorre após 50-70

divisões celulares. Quando entram em senescência, as células perdem de modo irreversível a sua capacidade proliferativa (SHAY; WRIGHT, 2007), passam a sintetizar proteínas específicas (diferentes das produzidas por células quiescentes, mas não-senescentes), e apresentam mudanças morfofuncionais (FICHTMAN; HAREL, 2014; MAN; GICHEVA; NICOLETTI, 2014). Portanto, quando as células se tornam senescentes em um tecido, elas podem mudar sua homeostase, levando ao processo que conhecemos como envelhecimento.

Devido às consequências da senescência e sua correlação com a idade avançada, começou-se a estudar o envolvimento dos telômeros em doenças relacionadas à idade. De fato, a presença de telômeros encurtados foi evidenciada em leucócitos de humanos e de animais que apresentavam patologias como diabetes relacionada à idade (ASTRUP et al., 2010; MURILLO-ORTIZ et al., 2012), doenças cardiovasculares (CHIU et al., 2016; YEH; WANG, 2016), e em indivíduos com elevado risco de doenças neurodegenerativas (HONIG et al., 2006, 2012; KOTA et al., 2015), incluindo a doença de Alzheimer (DA) (LIU et al., 2016).

1.1.4. Manutenção do comprimento telomérico: Telomerase

A telomerase é uma DNA polimerase dependente de RNA, capaz de sintetizar sequências de DNA telomérico, promovendo a manutenção e alongamento de seu comprimento, preservando, assim, as capacidades proliferativas da célula. A telomerase é composta por dois componentes essenciais: o componente de RNA, denominado TERC (do inglês *Telomerase RNA Component*), e que funciona como molde para a síntese do DNA telomérico (FENG et al., 1995); e a unidade catalítica, TERT (do inglês *Telomerase Reverse Transcriptase*), que possui atividade de transcriptase reversa, sendo a unidade determinante para a atividade da enzima (LINGNER et al., 1997; MEYERSON et al., 1997).

Sabe-se que o TERC é altamente expresso em todos os tecidos, independentemente da atividade da telomerase (AVILION et al., 1996), sendo

especialmente presente em células tumorais (YI et al., 1999). Por outro lado, a expressão de TERT encontra-se reduzida ou mesmo ausente em células pós-mitóticas (incapazes de sofrer novas mitoses), porém altamente presente em células germinativas, progenitoras, linfócitos T e B e células tumorais (HULTDIN et al., 2003). Ainda, evidências sugerem que, mesmo em tecidos pós-mitóticos como o tecido cerebral, injúrias podem induzir a expressão de TERT, estabelecendo-se uma função protetora da telomerase (FU; LU; MATTSON, 2002; BAEK et al., 2004; KANG et al., 2004).

1.2. Doença de Alzheimer

1.2.1. Epidemiologia e Fisiopatologia

Demência é uma condição de progressiva perda de memória e declínio das funções cognitivas causando impacto funcional. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), é definida como um declínio significativo dos níveis prévios de performance em um ou mais domínios cognitivos, com importante interferência na independência e execução de tarefas rotineiras. Aproximadamente 46,8 milhões de pessoas vivem com demência, totalizando um custo global de cuidados de cerca de 818 bilhões de dólares (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015). Estima-se que esse número chegará a 74,7 milhões de pessoas em 2030 e 131,5 milhões em 2050 (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015).

A DA é a forma mais comum de demência na população acima de 65 anos, constituindo cerca de 55% dos casos (HERRERA et al., 2002). O aumento da expectativa de vida aparece como a principal causa do aumento da incidência da DA, uma vez que, ao atingir idades mais avançadas, aumenta-se a vulnerabilidade a doenças neurodegenerativas (Selkoe, 2001).

A DA é uma doença de etiologia complexa, dependendo da interação de diversos fatores genéticos e ambientais (SU et al., 2008; TRAMUTOLA et al., 2017). Ela é caracterizada pela presença no cérebro de placas senis extracelulares contendo peptídeos β -amiloide ($A\beta$), derivados da proteína

precursora do amiloide (APP), e de emaranhados neurofibrilares intracelulares contendo proteína tau hiperfosforilada, que serão abordados posteriormente. Essas alterações correlacionam-se com disfunção e degeneração neuronal progressivas, resultando em dano tecidual e déficits cognitivos (SELKOE, 2003).

Existem duas formas de DA: uma de cunho genético e padrão de herança autossômica dominante, denominada doença de Alzheimer familiar (FAD, do inglês *Familial Alzheimer's Disease*); e outra esporádica, idiopática e de início mais tardio que a FAD, cujo risco é modificado por múltiplos fatores genéticos. A FAD atinge de 5 a 15% dos pacientes com DA, tendo o seu início antes dos 60 anos de idade, enquanto a forma esporádica da doença tem início a partir desta faixa etária (CREWS; MASLIAH, 2010).

1.2.2. Histórico

Em 1906, o médico alemão Alois Alzheimer descreveu uma série de sintomas em uma paciente acometida por um grave transtorno neuropsíquico: falhas na memória, declínio na linguagem, funções cognitivas comprometidas, comportamento alterado e psicose. Na análise *post mortem* do tecido cerebral dessa paciente, Alzheimer identificou a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (ENF). A doença foi considerada uma rara forma pré-senil de demência. Então, em 1910, Kraepelin utilizou pela primeira vez o termo “doença de Alzheimer” para descrever esse tipo de demência.

Décadas se passaram até que novos progressos substanciais fossem feitos em relação à doença descrita por Alzheimer. Em 1960, com o uso de microscopia eletrônica, Michael Kidd e Robert Terry puderam descrever detalhadamente as estruturas das placas senis e os ENF (apud SELKOE, 2001). Nos anos 70, os primeiros relatos de acentuada degeneração de neurônios colinérgicos e sua relação com a demência foram documentados (SELKOE, 2001). Tais estudos deram início à intensa pesquisa farmacológica

de substâncias capazes de aumentar os níveis de acetilcolina nas fendas sinápticas (SELKOE, 2001).

Foi notável, porém, a falta de resultados clínicos significativos da maioria dos pacientes tratados com fármacos colinérgicos (SELKOE, 2001). No final dos anos 70 e início dos 80 o motivo foi parcialmente explicado com achados de déficits de outros sistemas de neurotransmissores, conferindo alta heterogeneidade de classes de neurônios envolvidos na patogenia da DA. Dessa forma, os estudos voltaram-se para as duas principais lesões neuropatológicas da DA.

Em 1984, Glenner e Wong isolaram um peptídeo a partir dos vasos da meninge de um paciente com DA e o nomearam peptídeo A β (GLENNER; WONG, 1984a). Esse mesmo peptídeo foi observado em lesões cerebrais de um indivíduo com síndrome de Down (GLENNER; WONG, 1984b). Tal semelhança levou à hipótese do envolvimento de algum gene presente no cromossomo 21 na fisiopatologia da DA (GLENNER; WONG, 1984b). No final dos anos 80 a hipótese se concretizou com a identificação do precursor da A β , denominada proteína precursora do amiloide (do inglês *amyloid precursor protein* ou APP) codificado por um gene localizado no cromossomo 21 (ROBAKIS et al., 1987). Não obstante, na década de 90, diversas mutações no gene da APP mostraram aumentar os depósitos de A β em casos de FAD (LEVY et al., 1990; ST GEORGE-HYSLOP et al., 1990). Ademais, mutações nos genes envolvidos no processamento da APP, como presenilina1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), localizados nos cromossomos 14 e 1 (respectivamente), também se mostraram importantes em casos de FAD (VAN BROECKHOVEN et al., 1990; GALIMBERTI; SCARPINI, 2011).

Em 1993, Corder e colaboradores identificaram relação entre polimorfismos do gene que codifica a apolipoproteína E e o desenvolvimento da DA esporádica. O alelo ϵ 4 desse gene aumenta significativamente o risco do desenvolvimento da DA, bem como diminui a idade para o aparecimento dos sintomas clínicos (CORDER et al., 1993). Por outro lado, o alelo ϵ 2 parece promover proteção contra a DA (CORDER et al., 1994). De fato, as diferentes

isoformas da apolipoproteína E afetam de maneiras distintas o *clearance* da A β , favorecendo seu depósito ($\epsilon 4$) ou facilitando sua retirada ($\epsilon 2$) (CASTELLANO et al., 2011).

A presença de A β no tecido cerebral de pacientes com DA, mutações na APP e presenilinas, e alterações no *clearance* do peptídeo promovido pelo alelo $\epsilon 4$ como importantes fatores de risco para o desenvolvimento da DA culminaram na proposição da hipótese da cascata do amiloide (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002). De acordo com essa hipótese, primeiramente ocorreria a clivagem da APP, aumentando a produção do peptídeo A β . Esses peptídeos se acumulariam e se depositariam em agregados insolúveis, as placas, lesionando sinapses e neurônios. Essas lesões acabariam por alterar a homeostase neuronal, ativando fosfatases e quinases intracelulares, que culminariam na hiperfosforilação da proteína tau e consequente formação dos ENF. Concomitantemente ocorreria, ainda, ativação das células da glia em resposta à deposição de A β , ocasionando a produção de citocinas inflamatórias e mediadores de inflamação, instalando-se um importante quadro de neuroinflamação. Tais alterações resultariam em déficits sinápticos, perda neuronal e consequente atrofia cerebral, bem como alterações neuroquímicas e déficits de diversas classes de neurotransmissores. Essas lesões, por fim, se manifestariam clinicamente com o déficit cognitivo e demência (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY; SELKOE, 2002).

1.2.3. Aspectos moleculares da DA

Como previamente mencionado, os dois principais achados fisiopatológicos envolvidos da DA são os depósitos extracelulares de placas amiloides (placas senis) e os ENF intracelulares de proteína tau (SELKOE, MANDELKOW; HOLTZMAN, 2012).

As placas amiloides consistem em depósitos do peptídeo A β . Podem se apresentar associadas à neuritos distróficos, recebendo o nome de placas neuríticas (DICKSON; SAUNDERS; VICKERS, 1997; Figura 3). Neuritos

distróficos são neurônios dilatados, tortuosos e com aberrações ultra-estruturais, como lisossomos aumentados e maior número de mitocôndrias, além de poderem estar associados com microglias ativadas. Essas placas neuríticas são majoritariamente encontradas no córtex associativo e límbico (DICKSON; SAUNDERS; VICKERS, 1997). Nas placas neuríticas, os peptídeos de A β se apresentam em forma filamentosa, formando fibrilas. As fibrilas são constituídas principalmente pelas espécies terminando no aminoácido 42 (A β ₁₋₄₂), forma mais longa e hidrofóbica, sendo mais propensa à formação de agregados. Observa-se também a presença das formas A β ₁₋₄₀ e A β ₁₋₄₃, colocalizada com a A β ₁₋₄₂ na placa.

As placas amiloides também se apresentam em padrão menos fibrilar, amorfo e granular. Essa forma é denominada placa difusa ou pré-amiloide. Considera-se que as placas difusas consistam em lesões precursoras das placas neuríticas (SELKOE et al., 2012).

Os ENF intracelulares, por sua vez, consistem em agregados da proteína tau em estado hiperfosforilado. A proteína tau é um componente estrutural de microtúbulos, e esse processo leva à dissociação dos polímeros de alfa- e beta-tubulina e, conseqüentemente, ao colapso dos microtúbulos, levando à formação de fibras insolúveis denominadas “filamentos helicoidais pareados” (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986). Esses filamentos acumulam-se no citoplasma neuronal, formando, então, os ENF (BRAAK; BRAAK, 1997; Figura 3). A hiperfosforilação da proteína tau também provoca a desestabilização dos microtúbulos, ocasionando declínio funcional dos neurônios devido ao prejuízo do transporte axonal e conseqüente disfunção sináptica e neurodegeneração (LAU et al., 2016).

Figura 3 - Marcos fisiopatológicos da doença de Alzheimer. [A] Atrofia cerebral. À esquerda um hemisfério de um paciente com DA, e à direita o hemisfério de um controle saudável pareado por idade. Nota-se no cérebro com DA severa atrofia, dilatação do ventrículo lateral e redução do volume hipocampal. [B] [C] Emaranhados neurofibrilares (N) e placas neuríticas (P) no hipocampo [B] e córtex frontal [C](adaptado de WIPPOLD et al., 2008).

O A β compreende uma família de peptídeos, com tamanhos variando de 39 a 43 aminoácidos, e que têm origem na clivagem da APP, uma proteína transmembrana estrutural. A APP pode sofrer duas vias de clivagem distintas: a via não-amiloidogênica e a amiloidogênica (O'BRIEN; WONG, 2011; Figura 4). A via não-amiloidogênica ocorre na membrana celular e tem início com a ação da α -secretase, originando dois fragmentos: um com terminal α -carboxila, que permanece na membrana; e um fragmento solúvel com α -amino terminal, que é liberado para o meio extracelular. Na via amiloidogênica, por sua vez, a APP é internalizada em endossomos, onde sofre a clivagem pela β -secretase, originando dois fragmentos: o fragmento solúvel com β -amino terminal; e um

fragmento com terminal β -carboxila, que permanece na membrana do endossomo. Esse último fragmento sofre uma posterior clivagem por γ -secretase, que é um complexo de proteínas composto por PSEN1, entre outras enzimas, liberando, por fim, o peptídeo A β . Esse peptídeo pode permanecer no meio intracelular ou ser secretado para o meio extracelular, onde se agrega com outros peptídeos A β formando depósitos insolúveis (O'BRIEN; WONG, 2011).

Figura 4- Processamento da proteína precursora de amiloide (APP). Representação das vias de processamento da APP (proteína precursora de amiloide). A via não amiloidogênica é apresentada à esquerda, onde sofre clivagem pela α -secretase. A via amiloidogênica segue à direita, após a clivagem da APP pela β -secretase e, posteriormente, pela γ -secretase, gerando o fragmento A β (adaptado de SPIES et al., 2012).

A inflamação também exerce papel importante na fisiopatologia da DA (MARCHESI, 2011; VIEL; BUCK, 2011). Trabalhos relacionam a importância da

inflamação na DA através da apoptose mediada por inflamação (SU et al., 2008; CALISSANO; MATRONE; AMADORO, 2009), diminuição do *clearance* de A β através da barreira hematoencefálica induzida por neuroinflamação crônica e regulada pelo LRP-1 (do inglês *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*) e RAGE (do inglês *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) (DEANE; WU; ZLOKOVIC, 2004; DONAHUE et al., 2006; JEYNES; PROVIAS, 2008; YAN; ZHENG; ZHAO, 2008), bem como neuroinflamação ativada pelos ENF ou depósito de A β (BUTTERFIELD et al., 2007, 2010; METCALFE; FIGUEIREDO-PEREIRA, 2010). A neuroinflamação também pode ser desencadeada pelo estresse oxidativo (EO), proposto como fator secundário, porém importante, na fisiopatologia da DA (ALUISE et al., 2010; SINGH et al., 2010; BUTTERFIELD, 2011). Tal processo, após engatilhado, pode ativar um ciclo auto-perpétuo de neuroinflamação crônica, que, por sua vez, volta a aumentar o EO e pode contribuir para uma disfunção neuronal irreversível e morte celular (MACCIONI et al., 2009)

1.3. Telômeros na doença de Alzheimer

Diversos trabalhos indicam que a inflamação e EO podem acelerar o encurtamento telomérico em leucócitos do sangue periférico (GRODSTEIN et al., 2008; RAGNO et al., 2011). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm estabelecido uma relação entre o encurtamento telomérico e a DA (ZHAN et al., 2015; FORERO et al., 2016). De fato, o encurtamento dos telômeros e a DA podem ser ocasionadas por fatores semelhantes, como o EO, elementos inflamatórios, estilo de vida, entre outros (D'INTRONO et al., 2006; DAMJANOVIC et al., 2007; THOMAS; FENECH, 2007; JENKINS et al., 2008).

Outros estudos ainda sugerem que o encurtamento dos telômeros em linfócitos-T está correlacionado com a gravidade da DA (LIU et al., 2016). O tamanho dos telômeros também é inversamente proporcional aos níveis de fator de necrose tumoral α , sugerindo o envolvimento do sistema imune na neuropatologia da DA (PANOSSIAN et al., 2003). Zhang e colaboradores (2003) observaram uma maior atividade da telomerase em linfócitos de

pacientes com DA, em relação aos indivíduos saudáveis, sendo que em alguns pacientes houve também uma redução da atividade proliferativa dessas células. Esses resultados sugerem que a disfunção telomérica que induz uma maior atividade reflexa da telomerase e também uma queda na taxa proliferativa, resulta em déficit na função imune de pacientes com DA.

Como exposto acima, a maioria dos resultados associando encurtamento telomérico e DA foram obtidos por medidas em DNA periférico (PANOSSIAN et al., 2003; HOCHSTRASSER; MARKSTEINER; HUMPEL, 2012; MOVÉRARE-SKRTIC et al., 2012). Entretanto, é conhecido que mesmo em estágios iniciais da doença, a neurodegeneração se estabelece em intensidades diferentes na região CA1 do hipocampo, no córtex entorrinal (CSERNANSKY et al., 2000, 2005; KRIL; HODGES; HALLIDAY, 2004; GUNTEN et al., 2006) e no neocórtex de associação (córtex parietotemporal, córtex temporal ífero lateral, córtex pré-frontal) (KANTARCI et al., 2000; CHANTAL et al., 2002), resultando em prejuízo da memória. Também há relatos da perda de olfato associada com características fisiopatológicas da DA no epitélio olfatório (ARNOLD et al., 2010; HU et al., 2016; LACHÉN-MONTES et al., 2016).

A relação entre neurodegeneração e variações do comprimento de telômeros em diferentes regiões cerebrais ainda precisa ser elucidada. Lukens e colaboradores (2009), em um estudo *post-mortem*, mostrou uma redução do comprimento telomérico no cerebelo de pacientes com DA, comparado aos controles, enquanto outro estudo de Thomas e colaboradores (2008) encontrou aumento dos telômeros no hipocampo. Além disso, sabe-se que ratos expostos a estresse durante o desenvolvimento apresentam telômeros mais curtos no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal (BOTHA et al., 2012).

1.4. Lítio

1.4.1. Aspectos neuroprotetores

Em 1949, Cade descreveu o papel terapêutico do lítio em doenças psiquiátricas, sobretudo a mania (CADE, 1949). A primeira desordem psiquiátrica em que o lítio foi testado foi o transtorno afetivo bipolar (BALDESSARINI; TONDO; HENNEN, 2006), seguido de doença de Parkinson e da DA. O tratamento farmacológico com lítio traz evidências do seu envolvimento direto com alvos farmacológicos relacionados à neuroproteção e transdução de sinal. O lítio parece estabilizar as atividades neurais e promover plasticidade neural e neuroproteção (CHIU; CHUAG, 2011), porém seus mecanismos de ação permanecem pouco compreendidos.

O lítio também tem sido sugerido como um possível tratamento para pacientes com déficit cognitivo (FORLENZA et al., 2011) e espera-se que seus efeitos neuroprotetores e neurotróficos (CAMINS et al., 2009; DE-PAULA et al., 2015) possam prevenir a progressão para DA (FORLENZA et al., 2012; MORRIS; BERK, 2016). É importante ressaltar que os trabalhos com lítio no tratamento de demências apontam para a importância da intervenção precoce (FORLENZA et al., 2012) e do uso de doses mais baixas (NUNES; VIEL; BUCK, 2013; DE-PAULA et al., 2015; DE-PAULA; GATTAZ; FORLENZA, 2016; MORRIS; BERK, 2016). Nesta linha, Nunes e colaboradores (2013) mostraram que doses sub-terapêuticas de lítio podem ser efetivas em atenuar significativamente o declínio cognitivo em pacientes com DA acompanhados ao longo de 15 meses.

1.4.2. Lítio e telômeros

Trabalhos sugerem que o número de episódios depressivos está relacionado ao tamanho reduzido dos telômeros em leucócitos e que o tratamento farmacológico com antidepressivos exerce proteção contra esse encurtamento (WOLKOWITZ et al., 2011, 2012). O encurtamento telomérico também foi associado com menor resposta ao tratamento farmacológico em

pacientes com esquizofrenia (YU et al., 2008). Martinsson e colaboradores (2013) demonstraram um maior tamanho telomérico em leucócitos de pacientes bipolares tratados com lítio por dois anos. Esse mesmo estudo também reporta um aumento na resposta ao tratamento com lítio relacionado ao maior comprimento dos telômeros.

Tem sido demonstrado também que o lítio é capaz de promover proliferação e sobrevivência neuronal em modelos animais de neurodegeneração (CHEN et al., 2002; SENATOROV et al., 2004; YAN et al., 2007).

O lítio pode ter uma influência importante na modulação da atividade da telomerase. Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2012) documentam que a *hTERT*, subunidade catalítica que influencia a atividade enzimática da telomerase, é o fator limitante da atividade da telomerase em humanos (HARTWIG et al., 2012). A regulação da *hTERT* ocorre primariamente no nível da transcrição e é dependente de β -catenina, cuja degradação é modulada pela proteína GSK-3 β (glicogênio sintase kinase 3 beta). O lítio inibe a GSK-3 β por vias direta e indireta, levando à retenção de β -catenina que ativa a transcrição da *hTERT* (CHUANG; WANG; CHIU, 2011; Figura 5).

Figura 5- Mecanismo indireto de influência do lítio sobre a telomerase. O lítio inibe a atividade da GSK3-β, responsável pela degradação da β-catenina. Aumenta-se, então, a concentração de β-catenina, que se liga ao fator TCF4. Uma vez ativo, o TCF4 promove a transcrição de hTERT, subunidade catalítica da telomerase, promovendo a manutenção e/ou aumento do comprimento telomérico. Li: lítio; TCF4: *transcription factor 4*; hTERT: *human telomerase reverse transcriptase*. Adaptado de POLHO et al., 2015.

1.5. Modelos animais no estudo da doença de Alzheimer

1.5.1. Histórico

Estudos em pacientes com DA geralmente se deparam com uma importante dificuldade que é o estabelecimento de um grupo controle eficaz, uma vez que a idade é um fator importante para o decurso da doença e, mesmo em idosos sem alterações cognitivas, por vezes é possível observar achados fisiopatológicos semelhantes aos encontrados na DA, como as placas de A β . Também, destaca-se a difícil detecção da DA em estágios iniciais, momento em que possivelmente os tratamentos apresentariam maior eficácia. Sendo assim, o uso de modelos animais apresenta-se como uma importante estratégia para o estudo da doença.

Modelos animais para doenças neurodegenerativas, como a DA, buscam replicar os sintomas, lesões e/ou causas da doença (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2007). Os sintomas são, em geral, muito mais relacionados ao local da lesão, porém apresentam pouca relação com os mecanismos patogênicos que a causa. Por exemplo, Murray e Fibiger (MURRAY; FIBIGER, 1985) demonstraram que danos ao sistema colinérgico de ratos com uso de injeções de ácido ibotênico geram sintomas comportamentais semelhantes aos da DA, porém não se evidencia a presença das características histopatológicas da doença. Por sua vez, modelos animais que visam a reproduzir a natureza fisiopatológica da DA se utilizam de modificações genéticas dos mesmos, através da inserção de mutações humanas no genoma desse animal (DUYCKAERTS; POTIER; DELATOUR, 2007).

Dentre estas mutações, as mais prevalentes são nos genes da APP e das presenilinas, sendo que os animais transgênicos para a DA apresentam hiperexpressão desses genes. Dessa forma, os animais manifestam achados de β -amiloidose semelhantes aos encontrados em humanos, tais como acúmulo do peptídeo em placas no tecido cerebral e também na parede dos vasos sanguíneos (angiopatia por β -amiloide), (JUCKER, 2010).

1.5.2. Modelo triplo-transgênico (3xTg-AD)

Em 2003, Oddo e colaboradores integraram mutações de genes humanos que codificam a presenilina1 (PS1_{M146V}), a APP (APP_{swe}) e a proteína tau (tau_{P301L}) em um camundongo, denominado modelo triplo transgênico (3xTg-AD). Para tanto, coinjetaram transgenes codificando as APP_{swe} e tau_{P301L} humanas (sob controle do promotor regulatório Thy1.2, de forma a induzir a expressão desses genes predominantemente no sistema nervoso), em embriões de camundongos *knockin* homozigotos para a mutação PS1_{M146V} (ODDO et al., 2003b). O desenvolvimento desse modelo cobriu uma lacuna deixada por outros, como o duplo transgênico para os genes da PSEN1 e APP, que acabavam por não manifestar os emaranhados neurofibrilares, alteração importante ao se considerar a hipótese da cascata amiloide.

Os achados fisiopatológicos do modelo 3xTg-AD se apresentam de forma progressiva. Primeiramente foi observada imunorreatividade intraneural para Aβ no neocórtex entre três e quatro meses de idade, seguida pelo hipocampo aos seis meses. A presença no hipocampo correlaciona-se com déficits de potenciação de longa duração, importante para o processo de aprendizado e memória. Aos seis e doze meses observa-se deposição de Aβ extracelular no neocórtex e hipocampo respectivamente. Aos doze meses também é relatado o aparecimento dos ENF (ODDO et al., 2003a; Figura 6). Em questões comportamentais observa-se déficit na retenção de memória a longo prazo aos quatro meses de idade (BILLINGS et al., 2005). Aos dez meses observou-se redução da atividade exploratória (HALAGAPPA et al., 2007). Aos doze meses os animais apresentam reatividade aumentada a estímulos aversivos, bem como hiperatividade e redução da habituação motora (PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2008).

Tais alterações fisiopatológicas e comportamentais, bem como a progressão dos achados, assemelham-se às apresentadas por pacientes com DA, tornando o camundongo triplo transgênico um modelo de grande potencial para o estudo dessa doença.

Figura 6- Linha do tempo dos achados fisiopatológicos do modelo triplo transgênico para a DA (3xTg-AD). PLD: potencial de longa duração; m: meses de idade. Adaptado de 3xTg | ALZFORUM.

2 JUSTIFICATIVA

Os telômeros, embora muito estudados em câncer, têm sido relacionados apenas recentemente às doenças psiquiátricas e neurodegenerativas como a DA. Diversos estudos apontam para seu tamanho reduzido nessas condições principalmente em leucócitos. Associado a DA existe um processo neurodegenerativo que afeta de maneira diferente diversas regiões do sistema nervoso.

Sabe-se do papel neuroprotetor do lítio, embora suas vias de atuação sejam pouco compreendidas. O lítio é o principal estabilizador de humor para transtornos psiquiátricos, além de diversos estudos o relacionarem ao aumento da neurogênese. Porém, apenas dois trabalhos relacionam o efeito do lítio sobre os telômeros (MARTINSSON et al., 2013; SOEIRO-DE-SOUZA et al., 2014).

Sendo assim, com este estudo esperamos contribuir para o entendimento de como diferentes regiões do sistema nervoso central são afetadas pela DA e como respondem ao tratamento crônico com lítio.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o comprimento telomérico em diferentes regiões cerebrais em camundongos triplos transgênicos para DA (3xTg-AD) tratados cronicamente com diferentes doses de carbonato de lítio.

3.2. Objetivos Específicos

1) Comparar o tamanho telomérico de diferentes estruturas em estado basal (sem tratamento) entre camundongos transgênicos (3xTg-AD) e selvagens (*wild type*);

2) Avaliar o efeito do tratamento crônico com carbonato de lítio em diferentes doses sobre o tamanho telomérico em diferentes estruturas (córtex parietal, hipocampo e epitélio olfatório) desses camundongos;

3) Comparar o tamanho telomérico de diferentes estruturas cerebrais de um mesmo camundongo visando a elucidar diferentes padrões de envelhecimento celular;

4 MÉTODOS

4.1. Tratamento dos Animais.

Para o presente projeto, foram utilizados 40 camundongos machos importados do The Jackson Laboratory ® (EUA). Esses animais foram tratados e seus tecidos coletados e estocados como parte do projeto temático Neurobiologia da Doença de Alzheimer que possui aprovação do comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo: 1293/09). As linhagens e protocolo de tratamento estão apresentados a seguir.

Dos 40 camundongos, 22 eram B6129SF2/J (selvagem, *wild type*; WT) e 18B6;129-Psen1tm1MpmTg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax (3xTg-AD; Tg). No início dos experimentos, esses animais tinham aproximadamente 12 semanas de idade, e foram mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP durante todo o tratamento, em condições controladas de temperatura ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (50-60%), sob um ciclo de 12h claro/12h de escuro, e com acesso à comida e água fresca *ad libitum* ao longo do estudo.

Os animais (WT e Tg) foram divididos em três subgrupos: Li0 (ração padrão); Li1 (1,0 g de Li_2CO_3 /Kg de ração); e Li2 (2,0 g de Li_2CO_3 /Kg de ração). O tratamento teve duração de 8 meses. Após o término desse período, os animais foram submetidos a decapitação por guilhotina. O tecido cerebral foi removido da caixa craniana e foram separados o córtex parietal, hipocampo e epitélio olfatório, e imediatamente congelados em *freezer* a -80°C até uso.

4.2. Determinação da litemia

O sangue foi coletado da cauda e o soro separado por centrifugação. A concentração da litemia (mmol/L) foi determinada no leitor de eletrólitos (9180 Electrolyte Analyzer, Roche), a média sendo: 0,17 mmol/L no grupo WT Li1; 0,26 mmol/L no grupo WT Li2; 0,22 mmol/L no grupo Tg Li1; e 0,35 mmol/L no grupo Tg Li2.

4.3. Extração do DNA

Para realizar a extração do DNA utilizamos o *kit* AllPrep DNA/RNA mini (QIAGEN), projetado para a extração a partir de amostras de tecido. A homogeneização dos tecidos foi realizada em tubos de microcentrífugas com 600 µL do Buffer RLT Plus (fornecido pelo próprio *kit* para esse fim) e 6 µL de beta mercaptoetanol, visando neutralizar as RNAses liberadas no processo. O tecido foi colocado no tubo e então macerado com o auxílio de um *potter*. O processo de extração pós-homogeneização foi automatizado no aparelho QIACube (QIAGEN), seguindo as diretrizes da fabricante. Ao final do processo, obtivemos 100 µL de DNA diluído e pronto para posterior uso. As amostras foram então quantificadas com o uso do aparelho *NanoDrop* (Thermo) e qualificada de acordo com suas razões de comprimento de onda 260/280 (para possível contaminação com proteínas) e 260/230 (para contaminação com compostos químicos).

4.4. Avaliação da integridade do DNA genômico

Para a correta avaliação do comprimento telomérico, é necessário que o DNA extraído apresente alta integridade (MONTPETIT, 2015). Para realizar essa avaliação utilizamos o equipamento de eletroforese capilar Fragment Analyzer (Advanced Analytical), em conjunto com o kit DNF-488 High Sensitivity Genomic DNA Analysis (Advanced Analytical). Os resultados da corrida foram analisados no *software* PROSize 2.0, que gera um gel virtual, um gráfico de fragmentos e um GQN (Genomic Quality Number – Número de Qualidade Genômica), que varia de 0 a 10, conforme a distância do pico da amostra em relação a um *threshold* estabelecido em 10000pb (padrão do *software*). Um maior valor de GQN é resultado de um pico de amostra que excede o valor do *threshold*, sendo, portanto, um DNA mais íntegro. Para nossas análises, consideramos valores de GQN acima de 8,5 como suficientemente íntegros para prosseguir à etapa da PCR em tempo real.

4.5. PCR em tempo real

Para realizar a quantificação dos telômeros usamos a técnica de PCR em tempo real, seguindo-se a metodologia descrita por Callicott e Womack (CALLICOTT; WOMACK, 2006).

Para tanto, usamos os *primers* de telômeros (5' CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT 3', *forward*; 5' GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT 3', *reverse*; Exxtend) (CALLICOTT; WOMACK, 2006) e os *primers* do gene de cópia única 36B4, que codifica uma subunidade ribossomal e é altamente conservado, servindo como referência para a quantificação (5'CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC 3', *forward*; 5' CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A 3', *reverse*; Exxtend) (CAWTHON, 2002). Para a PCR relacionada à porção telomérica utilizamos 12,5 µL de SYBR Green PCR MasterMix (Promega), 300 nM do *primer forward*, 300 nM do *reverse*, 20 ng de DNA e água milli-Q completando o volume para 25 µL. Foram realizadas ciclagens de 95 °C de 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 56 °C por 1 minuto (anelamento, extensão e coleta de dados). Em relação ao gene de cópia única (36B4) foi realizada a PCR com 12 µL SYBR Green PCR MasterMix, 300 nM do *primer forward*, 500 nM do *reverse*, 20 ng de DNA e água milli-Q completando o volume para 25 µL. Neste, as ciclagens foram de 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 52 °C por 20 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão e coleta de dados).

4.6. Curva padrão e quantificação absoluta do tamanho telomérico

Para obter uma quantificação absoluta de telômeros, foi estabelecida uma curva padrão tanto para telômeros como para o gene 36B4, a partir de diluições de quantidades conhecidas de oligômeros sintetizados especificamente para cada um, como descrito por O'Callaghan e Fenech (O'CALLAGHAN; FENECH, 2011).

Os oligômeros designados são (5' TTAGGG 3')_{x14} (Exxtend) para o telômero e 5'ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG ACC TCC TTC TTC CAG GCT TTG GGC ATC ACC ACG AAA ATC TCC AGA GGC ACC ATT GA 3' (Exxtend) para o 36B4, sendo ambos purificados por cromatografia líquida de alta eficiência. Seguindo as mesmas especificações descritas anteriormente em 4.5, realizamos 6 diluições seriadas dos oligômeros de telômeros (600 pg a 0,58 pg; diluição seriada de 1:4) e 6 para o oligômero 36B4 (9,37 pg a 0,0075 pg; diluição seriada 1:4).

Multiplicando-se a massa molar do oligômero de telômero pela constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), encontramos a massa em gramas de uma molécula do oligômero. Dividimos o valor das concentrações em cada ponto da curva dos oligômeros pelo valor encontrado anteriormente, assim obtendo a quantidade de moléculas do oligômero em cada ponto da curva. Multiplicamos, então, esse resultado pela quantidade de bases do oligômero (84 pb), encontrando o valor de pares de bases em cada ponto da curva.

Quanto ao oligômero do gene de cópia única 36B4, o procedimento é o mesmo até a obtenção da quantidade de moléculas do oligômero em cada um dos pontos da curva. Porém, nesse caso, cada molécula representa uma cópia do gene. Esse valor é então dividido por dois, uma vez que temos duas cópias do gene em nosso genoma diploide, sendo o valor final dado como “cópias de 36B4 por genoma diploide”.

A partir dos valores de Ct (*threshold cycle*) de cada ponto da curva dos oligômeros e dos seus respectivos valores esperados para cada concentração descritos acima, obtemos, enfim, uma fórmula que, aplicadas aos Cts médios das amostras, resulta no valor de quilobases (Kb) de telômero e cópias genoma diplóide do 36B4. Calculamos então a razão T/S (T: telômeros; S: *single copy gene*, gene de cópia única – 36B4), gerando o valor de Kb de telômeros por genoma. Finalmente dividimos esse valor por 80 (número de cromossomos do genoma diploide do camundongo - 40 - multiplicado por 2 - número de pontas teloméricas por cromossomo) - obtendo, assim, o valor médio do tamanho telomérico.

4.7. Análise estatística

Os grupos foram avaliados quanto ao comprimento telomérico utilizando análise de variância com teste Tukey *post hoc* para comparação entre o comprimento telomérico de cada tecido. As análises foram feitas no *software* R, versão 3.2.0, com a função TukeyHSD, que incorpore o ajuste para múltiplas comparações. O nível de significância (α) foi fixado em $<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Avaliação do comprimento telomérico em diferentes estruturas cerebrais

Os valores de média e desvio padrão (em Kb) de cada grupo divididos por região cerebral estão representados na tabela 1. As análises individuais são descritas nos tópicos seguintes.

Tabela 1 - Representação dos valores de comprimento telomérico nas diferentes estruturas cerebrais de animais TG e WT.

Estrutura	Modelo	Tratamento	n	Média ± DP(Kb)
Córtex parietal	3xTg-AD	Li0	6	5,00 ± 3,31
		Li1	5	9,91 ± 2,93
		Li2	6	7,74 ± 5,58
	WT	Li0	7	4,28 ± 1,63
		Li1	7	4,73 ± 2,66
		Li2	6	4,15 ± 2,50
Hipocampo	3xTg-AD	Li0	6	5,59 ± 1,63
		Li1	5	4,53 ± 1,99
		Li2	7	7,40 ± 2,41
	WT	Li0	8	4,38 ± 2,40
		Li1	8	3,90 ± 1,54
		Li2	6	3,60 ± 1,41
Epitélio olfatório	3xTg-AD	Li0	5	13,91 ± 8,26
		Li1	4	12,04 ± 12,05
		Li2	6	9,95 ± 5,98
	WT	Li0	7	6,32 ± 2,18
		Li1	7	9,36 ± 6,34
		Li2	5	13,76 ± 10,42

5.2. Análise do comprimento telomérico no córtex parietal

A Figura 7 mostra a razão T/S no córtex parietal em relação ao tratamento com lítio nos camundongos Wt e Tg. Na ausência de tratamento (Li0), observamos comprimentos teloméricos similares entre os camundongos Wt e Tg (estado basal; $p=1,00$). Não encontramos diferença estatística significativa quando comparando os camundongos Wt tratados com lítio (Li1 e Li2) com o grupo sem tratamento (Li0), indicando ausência de efeito do tratamento com lítio em camundongos não-transgênicos (WtLi0 vs WtLi1, $p=1,00$; WtLi0 vs WtLi2, $p=1,00$). Nos animais 3xTg-AD observamos um aumento de 98% no comprimento telomérico no grupo Li1, e de 55% no grupo Li2 comparados ao controle Li0, porém essas diferenças não foram significantes (TgLi0 vs TgLi1, $p=0,07$; TgLi0 vs TgLi2, $p=0,54$). Da mesma forma, a comparação entre os tratamentos (Li1 vs Li2) não apresentaram efeitos significantes no comprimento telomérico, considerando-se separadamente os animais Wt e Tg (WtLi1 vs WtLi2, $p=1,00$; TgLi1 vs TgLi2, $p=0,79$). A análise de variância (ANOVA) de uma via com teste Tukey *post hoc* indicou diferença significativa entre os animais Wt e Tg tratados cronicamente com 1,0g de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração (Li1; $p=0,04$), com telômeros 109% maiores no grupo transgênico. Esses efeitos não foram observados nos camundongos tratados com maior concentração de lítio (Li2; $p=0,26$).

Figura 7 –Comparação do comprimento telomérico no córtex parietal dos animais. Os gráficos mostram o comprimento médio e desvio padrão dos telômeros em Kb (razão T/S) de cada grupo. Tg: camundongos triplo transgênicos (3xTg-AD); Wt: camundongos selvagens (*Wild Type*); Li0: tratamento com ração padrão; Li1: tratamento com 1 g de Li_2CO_3 /Kg de ração; Li2: tratamento com 2 g de Li_2CO_3 /Kg de ração. Os dados mostram telômeros aumentados (* $p=0.0375$) no córtex parietal dos animais TgLi1 quando comparados aos WtLi1.

5.3. Análise do comprimento telomérico no hipocampo

Os dados da razão T/S no hipocampo dos animais Wt e Tg tratados cronicamente com ração padrão ou enriquecida com lítio estão dispostos na Figura 8. Semelhantes aos achados no córtex parietal, o comprimento telomérico no hipocampo foi estatisticamente similar em camundongos Wt e Tg sem tratamento (Li0; $p=0,86$). A comparação entre animais tratados (Li1 e Li2) com controles (Li0) não indicou diferença significativa no comprimento telomérico quando os dois grupos de animais (Wt e Tg) foram analisados separadamente (WtLi0vs WtLi1, $p=1,00$; WtLi0 vs WtLi2, $p=0,98$; TgLi0 vs TgLi1, $p=0,94$; TgLi0 vs TgLi2, $p=0,56$). Entre os animais transgênicos, observamos efeitos díspares no comprimento telomérico dos camundongos tratados com lítio em relação ao controle (Li0): doses mais baixas (Li1) resultaram em uma redução no comprimento telomérico de 19% e aumento de 32% em doses maiores (Li2); porém nota-se que essas diferenças não foram estatisticamente significantes (TgLi0 vs TgLi1, $p=0,94$; TgLi0 vs TgLi2, $p=0,56$). O teste ANOVA de uma via com Tukey *post hoc* indicou um aumento significativo (105%) do comprimento telomérico em camundongos Tg cronicamente tratados com 2,0g de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração (Li2) quando comparados com camundongos Wt que receberam o mesmo tratamento ($p=0,02$).

Figura 8 -Comparação do comprimento telomérico no hipocampo dos animais.

Os gráficos mostram o comprimento médio e desvio padrão dos telômeros em Kb (razão T/S) de cada grupo. Tg: camundongos triplo transgênicos (3xTg-AD); Wt: camundongos selvagens (*Wild Type*); Li0: tratamento com ração padrão; Li1: tratamento com 1 g de Li_2CO_3 /Kg de ração; Li2: tratamento com 2 g de Li_2CO_3 /Kg de ração. Os dados mostram telômeros aumentados (* $p=0.0159$) no hipocampo dos animais TgLi2 quando comparados aos WtLi2.

5.4 Análise do comprimento telomérico no epitélio olfatório

A mesma análise de variância com teste Tukey *post hoc* foi conduzida para a comparação do comprimento telomérico do epitélio olfatório dos animais. Não observamos nenhuma significância estatística nos dados analisados dentro do tecido ($p>0,05$). Notou-se uma grande dispersão nos dados, evidenciado pelo alto desvio padrão das amostras, que pode ter contribuído para a falta de diferenças entre os grupos. Os dados da razão T/S no epitélio olfatório estão representados na Figura 9.

Figura 9-Comparação do comprimento telomérico no epitélio olfatório dos animais. Os gráficos mostram o comprimento médio e desvio padrão dos telômeros em Kb (razão T/S) de cada grupo. Tg: camundongos triplo transgênicos (3xTg-AD); Wt: camundongos selvagens (Wild Type); Li0: tratamento com ração padrão; Li1: tratamento com 1 g de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração; Li2: tratamento com 2 g de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração.

6 DISCUSSÃO

Nossos dados evidenciam que o tratamento crônico com lítio está associado ao aumento do comprimento telomérico no tecido cerebral de camundongos 3xTg-AD quando comparados aos controles WT. Efeitos distintos foram observados de acordo com a concentração de lítio e região cerebral, i.e., em menores concentrações (1,0g de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração) no córtex parietal, em maiores concentrações (2,0 de $\text{Li}_2\text{CO}_3/\text{Kg}$ de ração) no hipocampo. Não observamos tais efeitos no epitélio olfatório. Esses resultados indicam que o efeito do tratamento crônico com lítio no comprimento telomérico cerebral parece restrito aos camundongos transgênicos quando comparados aos WT. Tal dado sugere que a presença da patologia, DA, é necessária para o efeito biológico do lítio sobre os telômeros.

O lítio pode ter um importante papel na modulação da telomerase, uma enzima ribonucleoproteica responsável pela manutenção do comprimento telomérico (ZHANG et al., 2012; POLHO et al., 2015; OZTURK; LI; TERGAONKAR, 2017). A TERT é a subunidade catalítica que regula e limita a atividade da telomerase (HARTWIG et al., 2012; OZTURK; LI; TERGAONKAR, 2017). A regulação do gene *hTERT*, que codifica a TERT em humanos, ocorre principalmente em nível de transcrição e é dependente da atividade da β -catenina. A β -catenina é degradada pela GSK-3 β , uma importante e altamente expressa quinase em neurônios que sofre inibição pelo lítio. Dessa forma, a disponibilidade da β -catenina é determinada pela ativação da GSK-3 β , ou seja, a inibição da GSK-3 β por lítio promove a retenção da β -catenina (prevenindo sua degradação), que por sua vez provoca a ativação da transcrição da *hTERT* e consequente efeito na manutenção e/ou aumento do comprimento telomérico (CHUANG; WANG; CHIU, 2011; POLHO et al., 2015). Sabe-se que a GSK-3 β encontra-se hiperativada na DA, sendo relevante para os principais processos patológicos, como deposição da A β (PHIEL et al., 2003) e hiperfosforilação da proteína tau (HIMMELSTEIN et al., 2012; BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015).

Ademais, é sabido que o lítio modula e regula positivamente diversos fatores neurotróficos no tecido cerebral, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (DE-PAULA et al., 2016). O BDNF é uma importante neurotrofina envolvida na plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal e ramificações dendríticas (HUANG; REICHARDT, 2001; MACHADO-VIEIRA et al., 2009). O BDNF aumenta a atividade da telomerase, e a supressão da síntese de TERT prejudica a neuroproteção promovida pelo BDNF contra morte induzida por glutamato em neurônios de cérebro embrionário (FU; LU; MATTSON, 2002). Os efeitos do BDNF são principalmente mediados pelo receptor de tirosina-quinase-B, que ativa diversas vias de sinalização *downstream* (HUANG; REICHARDT, 2003). Entre essas vias, as cascatas PI₃K/Akt e MAPK/ERK_{1/2} parecem ser as mediadoras dos efeitos neuroprotetores do BDNF (ALMEIDA et al., 2005; NGUYEN et al., 2009). Estudos mostram que a ativação de ambas as vias podem regular a telomerasea nível de transcrição e pós-transcrição (MAIDA et al., 2002; KIMURA et al., 2004; KAWAUCHI; IHJIMA; YAMADA, 2005; BERMUDEZ et al., 2008).

A regulação promovida pelo lítio de outros importantes fatores homeostáticos (como interleucinas e fosfolipase A2) é diferentemente afetada por sua concentração (DE-PAULA et al., 2015; DE-PAULA; GATTAZ; FORLENZA, 2016). Em um recente estudo, De-Paula e colaboradores (DE-PAULA; GATTAZ; FORLENZA, 2016) encontraram secreção aumentada de BDNF em culturas primárias de neurônios hipocampus e corticais cronicamente tratadas com concentrações de lítio subterapêuticas (0,02 e 0,2 mM) e terapêutica (2 mM); esse efeito mostrou-se mais proeminente em neurônios corticais. Regiões cerebrais distintas podem apresentar especificidades teciduais e, portanto, diferenças quanto à capacidade de responder à estímulos farmacológicos (CONNER et al., 1997). Esse conceito pode ser a base para suportar nos achados demonstrando que o lítio modula diferentemente o comprimento telomérico de acordo com a concentração e região cerebral envolvida.

Ainda, nossos dados não suportam o conceito que camundongos modelo para DA podem apresentar telômeros encurtados quando comparados com controles saudáveis. Em humanos, como proposto por estudos com amostras de pacientes com DA e reforçado por uma recente meta-análise (FORERO et al., 2016), a patologia da DA é associada à redução do comprimento telomérico. Nota-se, no entanto, que a maior parte desses destes trabalhos se utilizam de leucócitos provenientes de sangue periférico. Resultados de estudos feitos em cérebros *post mortem* apresentam achados inconsistentes. Segundo Lukens e colaboradores (LUKENS et al., 2009), nenhuma diferença no comprimento telomérico foi encontrada no cerebelo de pacientes com DA comparados com controles saudáveis pareados por idade. Thomas et al. (THOMAS; O' CALLAGHAN; FENECH, 2008) encontraram telômeros mais longos no hipocampo de pacientes com DA comparados com controles saudáveis. Ademais, foi mostrado que ratos expostos a estresse durante o desenvolvimento apresentam telômeros encurtados no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal (BOTHIA et al., 2012). Esses estudos sugerem que os achados de comprimento telomérico no sangue periférico podem não ser representativos do que ocorre no sistema nervoso central, embora as razões para essas discrepâncias permaneçam pouco conhecidas. Ainda, recentes estudos estereológicos em camundongos 3xTg-AD maduros (onze meses de idade) indicam que, apesar da ocorrência de atrofia cerebral e redução do volume hipocampal, há uma preservação do número total de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo (MANAYE et al., 2013; SCHAEFFER et al., 2017), sugerindo um mecanismo de auto-preservação que pode refletir em aumento da manutenção do comprimento telomérico. A morte neuronal é presente em camundongos 3xTg-AD mais velhos (18 a 23 meses), indicando que a progressiva severidade da doença eventualmente supera as estratégias de sobrevivência que são acionadas nas etapas iniciais do processo de envelhecimento (PIEDRAHITA et al., 2010). Em nosso estudo, usamos camundongos com 11 meses de idade, sendo possível que a patologia da DA não estivesse completamente estabelecida, embora seja determinado que esses animais já apresentam progressiva deposição de extracelular de A β no tecido cerebral (ODDO et al., 2003a, 2003b) e sinais de declínio cognitivo

(BILLINGS et al., 2005). Juntas, essas evidências sugerem que o próprio envelhecimento pode ter papel muito mais importante no encurtamento telomérico do que a inflamação subsequente à deposição de A β neste modelo animal (MARCHESE et al., 2014).

Finalmente, nossos dados mostram grande dispersão do comprimento telomérico no epitélio olfatório tanto de animais transgênicos quanto selvagens. Esse tecido é o destino final de neuroblastos (células-tronco neurais) que se originam da zona subventricular e então migram através da via migratória rostral (KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; KRONENBERG et al., 2010). Os neuroblastos se integram na rede neuronal do bulbo olfatório, promovendo um alto grau de plasticidade, importante para a adaptação de roedores a novas pistas olfativas no habitat. Como o comprimento telomérico é um marcador de envelhecimento celular, sendo afetado pelo número de divisões celulares, é plausível um tecido que contém grande número de ambas células maduras e recém-nascidas apresente uma maior variabilidade nos resultados. Dessa forma, especulamos que o uso desse tecido após um processo de homogeneização pode não ser a melhor estratégia para a análise do comprimento telomérico.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho é o primeiro a investigar o comprimento telomérico no tecido cerebral de camundongos triplo transgênicos para a DA. Nossos achados indicam um efeito regulatório do tratamento crônico com lítio na manutenção e aumento do comprimento telomérico no cérebro sofrendo injúria (DA). Esse efeito é observado em diferentes concentrações de lítio dependendo do tecido envolvido. Ademais, na contramão da literatura, não encontramos encurtamento telomérico no tecido cerebral de camundongos triplo transgênicos com 11 meses de idade em relação aos controles. Esses efeitos podem ser modulados por diversos fatores (e.g., atividade da telomerase e expressão de TERT, sinalização de BDNF, fosforilação da GSK3- β) e, portanto, estudos futuros devem abranger esses mecanismos para a melhor compreensão das propriedades moduladoras do lítio sobre a homeostase dos telômeros.

8 REFERÊNCIAS

3xTg | ALZFORUM. Disponível em: <<http://www.alzforum.org/research-models/3xtg>>. Acesso em: 6 dez. 2017.

ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B. J.; MELO, C. V.; GOMES, J. R.; MENDES, C. S.; GRÃOS, M. M.; CARVALHO, R. F.; CARVALHO, a P.; DUARTE, C. B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell death and differentiation**, v. 12, n. 10, p. 1329–1343, 2005.

ALUISE, C. D.; ROBINSON, R. A. S.; BECKETT, T. L.; MURPHY, M. P.; CAI, J.; PIERCE, W. M.; MARKESBERY, W. R.; BUTTERFIELD, D. A. Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. **Neurobiology of disease**, v. 39, n. 2, p. 221–8, ago. 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 11, n. 3, p. 332–84, mar. 2015.

ARNOLD, S. E.; LEE, E. B.; MOBERG, P. J.; STUTZBACH, L.; KAZI, H.; HAN, L.-Y.; LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. **Annals of neurology**, v. 67, n. 4, p. 462–9, abr. 2010.

ASTRUP, A. S.; TARNOW, L.; JORSAL, A.; LAJER, M.; NZIETCHUENG, R.; BENETOS, A.; ROSSING, P.; PARVING, H. H. Telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 1, p. 45–48, 2010.

AVILION, A. A.; PIATYSZEK, M. A.; GUPTA, J.; SHAY, J. W.; BACCHETTI, S.; GREIDER, C. W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. **Cancer research**, v. 56, n. 3, p. 645–650, 1 fev. 1996.

BAEK, S.; BU, Y.; KIM, H.; KIM, H. Telomerase induction in astrocytes of Sprague-Dawley rat after ischemic brain injury. **Neuroscience letters**, v. 363, n. 1, p. 94–6, 3 jun. 2004.

BALDESSARINI, R. J.; TONDO, L.; HENNEN, J. Treating the Suicidal Patient with Bipolar Disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 932, n. 1, p. 24–43, 25 jan. 2006.

BERMUDEZ, Y.; YANG, H.; CHENG, J. Q.; KRUK, P. A. Pyk2/ERK 1/2 mediate Sp1- and c-Myc-dependent induction of telomerase activity by epidermal growth factor. **Growth Factors**, v. 26, n. 1, p. 1–11, 2008.

BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 114–131, abr. 2015.

- BILLINGS, L. M.; ODDO, S.; GREEN, K. N.; MCGAUGH, J. L.; LAFERLA, F. M. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. **Neuron**, v. 45, n. 5, p. 675–88, 3 mar. 2005.
- BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 1, p. 33–53, 25 mar. 1978.
- BLACKBURN, E. H.; SZOSTAK, J. W. The Molecular Structure of Centromeres and Telomeres. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 163–194, 28 jun. 1984.
- BOTHA, M.; GRACE, L.; BUGARITH, K.; RUSSELL, V. A.; KIDD, M.; SEEDAT, S.; HEMMING, S. M. J. The impact of voluntary exercise on relative telomere length in a rat model of developmental stress. **BMC research notes**, v. 5, p. 697, jan. 2012.
- BOUKAMP, P.; MIRANCEA, N. Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy? **Experimental dermatology**, v. 16, n. 1, p. 71–9, jan. 2007.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 18, n. 4 Suppl, p. S85-8, 1997.
- BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: synergy between the Butterfield and Markesbery laboratories. **Neuromolecular medicine**, v. 13, n. 1, p. 19–22, mar. 2011.
- BUTTERFIELD, D. A.; GALVAN, V.; LANGE, M. B.; TANG, H.; SOWELL, R. A.; SPILMAN, P.; FOMBONNE, J.; GOROSTIZA, O.; ZHANG, J.; SULTANA, R.; BREDESEN, D. E. In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 1, p. 136–44, 1 jan. 2010.
- BUTTERFIELD, D. A.; REED, T.; NEWMAN, S. F.; SULTANA, R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 5, p. 658–77, 1 set. 2007.
- CADE, J. F. J. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. **The Medical journal of Australia**, v. 2, n. 10, p. 349–52, 3 set. 1949.
- CALISSANO, P.; MATRONE, C.; AMADORO, G. Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. **Communicative & integrative biology**, v. 2, n. 2, p. 163–9, jan. 2009.
- CALLICOTT, R. J.; WOMACK, J. E. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. **Comparative Medicine**, v. 56, n. 1, p. 17–22, 2006.
- CAMINS, A.; VERDAGUER, E.; JUNYENT, F.; YESTE-VELASCO, M.; PELEGRÍ, C.;

VILAPLANA, J.; PALLÁS, M. **Potential mechanisms involved in the prevention of neurodegenerative diseases by lithium** *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 2009. .

CASTELLANO, J. M.; KIM, J.; STEWART, F. R.; JIANG, H.; DEMATTOS, R. B.; PATTERSON, B. W.; FAGAN, A. M.; MORRIS, J. C.; MAWUENYEGA, K. G.; CRUCHAGA, C.; GOATE, A. M.; BALES, K. R.; PAUL, S. M.; BATEMAN, R. J.; HOLTZMAN, D. M. Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57-89ra57, 29 jun. 2011.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 10, p. e47, 15 maio 2002.

CHANTAL, S.; LABELLE, M.; BOUCHARD, R. W.; BRAUN, C. M. J.; BOULANGER, Y. Correlation of regional proton magnetic resonance spectroscopic metabolic changes with cognitive deficits in mild Alzheimer disease. **Archives of neurology**, v. 59, n. 6, p. 955–62, 2002.

CHEN, G.; RAJKOWSKA, G.; DU, F.; SERAJI-BOZORGZAD, N.; MANJI, H. K. Enhancement of Hippocampal Neurogenesis by Lithium. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 4, p. 1729–1734, 4 jan. 2002.

CHIU, C.-T.; CHUANG, D.-M. Neuroprotective action of lithium in disorders of the central nervous system. **Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences**, v. 36, n. 6, p. 461–76, jun. 2011.

CHIU, C. L.; HEARN, N. L.; PAINE, D.; STEINER, N.; LIND, J. M. Does Telomere Shortening Precede the Onset of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Mice? **Twin Research and Human Genetics**, v. 19, n. 5, p. 422–429, 2016.

CHUANG, D.-M.; WANG, Z.; CHIU, C.-T. GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, p. 15, jan. 2011.

CONNER, J. M.; LAUTERBORN, J. C.; YAN, Q.; GALL, C. M.; VARON, S. Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2295–2313, 1997.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; RISCH, N. J.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; RIMMLER, J. B.; LOCKE, P. A.; CONNEALLY, P. M.; SCHMADER, K. E.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. **Nature Genetics**, v. 7, n. 2, p. 180–184, 1 jun. 1994.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science (New York, N.Y.)**, v. 261, n. 5123, p. 921–3, 13 ago. 1993.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R1, p. R12–R20, 15 abr. 2010.

CSERNANSKY, J. G.; WANG, L.; JOSHI, S.; MILLER, J. P.; GADO, M.; KIDO, D.; MCKEEL, D.; MORRIS, J. C.; MILLER, M. I. Early DAT is distinguished from aging by high-dimensional mapping of the hippocampus. Dementia of the Alzheimer type. **Neurology**, v. 55, n. 11, p. 1636–43, 12 dez. 2000.

CSERNANSKY, J. G.; WANG, L.; SWANK, J.; MILLER, J. P.; GADO, M.; MCKEEL, D.; MILLER, M. I.; MORRIS, J. C. Preclinical detection of Alzheimer's disease: hippocampal shape and volume predict dementia onset in the elderly. **NeuroImage**, v. 25, n. 3, p. 783–92, 15 abr. 2005.

D'INTRONO, A.; SOLFRIZZI, V.; COLACICCO, A. M.; CAPURSO, C.; AMODIO, M.; TODARELLO, O.; CAPURSO, A.; KEHOE, P. G.; PANZA, F. Current knowledge of chromosome 12 susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 11, p. 1537–53, nov. 2006.

DAMJANOVIC, A. K.; YANG, Y.; GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K.; NGUYEN, H.; LASKOWSKI, B.; ZOU, Y.; BEVERSDORF, D. Q.; WENG, N. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 6, p. 4249–54, 15 set. 2007.

DE-PAULA, V. de J.; KERR, D. S.; DE CARVALHO, M. P. F.; SCHAEFFER, E. L.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F.; FORLENZA, O. V. Long-Term Lithium Treatment Increases cPLA₂ and iPLA₂ Activity in Cultured Cortical and Hippocampal Neurons. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 11, p. 19878–85, 2015.

DE-PAULA, V. J.; GATTAZ, W. F.; FORLENZA, O. V. Long-term lithium treatment increases intracellular and extracellular brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cortical and hippocampal neurons at subtherapeutic concentrations. **Bipolar Disorders**, v. 18, n. 8, p. 692–695, 2016.

DE-PAULA, V. J.; KERR, D. S.; SCOLA, G.; GATTAZ, W. F.; FORLENZA, O. V. Lithium Distinctly Modulates the Secretion of Pro- and Anti- Inflammatory Interleukins in Co-Cultures of Neurons and Glial Cells at Therapeutic and Sub-Therapeutic Concentrations. **Current Alzheimer research**, v. 13, n. 8, p. 848–52, 2016.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.

DEANE, R.; WU, Z.; ZLOKOVIC, B. V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 35, n. 11 Suppl 1, p. 2628–31, 1 nov. 2004.

DICKSON, T. C.; SAUNDERS, H. L.; VICKERS, J. C. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 23, n. 6, p. 483–91, dez. 1997.

DONAHUE, J. E.; FLAHERTY, S. L.; JOHANSON, C. E.; DUNCAN, J. A.; SILVERBERG, G. D.; MILLER, M. C.; TAVARES, R.; YANG, W.; WU, Q.; SABO, E.; HOVANESIAN, V.; STOPA, E. G. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**, v. 112, n. 4, p. 405–15, out. 2006.

DUYCKAERTS, C.; POTIER, M.-C.; DELATOUR, B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 1, p. 5–38, 29 nov. 2007.

FENG, J.; FUNK, W. D.; WANG, S. S.; WEINRICH, S. L.; AVILION, A. A.; CHIU, C. P.; ADAMS, R. R.; CHANG, E.; ALLSOPP, R. C.; YU, J. The RNA component of human telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5228, p. 1236–41, 1 set. 1995.

FICHTMAN, B.; HAREL, A. **Stress and aging at the nuclear gatewayMechanisms of Ageing and Development**, 2014. .

FORERO, D. A.; GONZÁLEZ-GIRALDO, Y.; LÓPEZ-QUINTERO, C.; CASTRO-VEGA, L. J.; BARRETO, G. E.; PERRY, G. Meta-analysis of Telomere Length in Alzheimer's Disease. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 8, p. 1069–1073, 2016.

FORLENZA, O. V.; DE PAULA, V. J.; MACHADO-VIEIRA, R.; DINIZ, B. S.; GATTAZ, W. F. Does lithium prevent Alzheimer's disease? **Drugs & aging**, v. 29, n. 5, p. 335–42, 1 maio 2012.

FORLENZA, O. V.; DINIZ, B. S.; RADANOVIC, M.; SANTOS, F. S.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 198, n. 5, p. 351–6, 1 maio 2011.

FU, W.; LU, C.; MATTSON, M. P. Telomerase Mediates the Cell Survival-Promoting Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Secreted Amyloid Precursor Protein in Developing Hippocampal Neurons. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 24, p. 10710–10719, 2002.

- GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 4, n. 4, p. 203–16, jul. 2011.
- GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 120, n. 3, p. 885–90, 16 maio 1984a.
- GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 122, n. 3, p. 1131–5, 16 ago. 1984b.
- GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. Telomeres, telomerase and cancer. **Scientific American**, v. 274, n. 2, p. 92–7, fev. 1996.
- GRIFFITH, J. D.; COMEAU, L.; ROSENFELD, S.; STANSEL, R. M.; BIANCHI, A.; MOSS, H.; DE LANGE, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 503–14, 14 maio 1999.
- GRODSTEIN, F.; VAN OIJEN, M.; IRIZARRY, M. C.; ROSAS, H. D.; HYMAN, B. T.; GROWDON, J. H.; DE VIVO, I. Shorter telomeres may mark early risk of dementia: preliminary analysis of 62 participants from the nurses' health study. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1590, jan. 2008.
- GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; QUINLAN, M.; TUNG, Y. C.; ZAIDI, M. S.; WISNIEWSKI, H. M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 13, p. 6084–9, 5 maio 1986.
- GUNTEN, A. Von; KÖVARI, E.; BUSSIÈRE, T.; RIVARA, C. B.; GOLD, G.; BOURAS, C.; HOF, P. R.; GIANNAKOPOULOS, P. Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 2, p. 270–277, 2006.
- GUPTA, N.; TANEJA, R.; PANDEY, A.; MUKESH, M.; SINGH, H.; GUPTA, S. C. Replicative senescence, telomere shortening and cell proliferation rate in Gaddi goat's skin fibroblast cell line. **Cell biology international**, v. 31, n. 10, p. 1257–64, out. 2007.
- HALAGAPPA, V. K. M.; GUO, Z.; PEARSON, M.; MATSUOKA, Y.; CUTLER, R. G.; LAFERLA, F. M.; MATTSON, M. P. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 212–220, abr. 2007.
- HARDY, J.; HIGGINS, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 10 abr. 1992.
- HARDY, J.; SELKOE, D. J. **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and**

problems on the road to therapeutics*Science*, 19 jul. 2002. .

HARTWIG, F. P.; NEDEL, F.; COLLARES, T. V; TARQUINIO, S. B. C.; NÖR, J. E.; DEMARCO, F. F. Telomeres and tissue engineering: the potential roles of TERT in VEGF-mediated angiogenesis. **Stem cell reviews**, v. 8, n. 4, p. 1275–81, dez. 2012.

HAYFLICK, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS.

Experimental cell research, v. 37, p. 614–36, mar. 1965.

HERBIG, U.; SEDIVY, J. M. Regulation of growth arrest in senescence: Telomere damage is not the end of the story. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 1, p. 16–24, jan. 2006.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S. B.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103–108, 2002.

HIMMELSTEIN, D. S.; WARD, S. M.; LANCIA, J. K.; PATTERSON, K. R.; BINDER, L. I. **Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease***Pharmacology and Therapeutics*, 2012.

.

HOCHSTRASSER, T.; MARKSTEINER, J.; HUMPEL, C. Telomere length is age-dependent and reduced in monocytes of Alzheimer patients. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 2, p. 160–3, fev. 2012.

HONIG, L. S.; KANG, M. S.; SCHUPF, N.; LEE, J. H.; MAYEUX, R. Association of shorter leukocyte telomere repeat length with dementia and mortality. **Archives of neurology**, v. 69, n. 10, p. 1332–9, out. 2012.

HONIG, L. S.; SCHUPF, N.; LEE, J. H.; TANG, M. X.; MAYEUX, R. Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE epsilon4 and dementia. **Annals of neurology**, v. 60, n. 2, p. 181–7, ago. 2006.

HU, Y.; DING, W.; ZHU, X.; CHEN, R.; WANG, X. Olfactory Dysfunctions and Decreased Nitric Oxide Production in the Brain of Human P301L Tau Transgenic Mice. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 4, p. 722–730, 2016.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, p. 609–642, 2003.

HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–25, 27 dez. 2006.

HULTDIN, M.; ROSENQUIST, R.; THUNBERG, U.; TOBIN, G.; NORRBACK, K.-F.; JOHNSON, A.; SUNDSTRÖM, C.; ROOS, G. Association between telomere length and VH gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 4, p. 593–598, 18 fev. 2003.

JENKINS, E. C.; YE, L.; GU, H.; NI, S. A.; DUNCAN, C. J.; VELINOV, M.; PANG, D.; KRINSKY-MCHALE, S. J.; ZIGMAN, W. B.; SCHUPF, N.; SILVERMAN, W. P. Increased “absence” of telomeres may indicate Alzheimer’s disease/dementia status in older individuals with Down syndrome. **Neuroscience letters**, v. 440, n. 3, p. 340–3, 8 ago. 2008.

JEYNES, B.; PROVIAS, J. Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. **Current Alzheimer research**, v. 5, n. 5, p. 432–7, out. 2008.

JUCKER, M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1210–1214, 21 nov. 2010.

KANG, H. J.; CHOI, Y. S.; HONG, S.-B.; KIM, K.-W.; WOO, R.-S.; WON, S. J.; KIM, E. J.; JEON, H. K.; JO, S.-Y.; KIM, T. K.; BACHOO, R.; REYNOLDS, I. J.; GWAG, B. J.; LEE, H.-W. Ectopic Expression of the Catalytic Subunit of Telomerase Protects against Brain Injury Resulting from Ischemia and NMDA-Induced Neurotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1280–1287, 11 fev. 2004.

KANTARCI, K.; JACK JR., C. R.; XU, Y. C.; CAMPEAU, N. G.; O'BRIEN, P. C.; SMITH, G. E.; IVNIK, R. J.; BOEVE, B. F.; KOKMEN, E.; TANGALOS, E. G.; PETERSEN, R. C. Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: A 1H MRS study. **Neurology**, v. 55, n. 2, p. 210–217, 2000.

KAWAUCHI, K.; IHJIMA, K.; YAMADA, O. IL-2 increases human telomerase reverse transcriptase activity transcriptionally and posttranslationally through phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt, heat shock protein 90, and mammalian target of rapamycin in transformed NK cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 9, p. 5261–9, 1 maio 2005.

KIMURA, A.; OHMICHII, M.; KAWAGOE, J.; KYO, S.; MABUCHI, S.; TAKAHASHI, T.; OHSHIMA, C.; ARIMOTO-ISHIDA, E.; NISHIO, Y.; INOUE, M.; KURACHI, H.; TASAKA, K.; MURATA, Y. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. **Oncogene**, v. 23, n. 26, p. 4505–15, 2004.

KLOBUTCHER, L. A.; SWANTON, M. T.; DONINI, P.; PRESCOTT, D. M. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 5, p. 3015–9, maio 1981.

KOTA, L. N.; BHARATH, S.; PURUSHOTTAM, M.; MOILY, N. S.; SIVAKUMAR, P. T.;

VARGHESE, M.; PAL, P. K.; JAIN, S. Reduced telomere length in neurodegenerative disorders may suggest shared biology. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 27, n. 2, p. e92-6, 2015.

KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 149–84, 2009.

KRIL, J. J.; HODGES, J.; HALLIDAY, G. Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 361, n. 1–3, p. 9–12, 6 maio 2004.

KRONENBERG, G.; GERTZ, K.; BALDINGER, T.; KIRSTE, I.; ECKART, S.; YILDIRIM, F.; JI, S.; HEUSER, I.; SCHRÖCK, H.; HÖRTNAGL, H.; SOHR, R.; DJOUFACK, P. C.; JÜTTNER, R.; GLASS, R.; PRZESDZING, I.; KUMAR, J.; FREYER, D.; HELLWEG, R.; KETTENMANN, H.; FINK, K. B.; ENDRES, M. Impact of actin filament stabilization on adult hippocampal and olfactory bulb neurogenesis. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 9, p. 3419–3431, 2010.

LACHÉN-MONTES, M.; GONZÁLEZ-MORALES, A.; DE MORENTIN, X. M.; PÉREZ-VALDERRAMA, E.; AUSÍN, K.; ZELAYA, M. V.; SERNA, A.; ASO, E.; FERRER, I.; FERNÁNDEZ-IRIGOYEN, J.; SANTAMARÍA, E. An early dysregulation of FAK and MEK/ERK signaling pathways precedes the β -amyloid deposition in the olfactory bulb of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Proteomics**, v. 148, p. 149–158, 2016.

LAU, D. H. W.; HOGSETH, M.; PHILLIPS, E. C.; O'NEILL, M. J.; POOLER, A. M.; NOBLE, W.; HANGER, D. P. Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 4, n. 1, p. 49, 18 dez. 2016.

LEVY, E.; CARMAN, M. D.; FERNANDEZ-MADRID, I. J.; POWER, M. D.; LIEBERBURG, I.; VAN DUINEN, S. G.; BOTS, G. T.; LUYENDIJK, W.; FRANGIONE, B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4959, p. 1124–6, 1 jun. 1990.

LIN, J.; COUNTRYMAN, P.; BUNCHEER, N.; KAUR, P.; E, L.; ZHANG, Y.; GIBSON, G.; YOU, C.; WATKINS, S. C.; PIEHLER, J.; OPRESKO, P. L.; KAD, N. M.; WANG, H. TRF1 and TRF2 use different mechanisms to find telomeric DNA but share a novel mechanism to search for protein partners at telomeres. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 4, p. 2493–2504, fev. 2014.

LINGNER, J.; HUGHES, T. R.; SHEVCHENKO, A.; MANN, M.; LUNDBLAD, V.; CECH, T. R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5312, p. 561–7, 25 abr. 1997.

- LIU, M.; HUO, Y. R.; WANG, J.; WANG, C.; LIU, S.; LIU, S.; WANG, J.; JI, Y. Telomere Shortening in Alzheimer's Disease Patients. **Ann Clin Lab Sci**, v. 46, n. 3, p. 260–265, 2016.
- LUKENS, J. N.; VAN DEERLIN, V.; CLARK, C. M.; XIE, S. X.; JOHNSON, F. B. Comparisons of telomere lengths in peripheral blood and cerebellum in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 5, n. 6, p. 463–9, nov. 2009.
- MACCIONI, R. B.; ROJO, L. E.; FERNÁNDEZ, J. A.; KULJIS, R. O. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, p. 240–6, fev. 2009.
- MACHADO-VIEIRA, R.; YUAN, P.; BRUTSCHE, N.; DIAZGRANADOS, N.; LUCKENBAUGH, D.; MANJI, H. K.; ZARATE, C. A. Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70, n. 12, p. 1662–1666, 2009.
- MAIDA, Y.; KYO, S.; KANAYA, T.; WANG, Z.; YATABE, N.; TANAKA, M.; NAKAMURA, M.; OHMICH, M.; GOTOH, N.; MURAKAMI, S.; INOUE, M. Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. **Oncogene**, v. 21, n. 26, p. 4071–4079, 2002.
- MAN, A. L.; GICHEVA, N.; NICOLETTI, C. The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. **Cellular immunology**, v. 289, n. 1–2, p. 112–8, jan. 2014.
- MANAYE, K. F.; MOUTON, P. R.; XU, G.; DREW, A.; LEI, D. L.; SHARMA, Y.; REBECK, G. W.; TURNER, S. Age-related loss of noradrenergic neurons in the brains of triple transgenic mice. **Age**, v. 35, n. 1, p. 139–147, 2013.
- MARCHESE, M.; COWAN, D.; HEAD, E.; MA, D.; KARIMI, K.; ASHTHORPE, V.; KAPADIA, M.; ZHAO, H.; DAVIS, P.; SAKIC, B. Autoimmune manifestations in the 3xtg-ad model of alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 39, n. 1, p. 191–210, 2014.
- MARCHESE, V. T. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 1, p. 5–13, 1 jan. 2011.
- MARTINSSON, L.; WEI, Y.; XU, D.; MELAS, P. a; MATHÉ, a a; SCHALLING, M.; LAVEBRATT, C.; BACKLUND, L. Long-term lithium treatment in bipolar disorder is associated with longer leukocyte telomeres. **Translational psychiatry**, v. 3, n. April, p. e261, 2013.
- MCCLINTOCK, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. **Genetics**, v. 26, n. 2, p. 234–82, mar. 1941.

METCALFE, M. J.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E. Relationship between tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Mount Sinai journal of medicine, New York**, v. 77, n. 1, p. 50–8, jan. 2010.

MEYERSON, M.; COUNTER, C. M.; EATON, E. N.; ELLISEN, L. W.; STEINER, P.; CADDLE, S. D.; ZIAUGRA, L.; BEIJERSBERGEN, R. L.; DAVIDOFF, M. J.; LIU, Q.; BACCHETTI, S.; HABER, D. A.; WEINBERG, R. A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 785–95, 22 ago. 1997.

MONTPETIT, A. et al. Telomere length: a review of methods for measurement. **Nursing research**, v. 63, n. 4, p. 289–99, 2015.

MORRIS, G.; BERK, M. The Putative Use of Lithium in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer research**, v. 13, n. 8, p. 853–61, 2016.

MOVÉRARE-SKRTIC, S.; JOHANSSON, P.; MATTSSON, N.; HANSSON, O.; WALLIN, A.; JOHANSSON, J.-O.; ZETTERBERG, H.; BLENNOW, K.; SVENSSON, J. Leukocyte telomere length (LTL) is reduced in stable mild cognitive impairment but low LTL is not associated with conversion to Alzheimer's disease: a pilot study. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 2, p. 179–82, fev. 2012.

MURILLO-ORTIZ, B.; ALBARRÁN-TAMAYO, F.; ARENAS-ARANDA, D.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L.; MALACARA-HERNÁNDEZ, J. M.; MARTÍNEZ-GARZA, S.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SOLORIO, S.; GARAY-SEVILLA, M. E.; MORA-VILLALPANDO, C. Telomere Length and Type 2 Diabetes in Males, a Premature Aging Syndrome. **The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male**, v. 15, n. 1, p. 54–8, 4 mar. 2012.

MURRAY, C. L.; FIBIGER, H. C. Learning and memory deficits after lesions of the nucleus basalis magnocellularis: reversal by physostigmine. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1025–32, abr. 1985.

NGUYEN, N.; LEE, S. B.; LEE, Y. S.; LEE, K. H.; AHN, J. Y. Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through TRK receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 5, p. 942–951, 2009.

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

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.

Annual review of neuroscience, v. 34, p. 185–204, 2011.

O'CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biological procedures online**, v. 13, n. 1, p. 3, 2011.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; KITAZAWA, M.; TSENG, B. P.; LAFERLA, F. M. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. In: *Neurobiology of Aging*, 8, **Anais...**2003a.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J. D.; MURPHY, M. P.; GOLDE, T. E.; KAYED, R.; METHERATE, R.; MATTSO, M. P.; AKBARI, Y.; LAFERLA, F. M. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. **Neuron**, v. 39, n. 3, p. 409–421, 2003b.

OLOVNIKOV, A. M. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **Journal of Theoretical Biology**, v. 41, n. 1, p. 181–190, 14 set. 1973.

OZTURK, M.; LI, Y.; TERGAONKAR, V. Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. **Antioxidants**, v. 6, n. 1, p. 17, 2017.

PANOSSIAN, L. .; PORTER, V. .; VALENZUELA, H. .; ZHU, X.; REBACK, E.; MASTERMAN, D.; CUMMINGS, J. .; EFFROS, R. . Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 1, p. 77–84, 2003.

PHIEL, C. J.; WILSON, C. a; LEE, V. M.-Y.; KLEIN, P. S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v. 423, n. lane 2, p. 435–439, 2003.

PIEDRAHITA, D.; HERNÁNDEZ, I.; LÓPEZ-TOBÓN, A.; FEDOROV, D.; OBARA, B.; MANJUNATH, B. S.; BOUDREAU, R. L.; DAVIDSON, B.; LAFERLA, F.; GALLEGÓ-GÓMEZ, J. C.; KOSIK, K. S.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 13966–76, 2010.

PIETROPAOLO, S.; FELDON, J.; YEE, B. K. Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 733–747, ago. 2008.

POLHO, G. B.; DE-PAULA, V. J.; CARDILLO, G.; DOS SANTOS, B.; KERR, D. S. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2–3, p. 195–200, 2015.

QI, L.; STRONG, M. A.; KARIM, B. O.; HUSO, D. L.; GREIDER, C. W. Telomere fusion to chromosome breaks reduces oncogenic translocations and tumour formation. **Nature cell**

biology, v. 7, n. 7, p. 706–11, jul. 2005.

RAGNO, M.; PIANESE, L.; PINELLI, M.; SILVESTRI, S.; CACCHIÒ, G.; DI MARZIO, F.; SCARCELLA, M.; CORETTI, F.; ALTAMURA, F.; MONTICELLI, A.; CASTALDO, I. Shorter telomeres in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy and leukoencephalopathy (CADASIL). **Neurogenetics**, v. 12, n. 4, p. 337–43, nov. 2011.

ROBAKIS, N. K.; RAMAKRISHNA, N.; WOLFE, G.; WISNIEWSKI, H. M. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 12, p. 4190–4, jun. 1987.

SCHAEFFER, E. L.; CATANOZI, S.; WEST, M. J.; GATTAZ, W. F. Stereological investigation of the CA1 pyramidal cell layer in untreated and lithium-treated 3xTg-AD and wild-type mice. **Annals of Anatomy**, v. 209, p. 51–60, 2017.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741–66, abr. 2001.

SELKOE, D. J. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. **Neurochemical research**, v. 28, n. 11, p. 1705–13, nov. 2003.

SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D. Deciphering alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, 2012.

SENATOROV, V. V.; REN, M.; KANAI, H.; WEI, H.; CHUANG, D.-M. Short-term lithium treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum infused with quinolinic acid, an excitotoxic model of Huntington's disease. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 371–85, abr. 2004.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hallmarks of telomeres in ageing research. **The Journal of pathology**, v. 211, n. 2, p. 114–23, jan. 2007.

SINGH, M.; DANG, T. N.; ARSENEAULT, M.; RAMASSAMY, C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 21, n. 3, p. 741–56, jan. 2010.

SOEIRO-DE-SOUZA, M. G.; TEIXEIRA, A. L.; MATEO, E. C.; ZANETTI, M. V.; RODRIGUES, F. G.; DE PAULA, V. J.; BEZERRA, J. F.; MORENO, R. A.; GATTAZ, W. F.; MACHADO-VIEIRA, R. Leukocyte telomerase activity and antidepressant efficacy in bipolar disorder. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 7, p. 1139–43, jul. 2014.

SPIES, P. E.; VERBEEK, M. M.; VAN GROEN, T.; CLAASSEN, J. A. H. R. Reviewing reasons

for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 17, p. 2024–34, 1 jun. 2012.

ST GEORGE-HYSLOP, P. H.; HAINES, J. L.; FARRER, L. A.; POLINSKY, R.; BROECKHOVEN, C. Van; GOATE, A.; MCLACHLAN, D. R. C.; ORR, H.; BRUNI, A. C.; SORBI, S.; RAINERO, I.; FONCIN, J.-F.; POLLEN, D.; CANTU, J.-M.; TUPLER, R.; VOSKRESENSKAYA, N.; MAYEUX, R.; GROWDON, J.; FRIED, V. A.; MYERS, R. H.; NEE, L.; BACKHOVENS, H.; MARTIN, J.-J.; ROSSOR, M.; OWEN, M. J.; MULLAN, M.; PERCY, M. E.; KARLINSKY, H.; RICH, S.; HESTON, L.; MONTESI, M.; MORTILLA, M.; NACMIAS, N.; GUSELLA, J. F.; HARDY, J. A.; FAD COLLABORATIVE STUDY GROUP. Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. **Nature**, v. 347, n. 6289, p. 194–197, 13 set. 1990.

STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. Telomeres: Cancer to Human Aging. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 531–557, nov. 2006.

SU, B.; WANG, X.; NUNOMURA, A.; MOREIRA, P. I.; LEE, H.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 5, n. 6, p. 525–532, 2008.

THOMAS, P.; FENECH, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 15–33, 1 jan. 2007.

THOMAS, P.; O' CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. **Mechanisms of ageing and development**, v. 129, n. 4, p. 183–90, abr. 2008.

TRAMUTOLA, A.; LANZILLOTTA, C.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 88–96, jul. 2017.

TSOULOU, A.; PASSOS, J. F.; NELSON, G.; ARAI, Y.; ZGLINICKI, T. von. ssDNA fragments induce cell senescence by telomere uncapping. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 10, p. 892–9, out. 2008.

VAN BROECKHOVEN, C.; HAAN, J.; BAKKER, E.; HARDY, J. A.; VAN HUL, W.; WEHNERT, A.; VEGTER-VAN DER VLIS, M.; ROOS, R. A. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4959, p. 1120–2, 1 jun. 1990.

VAN STEENSEL, B.; DE LANGE, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 740–743, 20 fev. 1997.

VIEL, T. A.; BUCK, H. S. Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease

in vivo. **Current Alzheimer research**, v. 8, n. 1, p. 59–66, fev. 2011.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 7, p. 339–344, jul. 2002.

WATSON, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. **Nature: New biology**, v. 239, n. 94, p. 197–201, 18 out. 1972.

WIPPOLD, F. J.; CAIRNS, N.; VO, K.; HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C. Neuropathology for the Neuroradiologist: Plaques and Tangles. **American Journal of Neuroradiology**, v. 29, n. 1, p. 18–22, 1 jan. 2008.

WOLKOWITZ, O. M.; MELLON, S. H.; EPEL, E. S.; LIN, J.; REUS, V. I.; ROSSER, R.; BURKE, H.; COMPAGNONE, M.; NELSON, J. C.; DHABHAR, F. S.; BLACKBURN, E. H. Resting leukocyte telomerase activity is elevated in major depression and predicts treatment response. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 164–172, 18 fev. 2012.

WOLKOWITZ, O. M.; WOLF, J.; SHELLY, W.; ROSSER, R.; BURKE, H. M.; LERNER, G. K.; REUS, V. I.; NELSON, J. C.; EPEL, E. S.; MELLON, S. H. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1623–30, 15 ago. 2011.

YAN, F.-L.; ZHENG, Y.; ZHAO, F.-D. Effects of ginkgo biloba extract EGb761 on expression of RAGE and LRP-1 in cerebral microvascular endothelial cells under chronic hypoxia and hypoglycemia. **Acta neuropathologica**, v. 116, n. 5, p. 529–35, nov. 2008.

YAN, X.-B.; WANG, S.-S.; HOU, H.-L.; JI, R.; ZHOU, J.-N. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. **Behavioural brain research**, v. 177, n. 2, p. 282–9, 27 fev. 2007.

YEH, J.-K.; WANG, C.-Y. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases. **Genes**, v. 7, n. 9, p. 58, 2016.

YI, X.; TESMER, V. M.; SAVRE-TRAIN, I.; SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 6, p. 3989–97, jun. 1999.

YU, W.-Y.; CHANG, H.-W.; LIN, C.-H.; CHO, C.-L. Short telomeres in patients with chronic schizophrenia who show a poor response to treatment. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 33, n. 3, p. 244–7, maio 2008.

ZHAN, Y.; SONG, C.; KARLSSON, R.; TILLANDER, A.; REYNOLDS, C. A.; PEDERSEN, N. L.; HÄGG, S. Telomere Length Shortening and Alzheimer Disease—A Mendelian Randomization Study. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 10, p. 1202, 1 out. 2015.

ZHANG, J.; KONG, Q.; ZHANG, Z.; GE, P.; BA, D.; HE, W. Telomere dysfunction of lymphocytes in patients with Alzheimer disease. **Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology**, v. 16, n. 3, p. 170–6, set. 2003.

ZHANG, Y.; TOH, L.; LAU, P.; WANG, X. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32494–511, 21 set. 2012.

ZHOU, J.-M.; ZHU, X.-F.; LU, Y.-J.; DENG, R.; HUANG, Z.-S.; MEI, Y.-P.; WANG, Y.; HUANG, W.-L.; LIU, Z.-C.; GU, L.-Q.; ZENG, Y.-X. Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. **Oncogene**, v. 25, n. 4, p. 503–11, 26 jan. 2006.

ANEXOS

Artigos publicados durante o mestrado.

POLHO, G. B.; DE-PAULA, V. J.; **CARDILLO, G.**; DOS SANTOS, B.; KERR, D. S. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. **Schizophrenia Research**, v. 165, n. 2–3, p. 195–200, 2015.

Trabalhos apresentados em conferências.

POLHO, G.B.; **CARDILLO, G.M.**; KERR, D.S.; GATTAZ W.F.; FORLENZA O.V.; BRENTANI, H.; PAULA V.J.R. Influence of antipsychotics on leukocyte telomere length. 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), 2017

CARDILLO, G.M.; DE-PAULA, V.J.; IKENAGA, E.H.; COSTA, L.R.; CATANOZI, S.; SCHAEFFER, E.L.; GATTAZ, W.F.; FORLENZA, O.V.; KERR, D.S. Effect of chronic lithium treatment on telomeric length in triple-transgenic Alzheimer's disease mice. *Alzheimer's & Dementia*, v. 12, p. P641, 2016.

YAMAMOTO, V.J.; DE-PAULA, V.J.; **CARDILLO, G.M.**; FORLENZA, O.V.; GATTAZ, W.F.; KERR, D.S. Lithium treatment prevents amyloid toxicity and mir-489 down-regulation in an Alzheimer's disease in vitro model. *Alzheimer's & Dementia*, v. 12, p. P451, 2016.

Artigos aceitos para publicação durante o mestrado.

Chronic lithium treatment increases telomere length in parietal cortex and hippocampus of triple-transgenic Alzheimer's disease mice

Giancarlo de Mattos Cardillo^{1*}, Vanessa de Jesus de Paula^{1,3}, Eliza Hiromi Ikenaga¹, Luciana Rodrigues Costa¹, Sergio Catanozi², Evelin Lisete Schaeffer¹, Wagner Farid Gattaz¹, Daniel Shikanai Kerr^{1,4}, Orestes Vicente Forlenza¹

¹Laboratory of Neuroscience (LIM-27), Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos 785, 05403-010 Sao Paulo, SP, Brazil; ²Lipids Laboratory (LIM-10), Endocrinology and Metabolism Division of Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, 01246-000 Sao Paulo, SP, Brazil; ³Laboratory of Psysbio (LIM-23), Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos 785, 05403-010 Sao Paulo, SP, Brazil; ⁴Instituto Federal de Educacao, Ciencia e Tecnologia Catarinense-Campus Camboriu, Rua Joaquim Garcia S/N, 88340-055 Camboriu, SC, Brazil.

Running title: Chronic lithium treatment was associated with increased telomere length in hippocampus and parietal cortex of triple-transgenic Alzheimer's disease mice. The regulatory effect of lithium on telomere length was restricted to transgenic mice, suggesting that the presence of AD pathology is required for this outcome.

*Corresponding author:

Orestes V. Forlenza, Laboratory of Neuroscience (LIM-27), Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Rua Dr. Ovídio Pires de Campos 785, 05403-010 São Paulo, SP, Brazil. Electronic address: forlenza@usp.br

Abstract:

Telomere length (TL) is a biomarker of cell aging, and its shortening has been linked to several age-related diseases. In Alzheimer's disease (AD), telomere shortening has been associated with neuroinflammation and oxidative stress. The majority of studies on TL in AD were based on leucocyte DNA, with little information about its status in the central nervous system. In addition to other neuroprotective effects, lithium has been implicated in the maintenance of TL. The present study aims to determine the effect of chronic lithium treatment on TL in different regions of the mouse brain, using a triple-transgenic mouse model (3xTg-AD). Eighteen transgenic and 22 wild-type (Wt) male mice were treated for eight months with chow containing 1.0g (Li1) or 2.0g (Li2) of lithium carbonate/kg, or standard chow (Li0). DNA was extracted from parietal cortex, hippocampus and olfactory epithelium and TL was quantified by real-time PCR. Chronic lithium treatment was associated with longer telomeres in the hippocampus (Li2, $p=0.0159$) and in the parietal cortex (Li1, $p=0.0375$) of 3xTg-AD compared to Wt. Our findings suggest that chronic lithium treatment does affect telomere maintenance, but the magnitude and nature of this effect depend on the working concentrations of lithium and characteristics of the tissue. This effect was observed when comparing 3xTg-AD with Wt mice,

suggesting that the presence of AD pathology was required for the lithium modulation of TL.

Key Words: Telomere; Alzheimer's disease; transgenic mice; lithium; hippocampus; parietal cortex; olfactory epithelium.