

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

HELENA NASCIMENTO MALERBA

**Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com lítio em ambiente enriquecido**

São Paulo  
2020

HELENA NASCIMENTO MALERBA

**Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com lítio em ambiente enriquecido**

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

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel.

Versão corrigida

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Helena Nascimento Malerba

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com lítio em ambiente enriquecido

Orientador: Profª Drª Tânia Araújo Viel

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

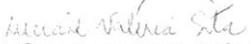


Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **949/2018** referente ao projeto intitulado: "**Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com lítio em ambiente enriquecido**" sob a responsabilidade de **Helena Nascimento Malerba** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Tânia Araújo Viel**, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012. Salientamos que as pesquisadoras utilizarão tecido animal JÁ COLETADO proveniente do projeto "Estudo translacional de estratégias e biomarcadores para a promoção da longevidade saudável" aprovado pela CEUA-ISCMSP e FCMSCSP em 08/12/2016, sob número 012/16.

São Paulo, 18 de abril de 2018.

  
Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

  
Prof. Dra. **Camila Squarzon Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nascimento Malerba, Helena  
Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com  
lítio em ambiente / Helena  
Nascimento Malerba; orientadora Tânia Araújo Viel . -  
- São Paulo, 2020.  
79 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neuroproteção . 2. Lítio . 3. Ambiente enriquecido. 4.  
Memória. I. Araújo Viel , Tânia, orientador. II. Título.

## RESUMO

MALERBA, H. N. Avaliação molecular da neuroplasticidade de animais tratados com lítio em ambiente enriquecido. 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Com o aumento da longevidade populacional a aplicação de conhecimentos gerontológicos torna-se uma ferramenta de grande valor para promover um envelhecimento saudável. A proximidade da velhice acarreta aumento de doenças crônicas que muitas vezes podem ser debilitantes. Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa vem estudando os benefícios do enriquecimento ambiental e administração de microdoses dos íons de lítio para a melhora da memória de animais e seres humanos, o que pode levar à longevidade com saúde. Portanto o objetivo do projeto foi verificar a efetividade do tratamento com microdoses de lítio, por via oral, em camundonos pertencentes à linhagem que apresenta envelhecimento acelerado (SAMP-8, "*senescece-accelerated mouse*") combinada ou não com o enriquecimento ambiental, para a promoção do envelhecimento saudável. Os animais SAMR-1 ("*senescence-accelerated mouse resistant*") foram utilizados como controles dos animais SAMP-8. Os camundongos SAMP-8 foram divididos em quatro grupos: 1) Grupo Controle: sem tratamento e sem estimulação; 2) Grupo Lítio (Li): tratados com 0,25 mg/kg de carbonato de lítio, dissolvidos na água de beber; 3) Grupo Ambiente Enriquecido (AE): colocados diariamente em ambiente enriquecido, constituído por diferentes objetos; 4) Grupo Li+AE: tratados com lítio e colocados em ambiente enriquecido. Ao atingirem 10 meses de idade foi possível observar que os animais SAMP-8 controle tiveram uma diminuição da memória quando comparados aos animais SAMR-1. Além disso, apresentaram menos densidade neuronal, maior área de neurodegeneração, maior densidade de placas senis e diminuição da densidade de sinaptofisina em relação aos animais SAMR-1. Os tratamentos por si só promoveram resultados semelhantes. É possível sugerir que as estratégias propostas, combinadas ou não, são benéficas para animais com envelhecimento acelerado, contribuindo assim para a manutenção da memória na velhice.

**Palavras-chave:** Neuroproteção. Lítio. Ambiente Enriquecido. Memória.

## ABSTRACT

MALERBA, H. N. Molecular evaluation of neuroprotection after treatment of mice with lithium and submission to enriched environment. Master thesis (Pharmacology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

With the increase in population longevity, the gerontological approach to promote healthier aging is also rising. The proximity of elderly causes an increase in the prevalence of diseases, especially chronic diseases that can be debilitating. Over the last few years, our research team have been studied the benefits of enriched environment and lithium in microdoses to improve memory of mice and humans, which can lead to healthy aging. The aim of this project was to verify the benefits of with treatment with lithium in microdose combined or not with enriched environment for the healthy aging of senescence accelerated mice (SAMP-8). Male SAMP-8 mice (2 months old) were divided into four groups: 1) Control group: without treatment and without stimulation; 2) Lithium group: treated with 0.25mg/kg of lithium carbonate, dissolved in the drinking water; 3) Enriched Environment group (EE): animals submitted to enriched environment (toys in the cage); 4) Lithium + EE group: treated with lithium and submitted to EE. SAMR-1 ("senescence-accelerated mouse resistant") was used as control of SAMP-8. Memory was evaluated along the aging process of animals and when they were 10 months old they were anesthetized and killed and the brains were isolated and frozen. SAMP-8 presented lower amount of neuronal density, higher neurodegeneration area, higher density of amyloid- $\beta$  plaques and higher density of synaptophysin when compared to SAMR-1 hippocampal samples. The SAMP-8 group that was in enriched environment and was treated with lithium presented memory and neuronal maintenance, decreased density of beta-amyloid plaques, increased density of synaptophysin and decrease in hippocampal degeneration. The treatments alone promoted similar results. It is possible to suggest that the proposed strategies combined or not, are benefic for animals with an accelerated aging, thus contributing to memory maintenance in old age.

**Keywords:** Neuroprotection. Lithium. Enriched Environment. Memory.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir desenvolver esse projeto.

Ao programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas por me permitir desenvolver meu projeto.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e me ensinarem a ir atrás daquilo que sempre quis.

À minha avó Leonor por ser sempre meu porto seguro.

À minha orientadora Tânia por confiar em mim, pelos ensinamentos, pelas chamadas de atenção e por ser uma inspiração de profissional e pessoal, espero um dia poder ser parte do que você foi e é em minha vida. Ao meu co-orientador, não formal, Hudson por sempre ter a solução de problemas inesperados.

Aos funcionários do biotério por me fazerem companhia na maioria dos dias e por se preocuparem tanto comigo e com meus camundongos.

Aos amigos que fiz do Grupo de Pesquisa em Neurofarmacologia do Envelhecimento durante esse período no laboratório, que foram um conforto nas horas de angústia e felicidade nos momentos em que as coisas davam certo.

Aos meus melhores amigos pela paciência, pela motivação e por nunca me deixarem pensar que não sou capaz, vocês são muitos especiais para mim.

Ao meu namorado pela paciência e ser meu companheiro nos momentos bons e ruins.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas por me permitir realizar a pós graduação.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro de uma bolsa proveniente de Cota Institucional (processo nº 168118/2018-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem demonstrativa da via-tri sináptica.....	5
<b>Figura 2.</b> Gráfico representativo do desenvolvimento genealógico da linhagem SAM a partir de dezembro de 2005.....	11
<b>Figura 3.</b> Labirinto de Barnes desenvolvido para avaliação da memória espacial de camundongos. A caixa de escape fica sob um dos buracos.....	14
<b>Figura 4.</b> Labirinto em cruz elevado. Equipamento utilizado para medir o nível de ansiedade de roedores.....	15
<b>Figura 5.</b> Marcação de NeuN na região do GD.....	24
<b>Figura 6.</b> Marcação de NeuN na região do Ca1.....	25
<b>Figura 7.</b> Marcação de NeuN na região do Ca3.....	26
<b>Figura 8.</b> Marcação da neurodegeneração na região do GD.....	29
<b>Figura 9.</b> Marcação da neurodegeneração na região do Ca1.....	30
<b>Figura 10.</b> Marcação da neurodegeneração na região do Ca3.....	31
<b>Figura 11.</b> Marcação da placas senis no hipocampo.....	33

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Tempo que os animais permaneceram explorando o quadrante da caixa de escape.....	20
<b>Gráfico 2.</b> Tempo que os animais entraram e permaneceram nos braços abertos do LCE.....	21
<b>Gráfico 3.</b> Porcentagem de NeuN por área proporcional na região do giro denteado (A e B), Ca1 (C e D) e Ca3 (E e F).....	23
<b>Gráfico 4.</b> Porcentagem de marcação com Fluoro Jade C por área proporcional na região do GD (A, B), Ca1 (C, D) e Ca3 (E, F) do hipocampo.....	28
<b>Gráfico 5.</b> Densidade de placas senis no hipocampo.....	32
<b>Gráfico 6.</b> Densidade de receptores NMDA-2B no hipocampo.....	34
<b>Gráfico 7.</b> Densidade de receptores AMPA (Glu2/3/4).....	35
<b>Gráfico 8.</b> Densidade da proteína CAMK IV.....	36
<b>Gráfico 9.</b> Comparação da densidade de terminais sinápticos em hipocampo.....	37
<b>Gráfico 10.</b> Comparação da densidade de BDNF no hipocampo.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AE- Ambiente enriquecido.

AMPA- Receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico.

BDNF- "Brain-derived neurotrophic fator" .

Ca1- Camada CA 1 ("*cornu ammon 1*").

Ca2- Camada CA 2 ("*cornu ammon 2*").

Ca3- Camada CA 3 ("*cornu ammon 3*").

CAMK IV- Proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$ - calmodulina IV.

CE- Cortéx entorrenal.

CREB- Elemento de resposta ao cAMP.

DA- Doença de Alzheimer.

GD- Giro Denteado.

GSK-3- Glicogênio sintase quinase.

Li- Microdose de carbonato de lítio.

Li+AE- Carbonato de lítio combinado com enriquecimento ambiental.

LCE- Labirinto em cruz elevado.

LTP- Potencial de longa duração.

NMDA- Receptor *N*-metil-D-aspartato.

SAMP- 8 - "*Senescence-accelerated mouse prone*".

SAMR-1- "*Senescence-Accelerated Mouse Resistant*".

$\beta$ A- Proteína beta amilóide.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Envelhecimento Populacional.....	1
1.2 Formação da resiliência cerebral e LTP.....	3
1.3 Via-tri sináptica.....	5
1.4 Ambiente Enriquecido e Lítio.....	8
<b>2. Hipótese.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Objetivo.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>10</b>
4.1 Animais.....	10
4.2 Grupos Experimentais.....	12
4.3 Tratamento com carbonato de lítio.....	12
4.4 Estimulação cognitiva em ambiente enriquecido.....	13
4.5 Avaliação da memória espacial.....	13
4.6 Avaliação do comportamento de ansiedade.....	14
4.7 Ensaio de imunofluorescência .....	15
4.7.1 Análise da densidade de neurônios hipocampais.....	15
4.7.2 Análise de placas senis.....	16
4.7.3 Detecção de células em processo de degeneração.....	17
4.8 Western-blotting para proteínas relacionadas à LTP e ao terminal sináptico.....	18
4.9 Análise da concentração de BDNF.....	18
<b>5. Análise Estatística.....</b>	<b>19</b>
<b>6. Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Considerações Finais.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>47</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Envelhecimento

O aumento da longevidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, é devido a fatores como o avanço da medicina, a melhoria da assistência à saúde, a ampliação do suporte social à pessoa idosa e a diminuição na taxa de natalidade. De acordo com o censo realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população com idade menor ou igual a 20 anos já apresenta uma diminuição sensível e perceptível em relação a outras faixas etárias. A diminuição dessa população se deu pelo aumento de indivíduos adultos, tendo como destaque o aumento do número de idosos. Devido a essa mudança na distribuição etária, vê-se necessário o aprimoramento de estudos gerontológicos, pois o envelhecimento ocorre de forma única e distinta entre os indivíduos. O conhecimento ampliado sobre o fenômeno do envelhecimento leva a uma melhora da qualidade de vida tanto dos idosos atuais como dos futuros. Nesse sentido, o conceito de qualidade de vida, Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), é a percepção do indivíduo de sua inserção na vida, no contexto da cultura e sistemas de valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações. Abrange uma área multidisciplinar que engloba, além de diversas formas de ciência e conhecimento popular, conceitos que permeiam a vida das pessoas como um todo (ALMEIDA et al., 2012).

Nesse contexto, a saúde é um fator fundamental para o envelhecimento bem sucedido que possui como uma das definições a ausência de doenças crônicas, alta capacidade funcional, ausência de incapacidade e longevidade (TEIXERA et al., 2020). Para se entender a saúde no idoso é necessário, primeiramente, entender a diferença entre senescência e senilidade (SCHROOTS e BIRREN, 1990). Mesmo ambos ocorrendo de forma heterogênea, a **senescência**, também conhecida como envelhecimento primário, trata-se do processo que acomete a todos progressivamente, afetando o indivíduo de forma gradual e acumulativa, sempre sob influência do estilo de vida de cada um. Esse processo não se constitui em doença, mas há a presença de diversos indicadores demonstrativos do padrão de envelhecimento tardio como cabelos brancos, rugas, flacidez muscular e surgimento de déficits sensoriais leves. Por outro lado, a

**senilidade**, também denominada de envelhecimento secundário ou patológico, está relacionada a alterações ocasionadas durante o envelhecimento que podem levar ao surgimento de doenças debilitantes, como problemas cardiovasculares, demência senil e doenças neurológicas. Essas alterações possuem um grande aumento de incidência com o aumento da idade mediante influência de mecanismos genéticos, fatores ambientais, estilo de vida e personalidade (NERI, 2005).

Vários estudos vêm demonstrando que a alteração no estilo de vida pode determinar a presença ou não de doenças ao longo da vida, determinando o padrão de senescência ou senilidade aos indivíduos. Devido ao aumento da longevidade, entretanto, ainda se pode perceber um aumento do número de doenças crônicas não transmissíveis. De acordo com as Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas (2013), as doenças na velhice, além de serem relacionadas a causas múltiplas, são graduais e podem durar por período indefinido, podendo levar o indivíduo a ter incapacidades. Nesses casos, o paciente necessita de cuidado contínuo, com o uso de tecnologias e de mudanças de estilo de vida. Mesmo assim, e dependendo do caso, nem sempre pode haver cura.

Dentre as doenças crônicas mais comuns entre pessoas com mais de 60 anos, podemos citar a Doença de Alzheimer (DA). De acordo com o Relatório da Organização Mundial de Saúde realizado juntamente com a Associação Internacional da Doença de Alzheimer de 2012, estima-se que em 2050 cerca de 115,4 milhões de pessoas terão desenvolvido DA, tornando essa doença uma das principais causas de demência no mundo.

A DA é uma doença que atinge igualmente etnias e classes sociais, sendo mais prevalente em mulheres do que em homens. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-V; 2013) a DA é um transtorno neurocognitivo classificado como maior, na qual ocorre uma deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas (memória, atenção, percepção, linguagem e funções executivas) influenciando assim na independência do indivíduo e comprometendo as atividades de vida diária. Por acometer um grande número de pessoas, podemos dizer que a DA possui grande influência econômica e social. Há registros que o gasto total

mundial na sociedade foi estimado em, aproximadamente, U\$ 422 milhões, em 2009, incluindo U\$ 142 milhões para cuidados informais (4%) com pessoas com DA (WIMO et al., 2010). Dessa forma, essa doença vem se tornando cada vez mais um importante problema de saúde pública em todo o mundo devido aos seus aspectos clínicos e pelos custos diretos e indiretos associados à perda ocupacional, ao tratamento e à reabilitação dos indivíduos (LIMA, 2008). O principal sintoma dessa doença consiste na perda de memórias pela degeneração de neurônios e mecanismos celulares relacionados à sua formação, manutenção e recuperação.

## **1.2 Formação da resiliência cerebral e LTP**

A memória é fundamental para a vida, pois é responsável por nos conectar com momentos e situações tanto especiais como tristes, nos transformando no que somos como indivíduo. Através dela guardamos ensinamentos que são únicos, pois as experiências se formam a depender de fatores individuais influenciados pela resiliência, crenças, cultura, convívio social, etc.

A literatura vem mostrando que a manutenção da função cognitiva, durante a velhice, depende da formação de reservas cognitivas e estruturais (VALENZUELA et al., 2008; PETROSINI et al., 2009, BALTHAZAR et al., 2018), o que serviria para a construção de uma resiliência cognitiva, que pode ser entendida como uma forma de resistência a possíveis danos. Essas reservas são construídas a partir da alimentação saudável e de estimulações durante práticas de atividade física, social, motora, sensorial e cognitiva e podem ser o ponto-chave que separa a manutenção da memória durante o envelhecimento saudável e os estados iniciais de demência.

A hipótese da reserva cognitiva foi construída a partir da observação de que indivíduos que apresentavam evidências neuropatológicas tinham função cognitiva aparentemente normal. De acordo com essa hipótese, a estimulação cognitiva (educacional, social, ambiental) desde a infância levaria à formação de uma reserva cognitiva e cerebral. Na presença de insultos ao longo do envelhecimento, como desenvolvimento de neurodegeneração, a função cerebral desses indivíduos seria mantida devido a reservas estruturais (ou seja, densidade neuronal e

conectividade sináptica) ou funcionais (eficácia dos circuitos neuronais) (revisado por MILGRAM et al., 2006; PETRESONI et al., 2009).

Essa hipótese se baseia no fato de que a neuroplasticidade ligada à experiência cognitiva constrói as reservas necessárias para manutenção das funções cerebrais, impedindo que o indivíduo chegue ao esquecimento e perda de outras habilidades cognitivas (VALENZUELA, 2008). Dessa forma, seria possível desenvolver fatores que aumentassem a resiliência cerebral. Esse é um termo utilizado em vários campos do conhecimento, mas na área das neurociências significa aumentar as capacidades funcionais e estruturais do cérebro que permitam que o mesmo se recupere ou se torne resistente a danos por estresse, choques ou distúrbios neuropatológicos (PETROSINI et al., 2009).

Até onde se sabe, a formação da memória envolve um processo biológico de modificação das conexões neurais que levam ao aumento da arborização dendrítica e maior interação entre neurônios, o que determina a consolidação de uma informação. Esse fenômeno biológico é conhecido como potenciação de longa duração (LTP, do inglês “long-term potentiation”) e é o mecanismo mais aceito para se explicar a formação das memórias de longa duração (COOKE e BLISS, 2006). A LTP ocorre devido à ativação sináptica de receptores NMDA (*N*-metil-D-aspartato) e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993). Esses receptores serão ativados após a liberação do neurotransmissor glutamato liberado do terminal pré-sináptico que, ao se ligar aos receptores AMPA, permite a troca de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , gerando um potencial de ação na membrana local. Esse potencial de ação atinge receptores NMDA próximos que, juntamente com a ativação por glutamato, libera o canal iônico associado (bloqueado por um íon magnésio), o que permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à ativação de diversas quinases (NICOLL et al., 1988; NICOLL, 2017). Em neurônios há a ativação da proteína quinase dependente de

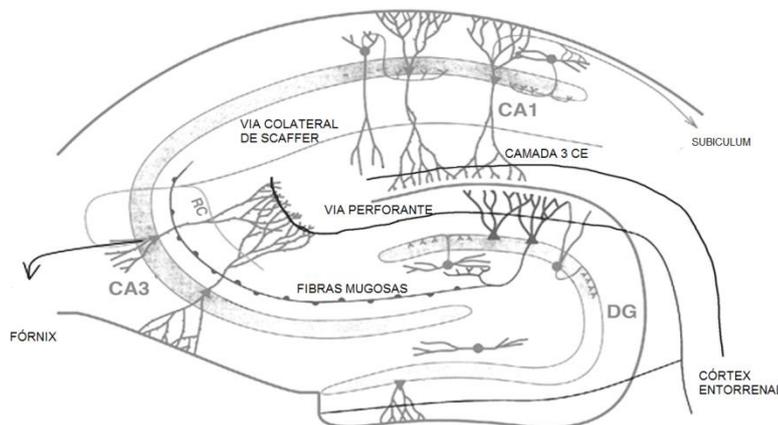
$\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina IV que irá promover a ativação de fatores de transcrição de proteínas, como o elemento de resposta ao cAMP (CREB) (FINKBEINER, 2000; MAYR e MONTMINY, 2001; KOKUBO et.al, 2009). A ativação (fosforilação) de CREB levará ao aumento da produção de neurotrofinas, como por exemplo o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), demonstrando ser fundamental

para a consolidação do LTP (FINKBEINER, 2000; MAYR e MONTMINY, 2001; KOKUBO et.al, 2009).

### 1.3 Via tri-sináptica

O hipocampo é uma das principais regiões no cérebro envolvidas com formação, manutenção e recuperação de memórias (OLTON et al., 1978; ENDEL e MARKOWITSCH, 1998; BURGUESS et al., 2002). Ele é composto por quatro subdivisões: a) áreas corticais retro-hipocampais, principalmente o córtex entorrinal, b) giro denteado (GD), c) corno de Amon (Ca), sendo esse dividido em quatro áreas Ca1, Ca2, Ca3 e Ca4, e d) subiculum (EICHENBAUM et al., 1992; BEAR et al., 2002). Ao chegarem ao hipocampo, as informações são processadas e analisadas pela via tri-sináptica (ANDERSEN, 1975) como demonstrado na Figura 1. As informações transmitidas pelo neocórtex, regiões subcorticiais e por áreas sensoriais primárias do córtex entorrinal (CE) são enviadas pela via perforante para o GD e Ca3, e para o Ca1 pela camada 3 do córtex entorrinal (STEWART et al., 1976; DOUGLAS et al., 1975; EMPSON et.al, 1995).

**Figura 1.** Imagem demonstrativa da via-tri sináptica.



Fonte: Daumas et al., 2009.

Pela via perforante as sinapses são transmitidas para as células granulares do GD e são processadas e integradas, para que seja possível realizar a diferenciação de localização espacial, assim como os contextos, que serão separados para que auxiliem no reconhecimento de objetos (KESNER, 2013). Dada a complexidade das vias descritas, fica evidente a importância da preservação da região para o processamento mnemônico de informações. As

células granulares da região do GD são projetadas em células musgosas para estabelecer contato sináptico com dendritos das células piramidais do CA3 (AMARAL et al., 1981). As células musgosas são células granulares com grandes terminais axonais, complexos e repletos de vesículas sinápticas dando a aparência aos axônios de estarem coberto com musgos. São imunorreativas ao glutamato (RAMON e CAJAL, 1911; BLACKSTAD e KJAERHEIM, 1961; LAATSCH e COWAN, 1966; FROTSCHER e SORIANO, 1994) e para enviam as informações do GD para o Ca3 essas células inervam dendritos apicais proximais das células piramidais do Ca3 que são denominadas de “espinhos complexos” (SCHARFMAN e MYERS, 2013). Dessa forma possuem grande influência na plasticidade e na codificação da memória (SCHWARTZKROIN e BUCKMASTER, 1994).

As células musgosas ativam as células piramidais da região do Ca3, responsáveis pelo armazenamento de memórias auto associativas, ou seja, diferentes componentes da mesma memória que seriam armazenados e recordados por meio de associações (HERTZ et. al, 1991; ROLLSs e TREVES, 1997; LISMAN, 1999). Além das células musgosas, o Ca3 também recebem projeções da via perforante, responsável por gerar sequências de memórias relacionadas ao seu respectivo contexto (LISMAN, 1999). Por essa via foi observado que as células piramidais do Ca3 influenciam na estimulação das células granulares do GD provocando assim uma “retroprojeção”, ou seja, capacidade das células piramidais do Ca3 de inibir ou excitar as células denteadas através dos receptores GABAérgicos (DINGLELINE e KNEISLER, 1995; SCHARFMAN, 1991; SCHARFMAN, 2007). O bloqueio ou alterações desta via prejudicam a formação de novas memórias (dependentes do hipocampo), mas não prejudicam a retenção de memórias armazenadas anteriormente. Em estudo realizado por Bennett e colaboradores (2018) foi demonstrado que idosos, sem diagnósticos de doenças neurológicas, possuíam diminuição do volume na região do GD e do Ca3 e déficit no processo de memorização.

A formação e projeção da memória podem ser danificadas caso ocorra o bloqueio de sinapses vindas da via perforante e das fibras musgosas (ROLLS, 1996). O Ca3 envia projeções pela via colateral de Schaffer, sendo essa formada por neurônios originários do próprio Ca3 (JONES, 1993) que enviam projeções

excitatórias glutamatérgicas para os dendritos das células piramidais da região do Ca1, devido à grande densidade de receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) pós-sinápticos em sua extensão (SMITH et al., 2003). As projeções sinápticas, ao serem enviadas para as células piramidais do Ca1, são preservadas para serem utilizadas posteriormente quando houver auto associação entre Ca3 e Ca1. Essa correlação de evocação de memória entre o Ca1 e o Ca3 é ativada no momento da recuperação da memória. Além de receber projeções da via colateral de Schaffer, as células piramidais do Ca1 também recebem cerca de  $\frac{1}{6}$  de projeções celulares originárias da 3ª camada do córtex, pertencentes à via perforante do córtex entorrinal, permitindo assim conexões sinápticas em camadas mais profundas do córtex como a 4 e 5, originando as conexões pela via perforante ao GD e Ca3. Com isso, podemos considerar que essas células não possuem somente a função de recuperar as informações através do Ca3, mas possuem seu próprio mecanismo de recuperação de memórias (ROLLS, 1996; JONES, 1993).

A importância do Ca1 na evocação de memórias foi demonstrada como fundamental em pacientes que possuíam amnésia global transitória, pois a lesão nessa região foi relacionada como uma possível causa do déficit de memória autobiográfica (BARTSCH et al., 2011). Após a evocação das memórias o Ca1 envia projeções para o subiculum, região formada por células piramidais que são inibidoras GABAérgicas (TEMAMAKI, 1991; STAFSTROM, 2005). O subiculum faz parte do sistema límbico e é responsável pela evocação da memória e codificação espacial (THÉRÈSE e WITTER, 1991; SHARP et al., 1995; NABER, 2000). Após essa codificação, as informações são enviadas novamente para o córtex entorrinal (JONES, 1993).

Como colocado, a formação, consolidação e recuperação das memórias declarativas dependem da complexa interação hipocampo-cortical. Da mesma forma, a perda das memórias se dá pela ruptura de qualquer desses processos, que pode ocorrer durante o envelhecimento natural ou em doenças neurodegenerativas progressivas. A formação da reserva estrutural e da reserva cognitiva pela alteração de hábitos cotidianos pode ser uma importante estratégia para a manutenção das funções cognitivas ao longo do processo de envelhecimento, permitindo manutenção da qualidade bio-psico-social na velhice.

#### 1.4 Ambiente Enriquecido e Lítio

Diversas estratégias, tanto farmacológicas como não farmacológicas, vêm sendo estudadas para promover um envelhecimento bem sucedido. Dentre as alternativas não farmacológicas, podemos citar o ambiente enriquecido (AE). Em trabalho anterior do nosso grupo, a manutenção em ambiente enriquecido diminuiu a formação de placas de beta-amiloide em animais transgênicos para a doença de Alzheimer (BALTHAZAR et al., 2018). Também foi observado que mesmo reduzindo a densidade de placas senis, em casos onde houve o aumento dessas placas ao longo do tempo, foi observado que o enriquecimento ambiental promoveu preservação funcional da memória de animais transgênicos para DA (JANKOWSKY et al., 2005). Também foi observado aumento de neurogênese e redução de declínio cognitivo de cães quando submetidos ao enriquecimento ambiental (MILGRAN et al., 2006). Em outro trabalho do grupo, foi visto que animais estimulados ao longo do envelhecimento tiveram uma melhora da memória espacial, aumento da neurotrofina BDNF e melhora na ativação do sistema colinérgico (BARALDI et al., 2013), sugerindo que a melhora do desempenho cognitivo e da neurogênese está relacionada ao fato de se levar uma vida ativa (GARTHE et al., 2016). Em seres humanos, foi verificado que aqueles que possuem uma maior atividade em ambientes urbanos complexos, apresentam um maior volume do hipocampo (CLEMENSEN et al., 2015). Com esses dados vê-se a importância da associação de terapias farmacológicas com a alteração do estilo de vida de cada indivíduo.

Outra estratégia que vem sendo vista como promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas é o uso de sais de lítio. O lítio é um íon monovalente utilizado há muitos anos para o tratamento do transtorno bipolar (QUIROZ et al., 2004). Em estudo realizado com idosos bipolares, tratados com lítio, foi visto que eles apresentaram menor índice de demência quando comparados a idosos tratados com fármaco estabilizador de humor (NUNES et al., 2007). Dessa forma, surgiu a hipótese de que o lítio seria um possível tratamento para a Doença de Alzheimer, visto que ele atua de forma neuroprotetora inibindo, entre outros mecanismos, a ativação da glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). A GSK-3 possui 2 isoformas: GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ . A isoforma GSK-3 $\alpha$  está relacionada com a regulação do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A) (PHIEL et al., 2003).

Para ativação da GSK-3 é necessário a fosforilação da serina 21 para a forma  $\alpha$  e da serina 9 para a forma  $\beta$ . O lítio age inibindo a ativação do GSK-3, inibindo a fosforilação das serinas (CHALECKA et al., 1999), impedindo a formação de oligômeros tóxicos de  $\beta$ A. Além da inibição da GSK-3, o lítio promove aumento da expressão de genes anti apoptóticos, como o da proteína-2 do linfoma de células B citoprotetoras (Bcl-2). Aumentando Bcl-2, foi verificado que camundongos submetidos a situações estressantes e tratados com sais de lítio, apresentaram aumento de neurogênese (O'LEARY et al., 2012). Outras alterações provocadas pelo lítio também auxiliam na promoção de seu efeito neuroprotetor como a inibição do estresse oxidativo celular, aumento de BDNF, espessamento cortical, aumento da densidade da substância cinzenta, aumento do hipocampo e aumento da neurogênese, mesmo o indivíduo sendo exposto a situação estressante (FORLENZA et al., 2012; CHEN et al., 2000) Além de alterações moleculares também foi visto que o Li promoveu melhora da memória e diminuição do comportamento ansioso de animais transgênicos para DA (NUNES et al., 2015)..

## **2. Hipótese**

No dia-a-dia promove-se a utilização de diversas estratégias para o benefício da saúde, como boa alimentação e prática de atividades físicas, intelectuais e de lazer. Uma vez que tanto o lítio em microdose quanto o enriquecimento ambiental causam benefícios cognitivos e neuroproteção, a hipótese desse trabalho é que a combinação dessas duas estratégias constitua um benefício ainda maior para o envelhecimento saudável do que os tratamentos propostos individualmente.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar possíveis alterações celulares no hipocampo de animais com envelhecimento acelerado após o tratamento com baixas doses de lítio e a manutenção em ambiente enriquecido propostos individualmente e de forma combinada.

### **3.2 Objetivos específicos:**

3.2.1. Avaliar a manutenção da memória dos animais submetidos aos tratamentos;

3.2.2. Avaliar a ansiedade dos animais tratados;

3.2.3. Verificar alterações na densidade de neurônios do tecido hipocampal;

3.2.4. Verificar alterações na densidade de placas senis e o nível de proteção do tecido hipocampal contra neurodegeneração;

3.2.5. Avaliar a influência dos tratamentos para a densidade da neurotrofina BDNF no hipocampo dos diferentes grupos, como um indicativo da manutenção da reserva cognitiva e neuroproteção;

3.2.6. Avaliar a influência dos tratamentos para a densidade de proteínas que participam da LTP e terminais sinápticos;

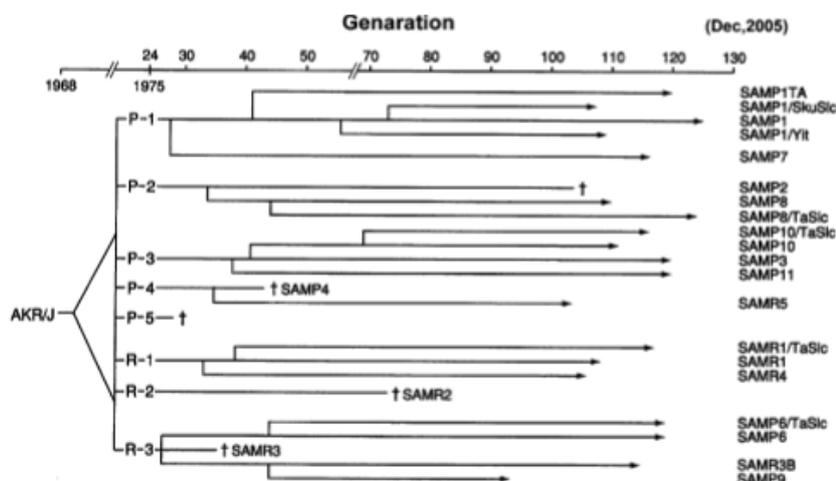
## **4. Material e métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem SAMP-8 que apresentam envelhecimento acelerado. Esses animais são derivados de camundongos AKR/J. Quando colocados para cruzamento entre irmãos, os filhotes apresentaram algumas características diferentes das matrizes como: perda de atividade motora, alopecia e falta de brilho nos pelos, lesões peri-oftálmicas, aumento da cifose e morte precoce. Os animais com essas características foram selecionados e classificados como tendo propensão ao envelhecimento acelerado, sendo denominados como série P. Outros animais que apresentaram envelhecimento normal, foram selecionados como matrizes de uma linhagem mais resistente, que seria denominada série R. Dos camundongos da série P foi realizada a divisão de 5 séries denominadas P-1, P-2, P-3, P-4 e P-5. Da série R foram obtidas 3 séries diferentes denominadas R-1, R-2 e R-3. Com o passar do tempo foi visto que a série P-2 e P-5 não era favorável para experimentos, porém foi visto que através delas surgiram novas linhagens como os P-8 provenientes do P-2 e P-10 provenientes do P-3 (Takeda et.al, 1981; Takeda et.al, 1994). Dessa forma, os camundongos com envelhecimento acelerado foram denominados SAMP ("senescence-accelerated mouse prone") e os resistentes foram denominados

SAMR ("senescence-accelerated mouse resistant") (Takeda et.al, 1994) como demonstrado na Figura 2.

**Figura 2.** Gráfico representativo do desenvolvimento genealógico da linhagem SAM a partir de dezembro de 2005.



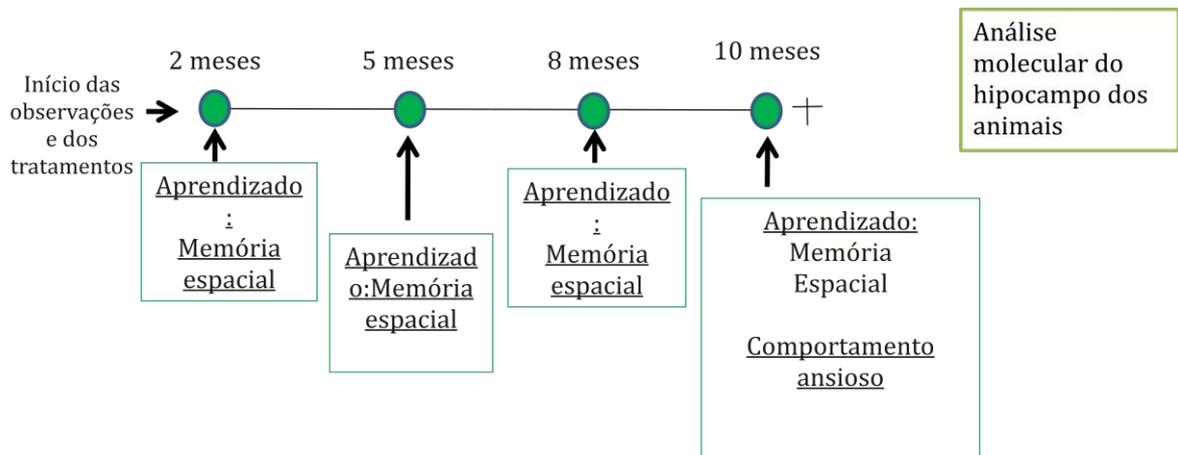
Fonte:Toshio Takeda, 2009.

Analisando as características de cada linhagem, para o presente estudo foram escolhidos os animais SAMP-8 que, além de apresentarem envelhecimento acelerado, possuem expectativa de vida de cerca de 10 meses, déficit de memória e aprendizagem, depósito precoce de placas  $\beta$ A no hipocampo, disfunção da barreira hematoencefálica, atrofia cortical, perda neuronal, entre outros. Assim, esse é um modelo promissor para o estudo de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Durante o período de vida, os animais exibem declínios de aprendizagem e memória, distúrbios emocionais, ritmos circadianos anormais e atrofia cerebral (TAKEDA, 1999). Como grupo controle dos animais SAMP-8 sem tratamento, foram utilizados camundongos machos da linhagem SAMR-1 que, ao contrário dos SAMP-8, possuem envelhecimento normal (TAKEDA, 1999).

Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas com água e comida *ad libitum* em caixa padrão com o mesmo número de animais em cada caixa. Os animais foram separados em seus respectivos grupos aos 2 meses de idade, logo após serem divididos foram submetidos a semana de aprendizagem do teste para avaliação da memória espacial. Após a realização da semana de aprendizado os animais foram submetidos aos seus respectivos tratamentos até os 10 meses de idade. Ao chegarem aos 10 meses de idade, foi realizado o último

teste comportamental. 24 horas após esse teste, os animais foram anestesiados com isoflurano e, mortos por decapitação. O cérebro e sangue foram coletados e armazenados a -80°C para análises moleculares posteriores.

A idade de 10 meses foi determinada como um “ponto de finalização” da participação dos animais no projeto, a partir de observações gerais da sua saúde (redução do comportamento alimentar, dor, aparecimento de tumor, etc) (para revisão, consultar AKIGUCHI, 2017).



As matrizes das linhagens foram doadas pela Prof<sup>a</sup> Eliana Akamine do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo e foram mantidas no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Hudson de Sousa Buck. A partir dessas matrizes, foi estabelecida uma colônia dessa linhagem.

## 4.2 Grupos Experimentais

**SAMR-1 (n =10):** utilizados como controles dos animais SAMP-8.

Os animais SAMP-8 foram divididos nos seguintes grupos:

**1) Controle SAMP-8 (n = 8):** animais que beberam somente água filtrada durante todo o processo de envelhecimento.

**2) Lítio (Li) (n=10):** animais que receberam carbonato de lítio na dose de 0,25 mg/kg durante o processo de envelhecimento.

**3) Ambiente enriquecido (AE) (n=8):** animais que foram mantidos em ambiente enriquecido durante o processo de envelhecimento.

**4) Lítio + AE (Li+AE) (n=8):** animais que foram mantidos em ambiente enriquecido durante o processo de envelhecimento e tratados com a mesma dose de carbonato de lítio.

Os tratamentos e observações comportamentais descritos a seguir foram realizados no período de fevereiro a dezembro de 2017, durante projeto de iniciação científica.

#### **4.3 Tratamento com carbonato de lítio**

O carbonato de lítio foi adicionado à água de beber e foi oferecido aos animais na dose final de 0,005 mg/animal/dia, o que corresponde à dose de 0,25 mg/kg (NUNES et al.,2015).

#### **4.4 Estimulação cognitiva em ambiente enriquecido**

O ambiente enriquecido foi composto por vários objetos incluindo escadas, rodas de exercício, bolas, objetos de plástico e madeira. Os objetos foram trocados a cada dois dias, conforme descrito anteriormente (BARALDI et al., 2013).

#### **4.5 Avaliação da memória espacial**

A avaliação da memória espacial foi realizada de acordo com trabalhos anteriores do grupo (BARALDI et al., 2013; BALTHAZAR et al., 2018), utilizando-se o “labirinto de Barnes”. Esse labirinto é composto por uma prancha circular branca com buracos distribuídos radialmente, circundada por uma parede escura onde quatro símbolos (cruz, quadrado, círculo e triângulo) amarelos foram dispostos em sequência. Uma caixinha preta com maravalha (caixa de escape) foi colocada embaixo de um dos buracos (sempre o mesmo para cada animal). O animal foi colocado no centro da prancha, onde permaneceu por 1 minuto em uma caixa de acrílico para reconhecer o ambiente a sua volta. Sobre a prancha foi colocada uma luz (70 W) considerada como estímulo incômodo para o roedor. Em seguida, ele foi solto e teve, no máximo, cinco minutos para encontrar a caixa de escape, onde foi deixado por mais um minuto, com as luzes da sala apagadas e a caixa fechada. A latência para encontrar a caixa de escape, bem como o tempo de permanência no quadrante onde se localizava a caixa de escape foram

registrados. O teste é baseado na preferência inata de roedores por lugares escuros e fechados.

Na fase de aquisição da informação, quando os animais estavam com dois meses de idade, passaram por uma prova por dia, durante cinco dias. Os testes para avaliação da consolidação da memória foram realizados a cada três meses até a morte do animal.

**Figura 3.** Labirinto de Barnes desenvolvido para avaliação da memória espacial de camundongos. A caixa de escape fica sob um dos buracos.



Fonte: Arquivo pessoal.

#### **4.6 Avaliação do comportamento de ansiedade**

O comportamento de ansiedade foi verificado utilizando-se o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), equipamento que consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços fechados (50 x 10 cm, paredes com 40 cm de altura). Os braços são conectados a um quadrado central (10 x 10 cm) que confere uma aparência de cruz ao labirinto. O labirinto é mantido a, aproximadamente, 50 cm do chão (Figura 3).

Os parâmetros avaliados foram a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, nos braços fechados e no centro do equipamento. Foram registrados, também, o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados e o número de “head dippings” (comportamento de mergulhar a cabeça para explorar o ambiente fora do equipamento). Quanto mais

o animal entrar e/ou quanto mais tempo permanecer nos braços abertos, menor o nível de ansiedade. Da mesma forma, quanto maior o número de “head dippings”, menor o nível de ansiedade.

Os dados obtidos foram tempo de permanência no braço aberto/tempo total do experimento, tempo de permanência no braço fechado/tempo total do experimento, número de entradas no braço aberto/ número total de entradas e número de entradas no braço fechado/número total de entradas.

**Figura 4:** Labirinto em cruz elevado. Equipamento utilizado para medir o nível de ansiedade de roedores.

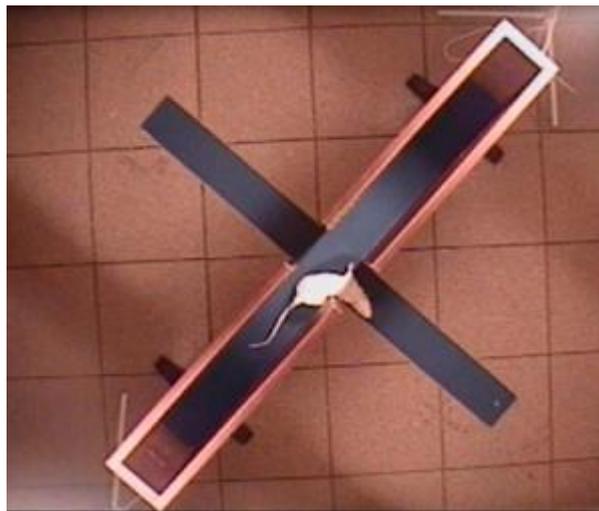


Foto: Divulgação/FFCLRP.

#### **4.7 Ensaio de imunofluorescência**

Para realizar os ensaios de imunofluorescência, os cérebros de 5 animais por grupo foram selecionados aleatoriamente. Foram obtidas amostras de 20 µm em criostato (-20 °C a -22 °C, Microm HM 505N, Francheville, França) e as secções foram colocadas em lâminas revestidas com gelatina. Após o término do procedimento, as caixas com as lâminas foram embrulhadas em papel alumínio e mantidas em dessecador por 5 minutos em temperatura ambiente. Logo em seguida, as caixas foram armazenadas em freezer a -80°C até serem utilizadas.

##### **4.7.1 Análise da densidade de neurônios hipocampais**

Para marcação de neurônios, as fatias foram aquecidas por 10 minutos e, em seguida, foram fixadas com acetona 100% por 5 min. As fatias foram, então, lavadas em PBS por 1 minuto e mergulhadas em peróxido de hidrogênio 0,6% em

metanol por 20 minutos. Logo após, as fatias foram lavadas novamente em PBS por 5 min e incubadas com soro de cabra (*“normal serum”*) por 30 min. Passado esse tempo, as fatias foram incubadas com o anticorpo conjugado anti-NeuN com Alexa Fluor 488 (NBP1-92693AF488, 1:500) diluído em *“normal serum”* por 1 hora. Após esse período, as fatias foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e as lâminas foram fechadas com Fluoroshild com DAPI para marcação de núcleos celulares (Sigma, F6057).

As imagens das regiões hipocâmpais DG, Ca1 e Ca3 foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMI8. Para as imagens com marcação para DAPI foi utilizado o filtro DAPI com excitação de 345 nm e emissão de 460nm. Para adquirir as imagens com a marcação feita com NeuN foi utilizado o filtro GFP com excitação de 561 nm e emissão de 594 nm. Imagens de três cortes de cada animal foram adquiridas com lente objetiva de 10x na região entre -1.70mm à -2.46mm a partir do bregma (PAXINOS e FRANKLIN, 2008).

As imagens foram analisadas utilizando-se o programa ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, EUA). Os dados foram calculados a partir da proporção da área marcada com relação à área total (área proporcional = área marcada/área total selecionada) e expressos como área proporcional marcada.

#### **4.7.2 Análise de placas senis**

A análise da presença e densidade de placas senis foi realizada utilizando-se marcação com tioflavina-S, um marcador específico para aglomerados do peptídeo  $\beta$ -amiloide. As lâminas contendo as fatias foram aquecidas até a temperatura ambiente por 10 minutos e depois lavadas em PBS contendo Triton (PBST) por 3 minutos. Esse processo foi repetido por 3 vezes. Logo após, as lâminas foram imersas em tioflavina-S (Sigma T1892- 25g) diluída em PBST por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em PBS por 3 minutos, 3 vezes seguidas. Após esse processo, foram colocadas em álcool 70% por 5 minutos e lavadas novamente em PBS por 3 minutos repetindo o processo por 3 vezes seguidas. As lâminas foram fechadas com Fluoroshild com DAPI (Sigma - F6057) e guardadas em ambiente refrigerado.

As imagens do hipocampo foram obtidas em microscópio invertido modelo Leica DMI8. As imagens com marcação para DAPI foram obtidas com filtro DAPI,

com excitação de 345nm e emissão de 460nm. Para as imagens com a marcação feita com Thioflavina-S foi utilizado o filtro GFP com excitação de 480nm e emissão de 525 nm. Assim como descrito anteriormente, imagens de três cortes de cada animal foram adquiridas com lente objetiva de 10x na região entre -1.70 mm à -2.46 mm a partir do bregma (PAXINOS e FRANKLIN, 2008).

As imagens foram analisadas utilizando-se o programa ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, EUA). Os dados foram expressos como número total de placas senis.

#### **4.7.3 Detecção de células em processo de degeneração**

A análise de neurodegeneração foi realizada com Fluoro-Jade C, marcador utilizado para analisar a densidade de neurônios em processo de degeneração. Para essa marcação, as lâminas foram secas por 10 min e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min. Logo depois foram mergulhadas em álcool 80% com hidróxido de sódio por 15 min e, em seguida, etanol 70% por 2 min. Depois foram lavadas em água destilada por 2 min sendo, em seguida, mergulhadas em permanganato de potássio a 0,06% por 2 min. Logo após foram lavadas novamente com água destilada por 10 min e incubadas por 1 hora em solução de Fluoro-Jade C, para marcação de neurodegeneração e com DAPI, para a marcação de núcleos celulares. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada por 3 vezes (de 1 min). Para finalizar, as lâminas foram submetidas a duas passagens no xilol e, em seguida, foram fechadas com DPX (Sigma 100909960). As imagens das regiões hipocâmpais DG, Ca1 e Ca3 foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMI8. Para aquisição das imagens com marcação para DAPI foi utilizado filtro DAPI com excitação de 345nm e emissão de 460nm e para as imagens com a marcação feita com Fluoro-Jade C foi utilizado o filtro GFP com excitação de 480nm e emissão de 525 nm.

Para a quantificação foram analisados três cortes de cada animal. As imagens foram adquiridas com lente objetiva de 10x na região entre -1.70mm à -2.46mm a partir do bregma (PAXINOS e FRANKLIN, 2008). A quantificação foi realizada com ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, EUA). Os dados foram calculados a partir da proporção da área marcada com relação à área total (área

proporcional = área marcada/área total selecionada) e expressos como área proporcional marcada.

#### **4.8 Western-Blotting para proteínas relacionadas à LTP e ao terminal sináptico**

Amostras de hipocampo de 6 animais, foram separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA e um tablete de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. A partir do sobrenadante foi feita a dosagem da concentração de proteínas, em cada fração, utilizando-se o método de Bradford (1976). Quantidades equivalentes de proteínas foram separadas por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%) a 25 mA por aproximadamente 2 h. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM e metanol 20%, a 400 mA por 40 minutos a 4°C. Terminada a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com tampão Tris contendo Tween-20 1,0% e albumina de soro bovino (BSA) 2% (Tampão de bloqueio) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio das reações não específicas do anticorpo primário. Após lavagem, o material foi incubado com Ponceau S por 5 minutos para marcação controle. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente e foram incubadas com o anticorpo primário anti-NMDA-2B (Abcam, ab65783, diluído: 1:1000), anti-Glu2/3/4 (Cell Signalling, 2460S, diluído 1:1000), anti-CAMKIV (Cell Signalling, 4032S, diluído 1:1000) ou anti-Sinaptofisina (Abcam, ab8049, diluído 1:1000). Em seguida as membranas foram lavadas conforme descrito anteriormente e incubadas com o anticorpo secundário (Abcam, ab 6721 Rb, diluição 1:4000) em tampão de bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram reveladas no aparelho LASS 500 e foram analisadas no software ImageJ.

#### **4.9 Avaliação da densidade de BDNF**

As amostras de sobrenadante dos homogenatos de hipocampo dos camundongos foram colocadas na placa previamente preparada com o anticorpo

monoclonal anti-BDNF (método pré-coated) e está, incubada por 120 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, após a placa ser lavada três vezes com tampão de lavagem do ensaio, o anticorpo monoclonal anti-BDNF foi adicionado e a placa incubada por 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Foi repetido o ciclo de lavagem e adicionado o substrato para o anti-BDNF. Foi feita nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, protegida da luz. Ao término, adicionou-se a solução finalizadora da reação e a absorção foi lida a 450 nm em leitora de microplacas (PowerWave HT, BioTek, Winooski, Vermont, USA). Os valores de absorbância foram comparados a uma curva padrão com diferentes concentrações de BDNF (0 – 1000 pg/mL) e normalizados pela quantidade total de proteínas da solução, obtendo-se, ao final, os valores em pg/ug.

## **5. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erros-padrão. Para as comparações entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8 foi realizado o teste de Mann-Whitney para dados não pareados. Para a análise do efeito dos tratamentos isolados ou combinados em animais SAMP-8, os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **6. Resultados**

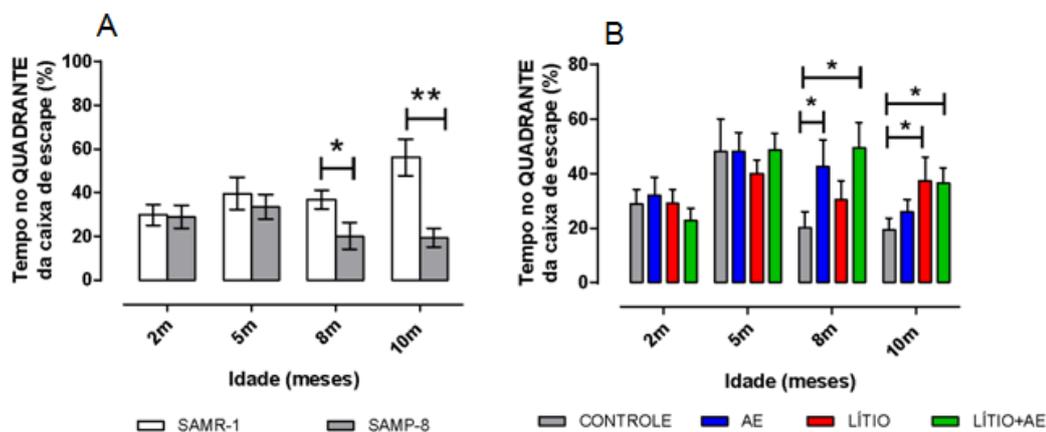
### **6.1 Efeitos dos tratamentos na memória espacial**

Como contextualização, segue a descrição dos dados obtidos em ensaios comportamentais, realizados durante o período entre fevereiro e dezembro de 2017. Com relação à memória espacial, na avaliação do tempo despendido no quadrante certo (quadrante da caixa de escape) foi observado que os animais SAMP-8 permaneceram menos tempo no quadrante certo no 8º mês (18,4%,  $p < 0,05$ ) e no 10º mês de vida (25,5%,  $p < 0,01$ ) em relação aos animais SAMR-1 (Gráfico 1A). Com relação aos SAMP-8 que foram submetidos aos tratamentos com lítio, ambiente enriquecido (AE) ou ambos, no 8º mês de idade houve significativa manutenção da memória dos animais que estiveram em AE (22,2%,  $p$

< 0,05) ou em AE e tratados com Li (29,8%,  $p < 0,05$ ) (Gráfico 1B). Aos 10 meses de idade, os animais tratados com lítio também apresentaram aumento significativo do tempo no quadrante correto (13,8%,  $p < 0,05$ ), assim como o grupo com tratamento combinado (18,5%,  $p < 0,05$ , Figura 4B). Não foi observada diferença entre os grupos tratados.

Vale ressaltar que nos demais parâmetros normalmente observados no labirinto de Barnes (tempo para achar a caixa de escape, tempo total, número de erros) não foram observadas diferenças entre SAMR-1 e SAMP-8 ou entre os grupos em tratamento.

**Gráfico 1.** Tempo que os animais permaneceram explorando o quadrante da caixa de escape.



**A:** Comparação entre SAMR-1 e SAMP-8. **B:** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os histogramas e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

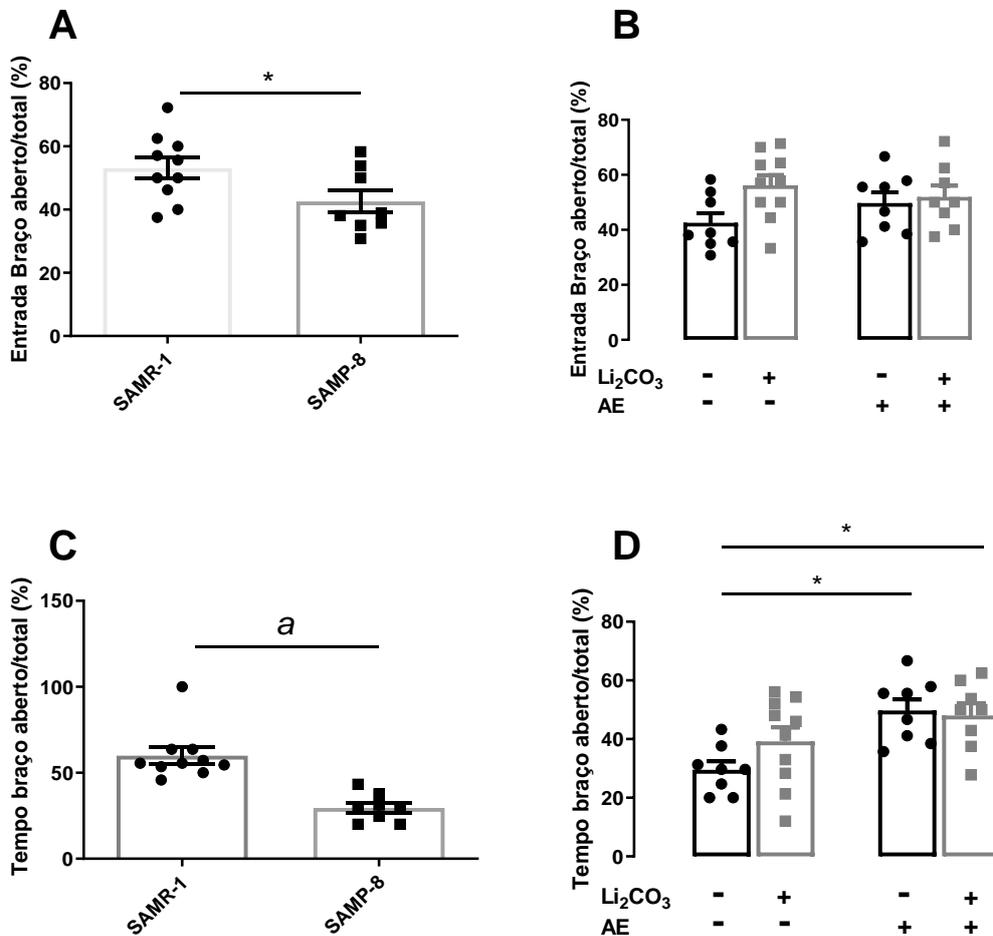
## 6.2 Avaliação do comportamento ansioso no Labirinto em Cruz Elevado

Na avaliação do número de entradas nos braços abertos e braços fechados, foi verificado que houve uma redução significativa da entrada dos animais SAMP-8 nos braços abertos (14,30%,  $p < 0,05$ ), quando comparados com animais SAMR-1 (Gráfico 2A). Por outro lado, quando comparamos os animais em tratamento com os animais controle, não foi observada nenhuma alteração no tempo em que esses animais permaneceram nos braços abertos. Da mesma

forma, não houve diferença no número de entradas nos braços abertos entre os grupos tratados (Gráfico 2B).

Quando analisado o tempo de permanência nos braços abertos é possível verificar que os animais SAMP-8 permaneceram menos tempo nos braços abertos em relação aos animais SAMR-1 (25,85%,  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 2C). Em relação aos grupos tratados, AE e Li+AE permaneceram mais tempo nos braços abertos quando comparados aos animais do grupo controle (21,41% e 20,30% respectivamente,  $p < 0,05$ ). O grupo Li também permaneceu cerca de 15,00% a mais nos braços abertos do que o grupo controle, porém não há diferença estatística significativa. Não houve diferença na permanência dos braços abertos entre os grupos tratados (Gráfico 2D).

**Gráfico 2.** Tempo que os animais entraram e permaneceram nos braços abertos do LCE.



**A:** Comparação entre SAMR-1 e SAMP-8 em relação à quantidade de entradas nos braços abertos. **B:** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8 em relação aos animais SAMP-8 controle em relação à quantidade de entradas nos braços abertos. **C:** Comparação entre SAMR-1 e SAMP-8 em relação ao tempo em que permaneceram nos braços abertos. **D:** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8 em relação aos animais SAMP-8 controle em relação ao tempo que os animais permaneceram nos braços abertos. Os histogramas e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão. \*:  $p < 0,05$ ;  $\alpha$ :  $p < 0,0001$ .

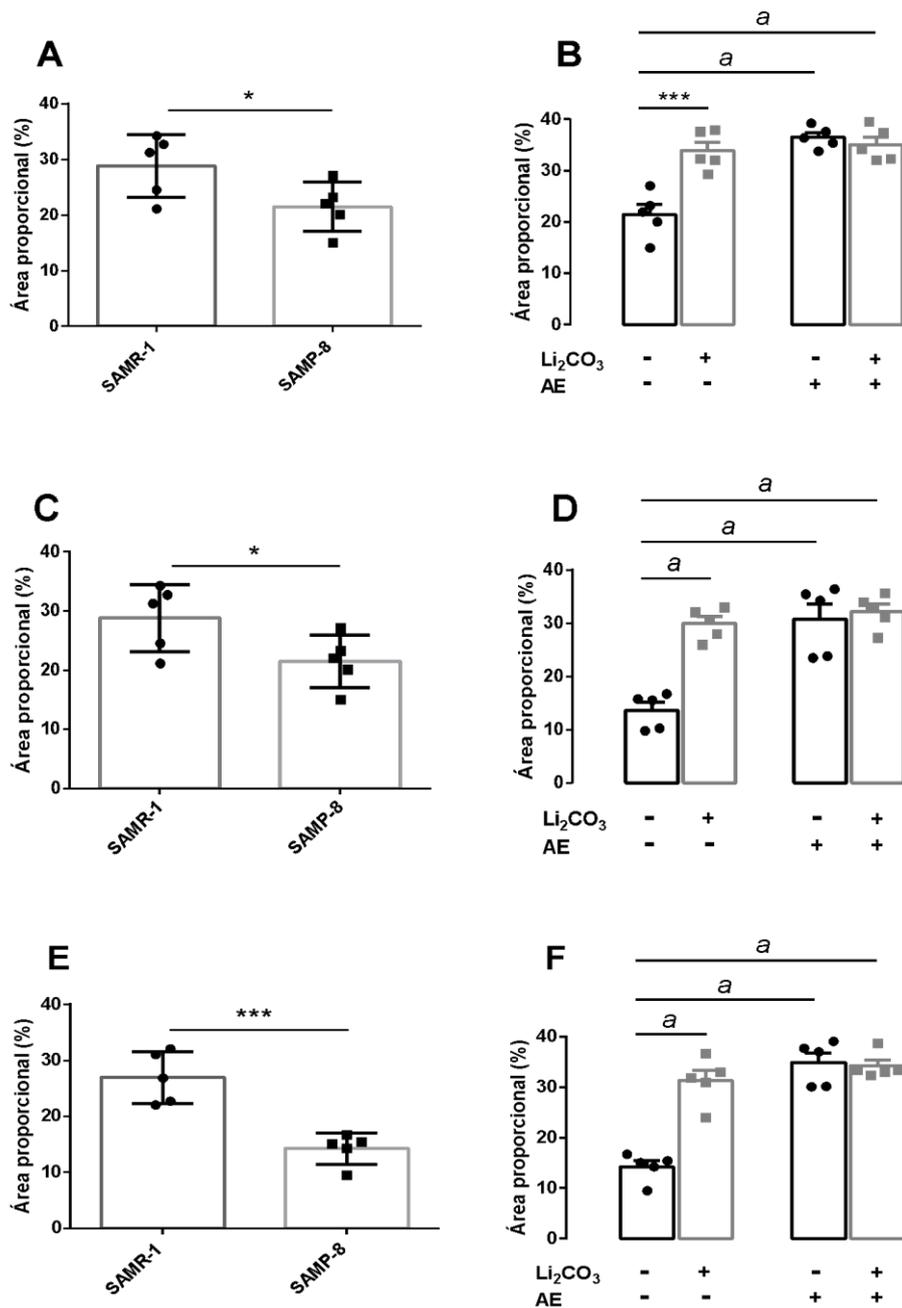
### 6.3 Efeitos dos tratamentos na densidade neuronal

Com a marcação com NeuN foi observado que os animais SAMP-8 apresentaram redução significativamente menor de 9,22% de neurônios ( $p < 0,05$ ) do que os animais SAMR-1 na região do giro denteado (Gráfico 3A e Figura 5). Por outro lado, com as estratégias propostas, houve manutenção da densidade neuronal na região do GD, uma vez que a densidade de neurônios em relação aos animais SAMP-8 controles foi maior em animais tratados com Li (1,57 vezes,  $p < 0,001$ ), mantidos em AE (1,70 vezes,  $p < 0,0001$ ) e Li+AE (1,63 vezes,  $p < 0,0001$ ) apresentaram uma quantidade maior de neurônios na região do GD (Gráfico 3B e Figura 5).

Na região Ca1 também foi observado que os animais SAMP-8 possuem uma densidade de neurônios significativamente menor (15,70%,  $p < 0,05$ ) em relação aos SAMR-1 (Gráfico 3C e Figura 6). Os animais SAMP-8 submetidos a todos os tratamentos apresentaram quantidade significativamente maior (Li: 2,19 vezes; AE: 2,25 vezes; Li+AE: 2,36 vezes,  $p < 0,0001$ ) de neurônios em relação ao controle (Gráfico 3D e Figura 6).

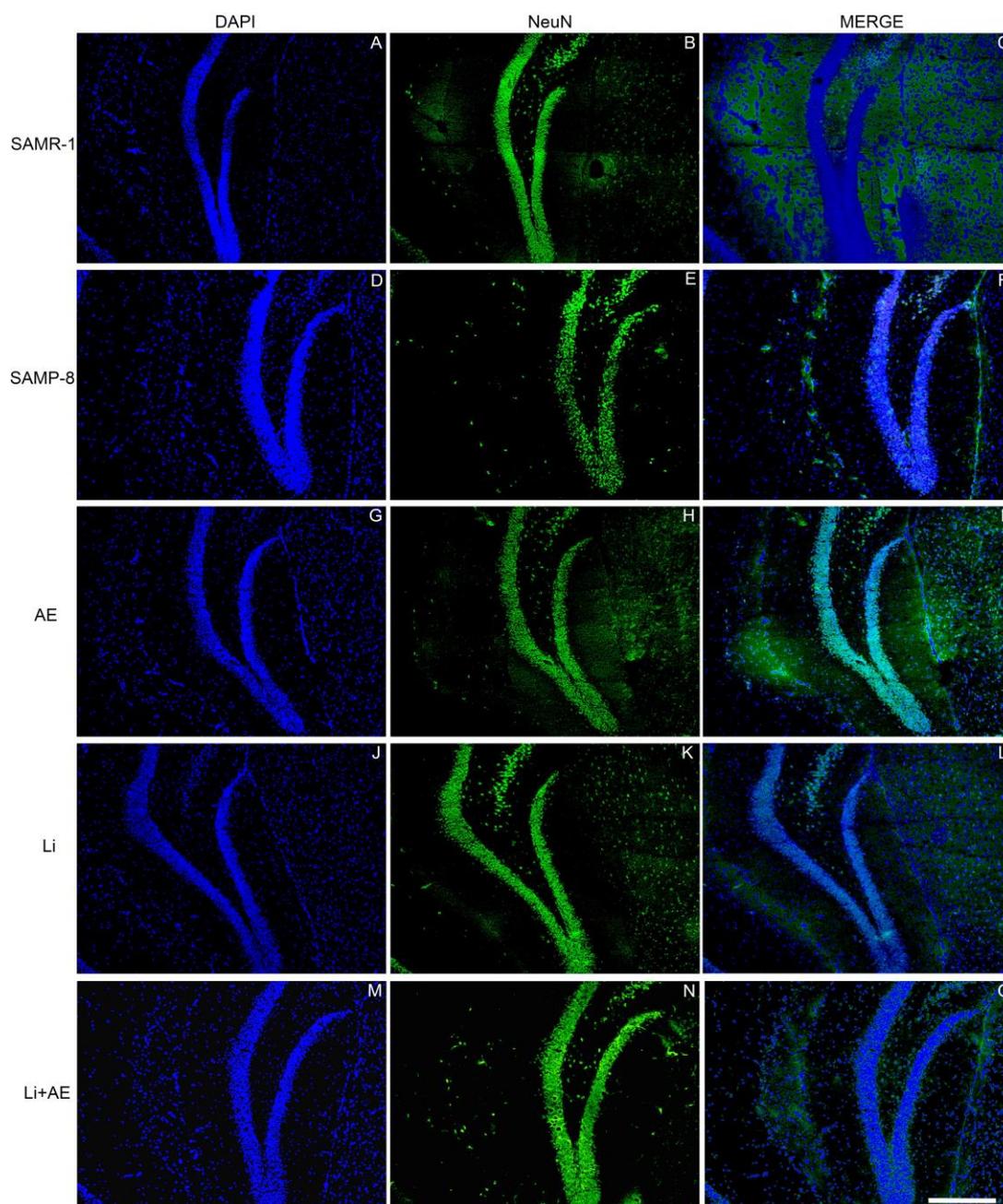
Assim como nas outras áreas hipocâmpais, na região Ca3, os animais SAMP-8 apresentaram quantidade significativamente menor (11,77%,  $p < 0,001$ ) de neurônios em relação ao grupo SAMR-1 (Gráfico 3E e Figura 7). Os grupos SAMP-8 AE, Li e Li+AE apresentaram densidade ainda maior (Li: 2,19 vezes; AE: 2,45 vezes; Li+AE: 2,40 vezes,  $p < 0,0001$ ) de neurônios nessa região. Não foi observada diferença na densidade neuronal entre os diferentes tipos de tratamentos (Gráfico 3F e Figura 7).

**Gráfico 3.** Porcentagem de NeuN por área proporcional na região do giro denteado (A e B), Ca1 (C e D) e Ca3 (E e F).



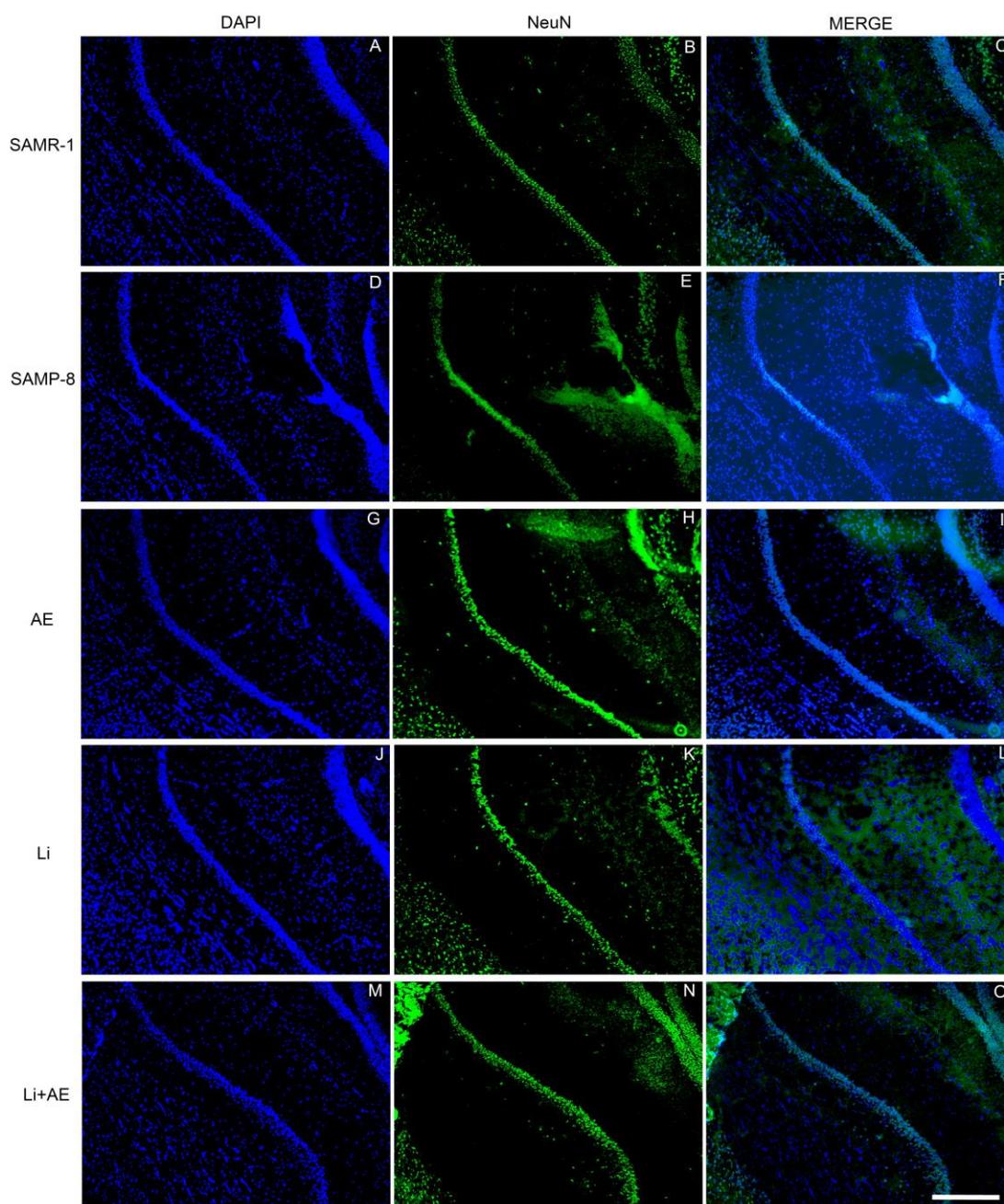
**A, C e E:** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B, D, F:** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  a:  $p < 0,0001$ .

**Figura 5.** Marcação de NeuN na região do GD.



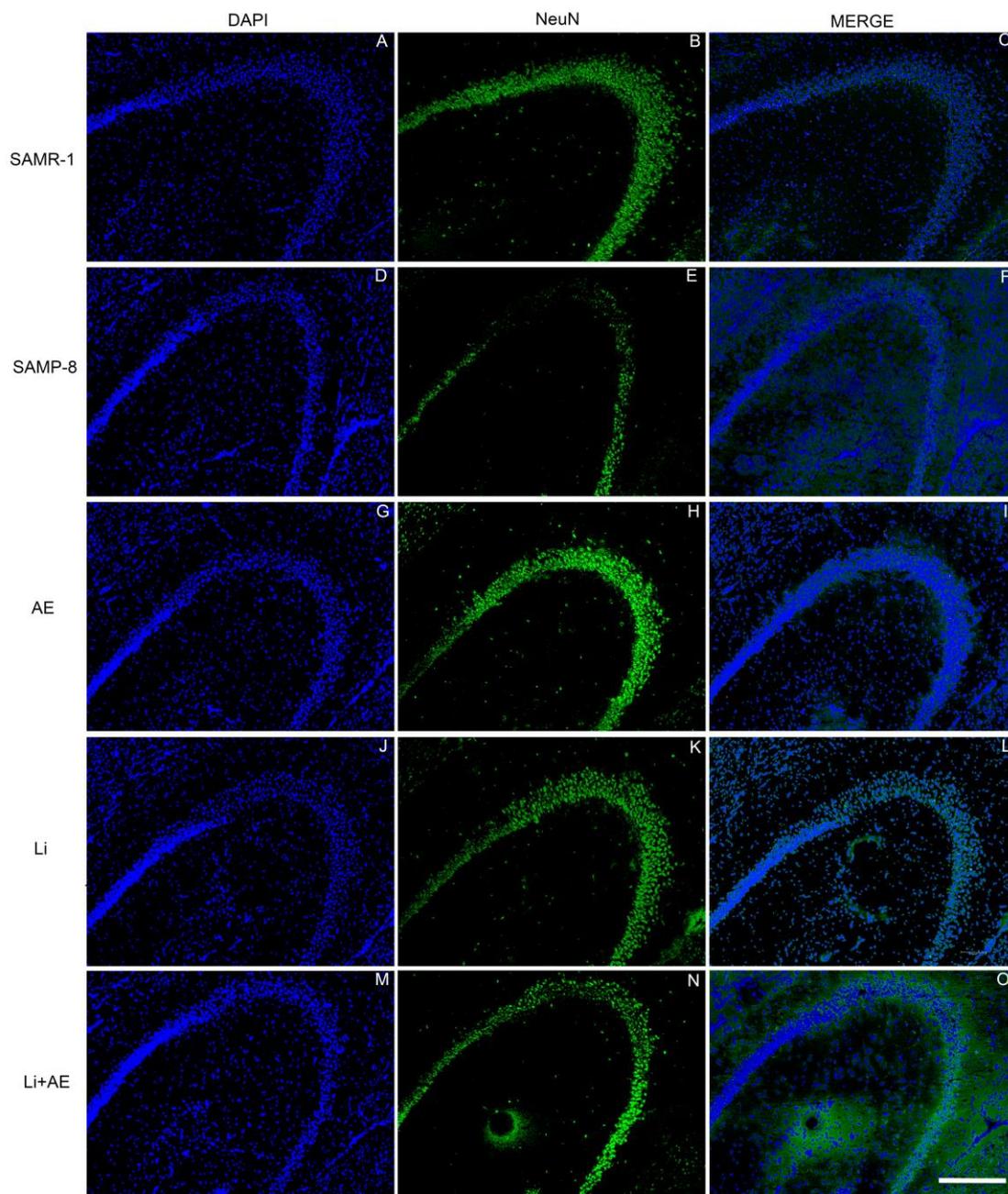
Fonte: autor. Marcação de NeuN (verde) na região do GD no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMI8 na objetiva de 10x. Barra de escala: 100µm.

**Figura 6.** Marcação de NeuN na região do Ca1.



Fonte: autor. Marcação de NeuN (verde) na região do Ca1 no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMi8 na objetiva de 10x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

**Figura 7.** Marcação de NeuN na região do Ca3.



Fonte: autor. Marcação de NeuN (verde) na região do Ca3 no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMi8 com objetiva de 10x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

#### **6.4 Efeitos dos tratamentos para neurônios em neurodegeneração**

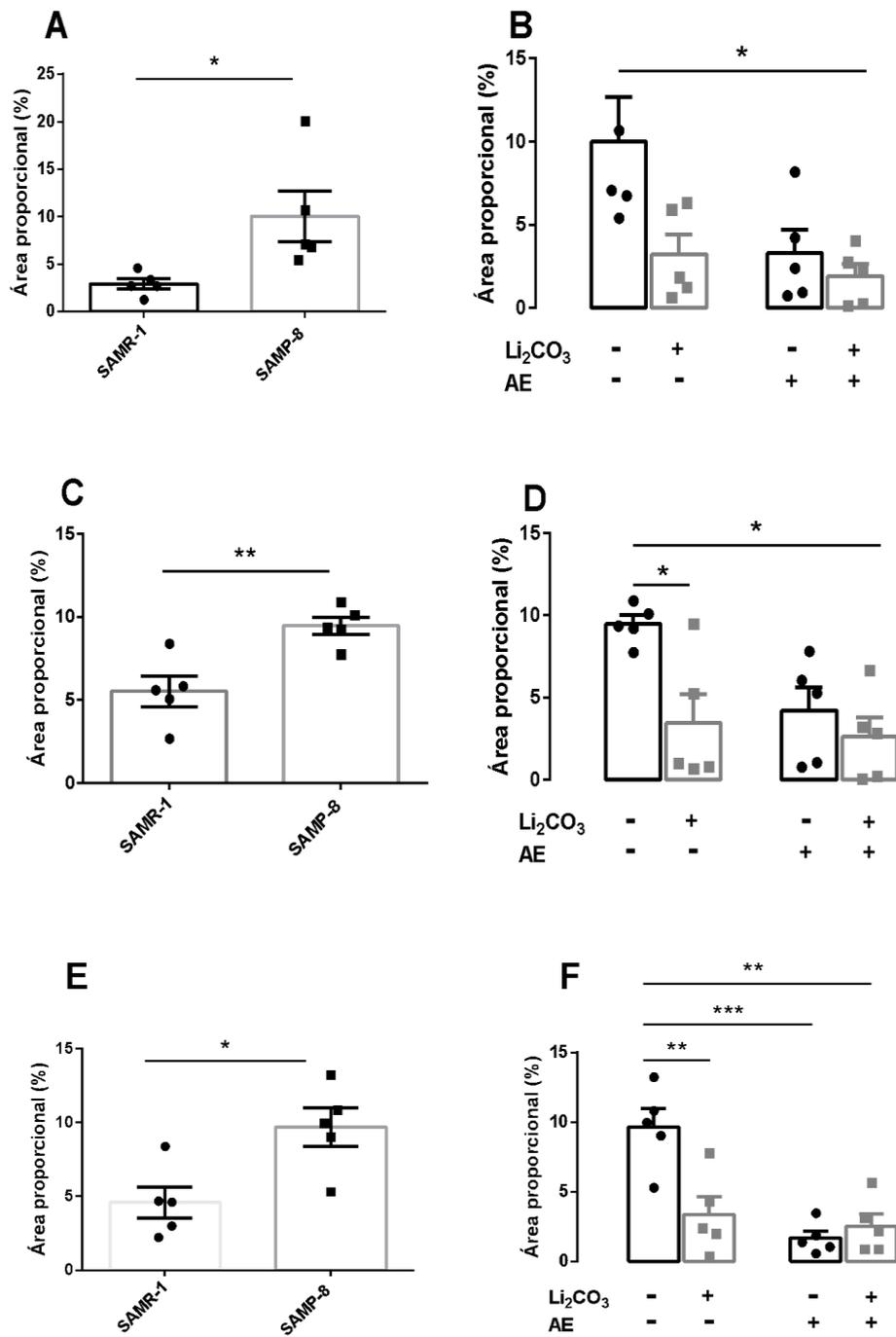
Com a marcação com Fluoro- Jade C na região do GD foi possível observar que os animais SAMP-8 apresentaram área hipocampal significativamente maior

(4,37%,  $p < 0,05$ ) em degeneração em relação aos animais SAMR-1 (Gráfico 4A e Figura 8). Porém quando tratados com Li e AE, mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa (4,83% e 4,68% respectivamente) foi possível observar diminuição na neurodegeneração na região do giro denteado. Quando submetidos ao tratamento combinado, os animais SAMP-8 apresentaram uma diminuição significativa (5,24%,  $p < 0,05$ ) de neurodegeneração em relação aos animais SAMP-8 controle (Gráfico 4B e Figura 8).

Na região Ca1 foi possível observar um aumento significativo de neurodegeneração em amostras de SAMP-8 (3,76%,  $p < 0,01$ ) com relação aos SAMR-1 (Gráfico 4C e Figura 9). Os animais SAMP-8 Li e Li+AE apresentaram diminuição da degeneração em Ca1 (6,523% e 8,37% respectivamente,  $p < 0,05$ ) em relação aos animais SAMP-8 sem nenhum tratamento. Já os animais do grupo AE também demonstraram diminuição na densidade de neurodegeneração nessa região (4,09%), porém não houve diferença estatística significativa (Gráfico 4D e Figura 9).

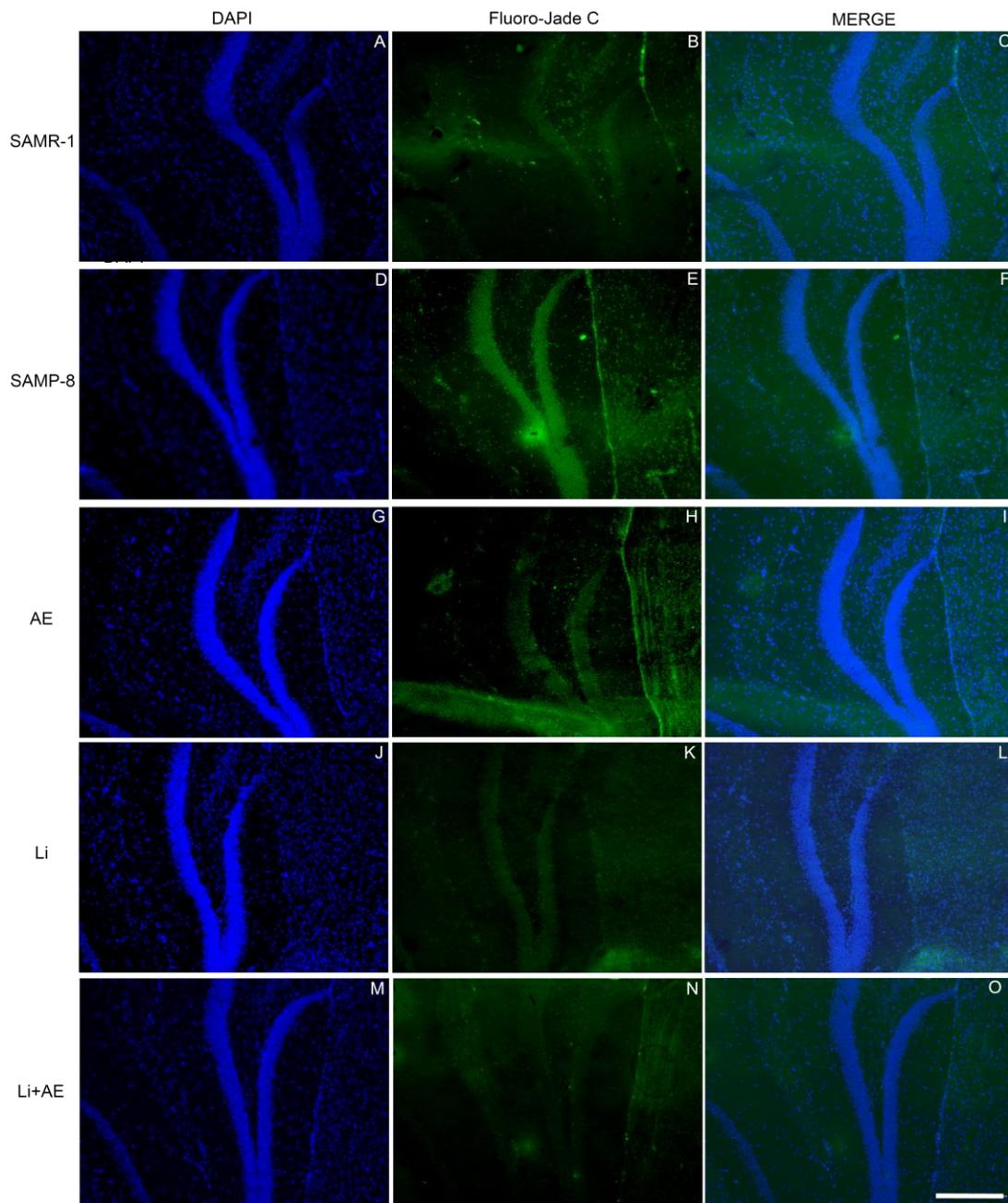
De forma semelhante, entre as linhagens na região Ca3 foi possível observar uma maior densidade de neurodegeneração nos animais SAMP-8 (5,36%,  $p < 0,005$ ) (Gráfico 4E e Figura 10). Nessa região os tratamentos com Li e Li+AE promoveram diminuição da neurodegeneração na região do Ca3 dos animais SAMP-8 (Li: 7,58%, Li+AE: 7,79%,  $p < 0,01$ ) quando comparados ao controle. Essa diferença também foi observada nos animais submetidos ao AE (8,58%,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 4F e Figura 10). Os tratamentos não apresentaram diferença entre si.

**Gráfico 4.** Porcentagem de marcação com Fluoro Jade C por área proporcional na região do GD (A, B), Ca1 (C, D) e Ca3 (E, F) do hipocampo.



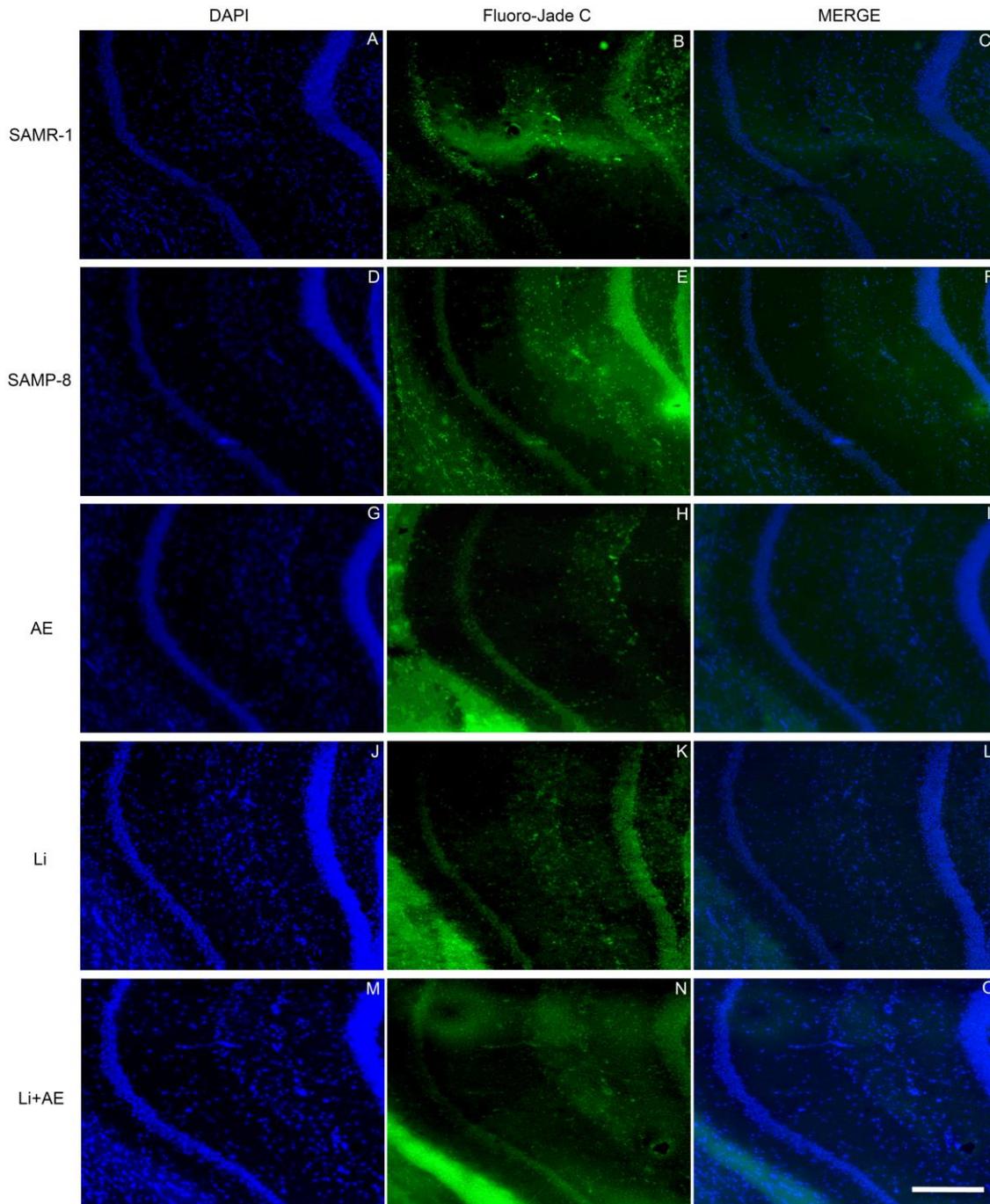
**A, C, E:** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B, D, F:** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Figura 8.** Marcação da neurodegeneração na região do GD.



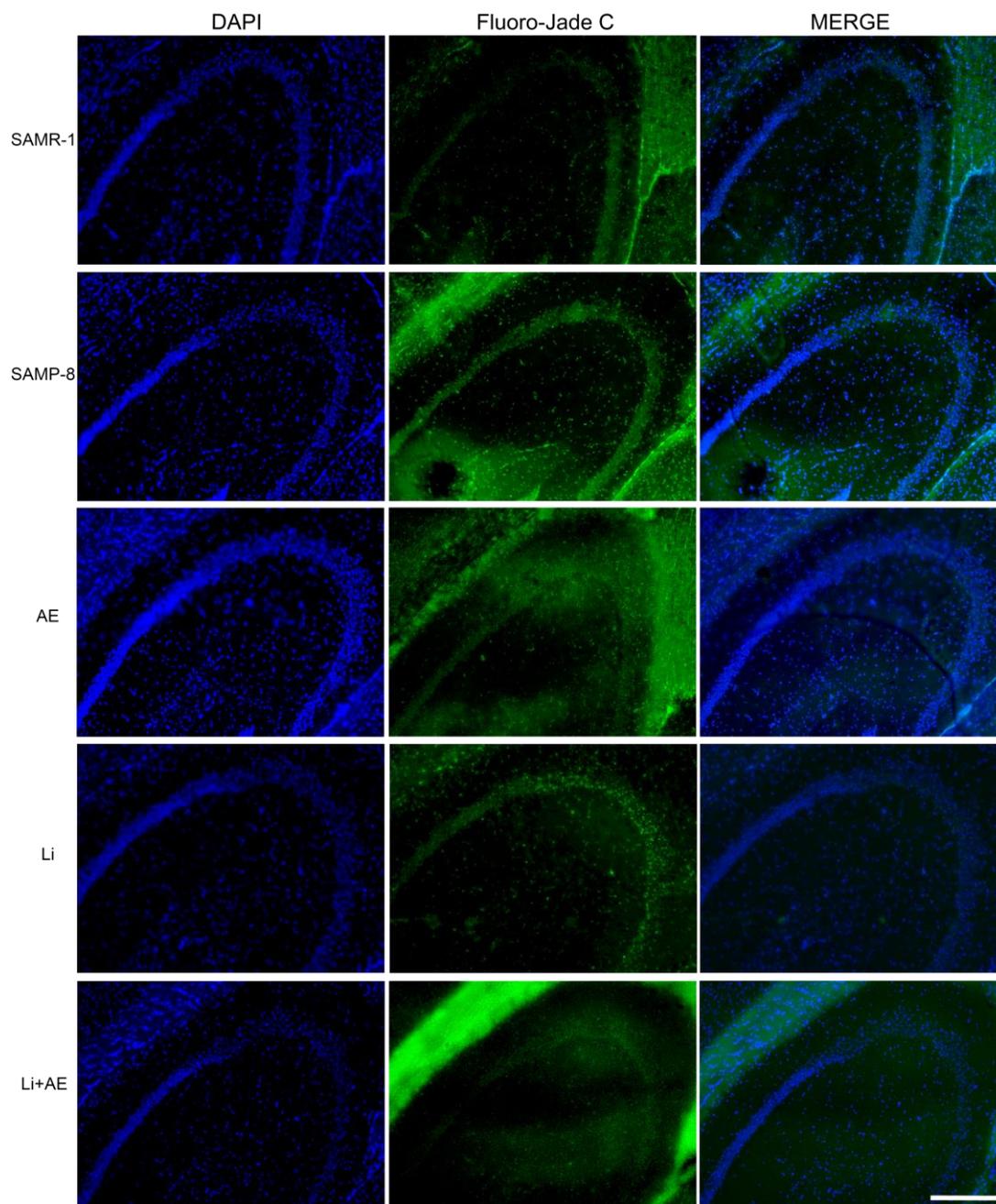
Fonte: autor. Marcação de Fluoro-Jade C (verde) na região do GD no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMI8 com objetiva de 10x. Barra de escala: 100µm.

**Figura 9.** Marcação da neurodegeneração na região do Ca1



Fonte: autor. Marcação de Fluoro-Jade C (verde) na região do Ca1 no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMi8 na objetiva de 10x. Barra de escala: 100µm.

**Figura 10.** Marcação da neurodegeneração na região do Ca3.

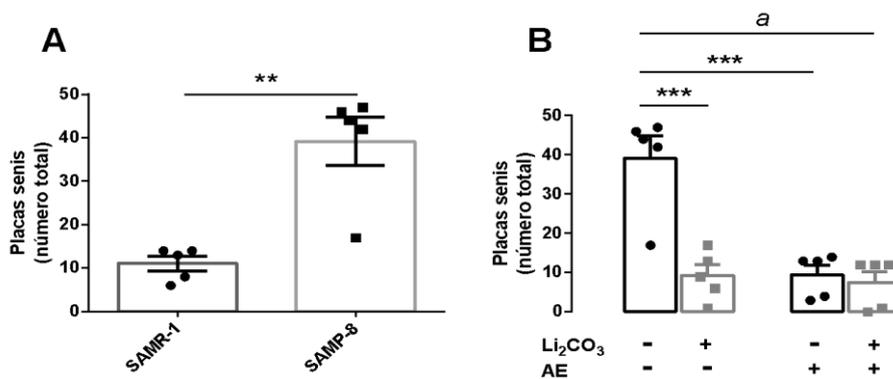


Fonte: autor. Marcação de Fluoro-Jade C (verde) na região do Ca3 no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMI8 com objetiva de 10x. Barra de escala: 100µm.

## 6.5 Efeitos dos tratamentos para a densidade de placas senis

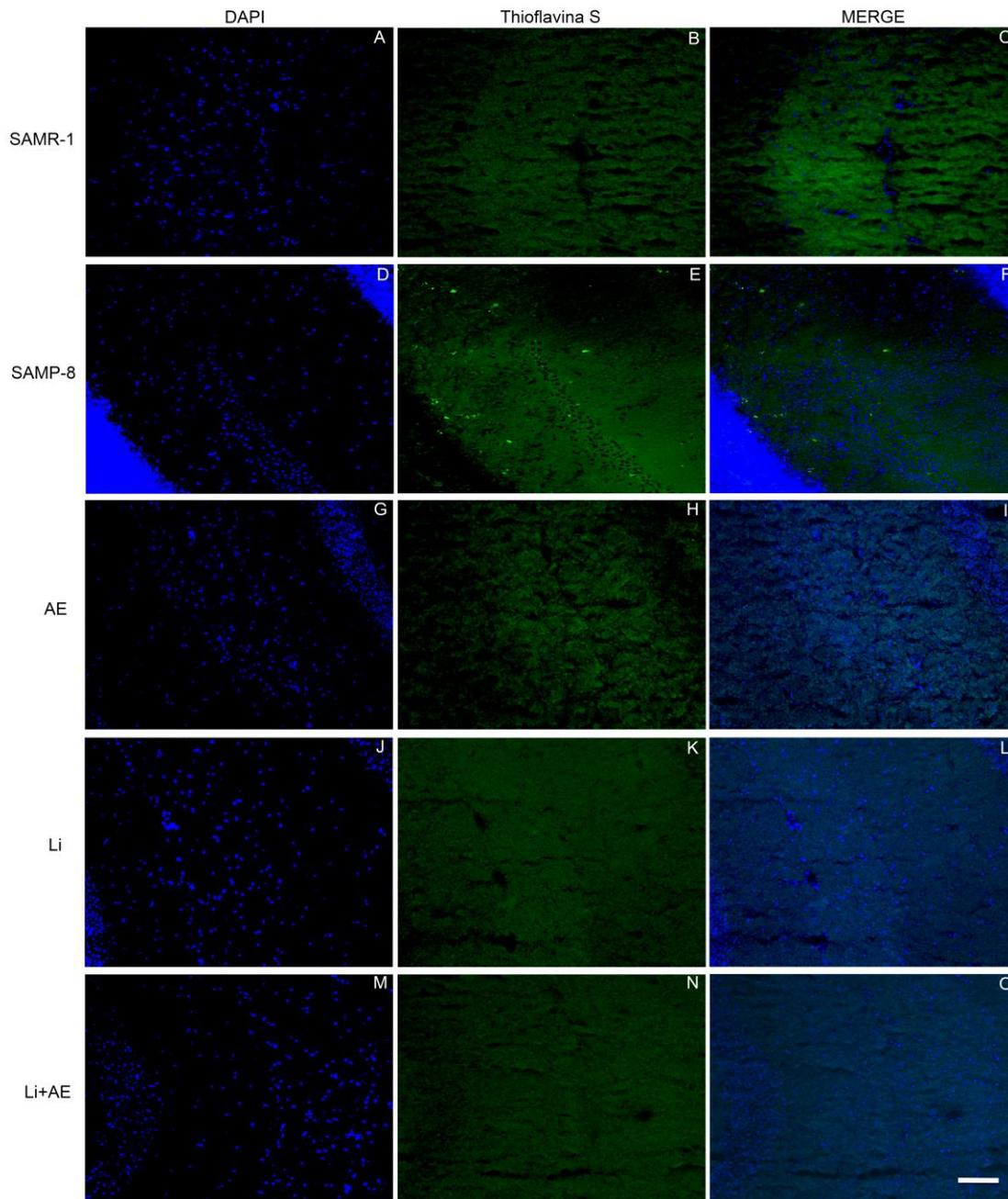
Pela marcação com Thioflavina S foi observada uma densidade significativamente maior de placas senis no hipocampo de animais SAMP-8 (70,45%,  $p < 0,01$ ), quando comparado com a densidade em hipocampo de animais SAMR-1 (Gráfico 5A e Figura 11). As três formas de tratamento se mostraram eficazes, diminuindo significativamente a quantidade de placas dos animais SAMP-8, sendo que os animais do grupo Li apresentaram uma diminuição da densidade de placas senis de 70,45% ( $p < 0,001$ ); para os submetidos ao AE a redução foi de 72,72% ( $p < 0,001$ ) e para os animais submetidos ao tratamento combinado, houve uma diminuição de 79,45% ( $p < 0,0001$ ) no hipocampo quando comparados aos animais SAMP-8 controle (Gráfico 5B e Figura 11). Entre os diferentes tratamentos, quando comparados, não foi verificada diferença.

**Gráfico 5.** Densidade de placas senis no hipocampo.



**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; a:  $p < 0,0001$ .

**Figura 11.** Marcação da placas senis no hipocampo.

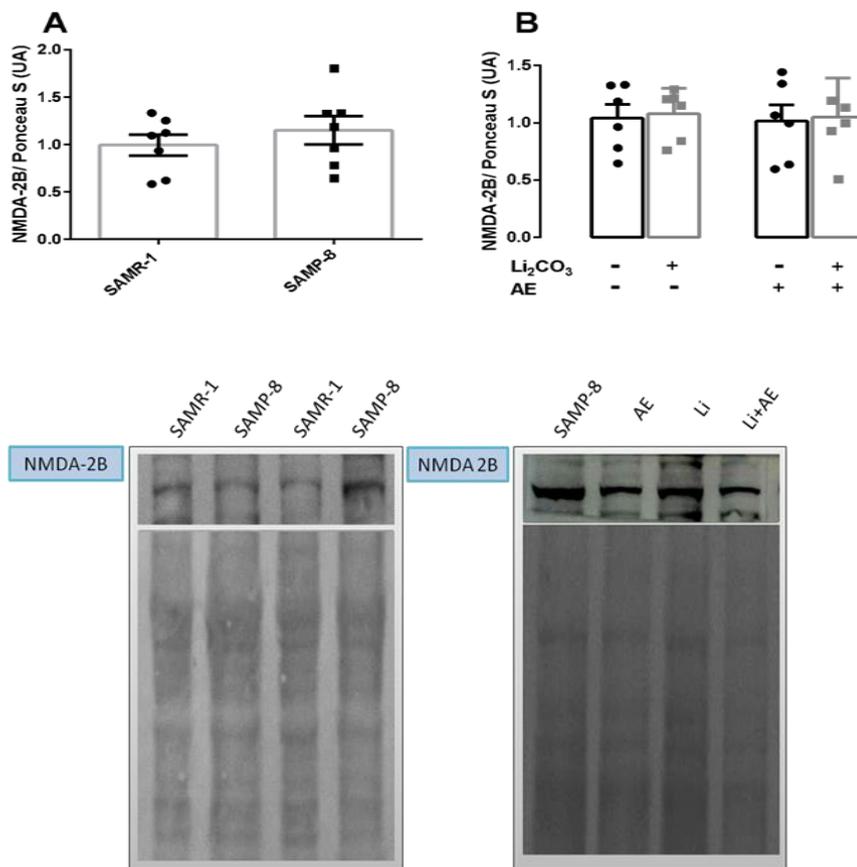


Fonte: autor. Marcação de Thioflavina-S (verde) no hipocampo de animais SAMR-1 (A-C), SAMP-8 (D-F), AE (G-I), Li (J-L) e Li+AE (M-O). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio invertido modelo Leica DMi8 com objetiva de 20x. Barra de escala: 100 $\mu$ m

## 6.6 Avaliação da densidade de receptores NMDA-2B

Na avaliação da densidade dos receptores NMDA-2B foi possível observar que não houve diferença entre as linhagens (Gráfico 6A). Também não foi observada alteração na densidade da proteína nos animais submetidos aos diferentes tratamentos quando comparados aos animais controle, nem entre os tratamentos (Gráfico 6B).

**Gráfico 6.** Densidade de receptores NMDA-2B no hipocampo.

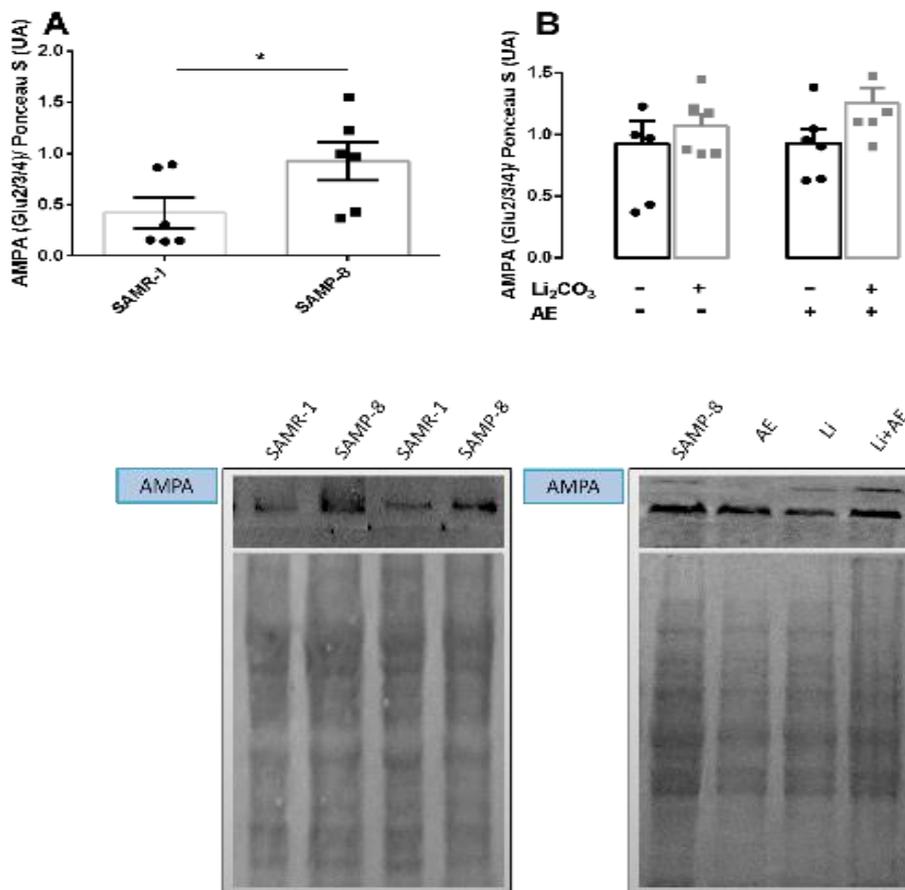


**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão.

## 6.7 Efeito dos tratamentos na densidade de receptores AMPA (Glu2/3/4)

Na avaliação da densidade de receptores AMPA foi observado aumento da densidade em animais SAMP-8 quando comparados aos animais SAMR-1 (Gráfico 7A). Não foi observada diferença na densidade desses receptores em animais tratados quando comparados aos animais do grupo controle. Da mesma forma, não foi observada diferença na densidade de AMPA entre os diferentes tratamentos (Gráfico7B).

**Gráfico 7.** Densidade de receptores AMPA (Glu2/3/4).

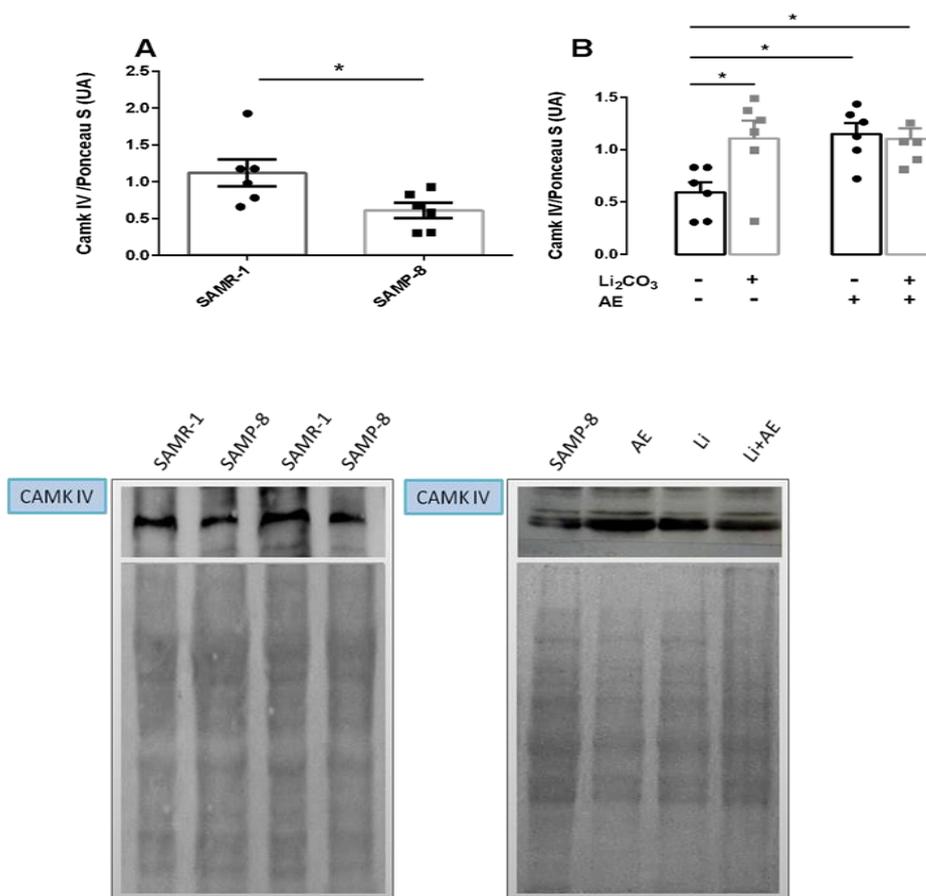


**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão: \*  $p < 0,05$ .

## 6.8 Densidade da proteína CAMK IV

Na avaliação da densidade da proteína CAMK IV foi observada densidade significativamente menor (45,53%,  $p < 0,05$ ) nos animais SAMP-8 quando comparados com os animais SAMR-1 (Gráfico 8A). Os animais tratados apresentaram manutenção da densidade de CAMK IV, pois houve aumento significativo da densidade dessa proteína quando comparados aos animais do grupo controle (Li: 1,86 vezes, AE: 1,93 vezes, Li+AE: 1,86 vezes,  $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença na densidade de CAMK IV entre os diferentes tratamentos (Gráfico 8B).

**Gráfico 8.** Densidade da proteína CAMK IV.

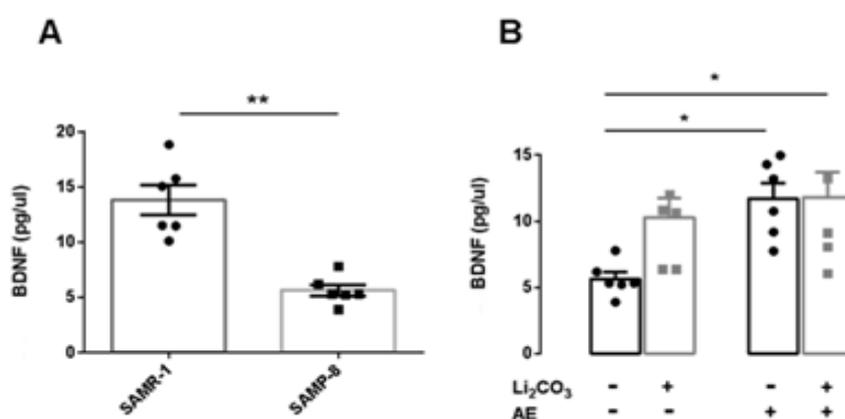


**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão: \*  $p < 0,05$ .

## 6.9 Análise na concentração de BDNF no hipocampo.

Na avaliação da concentração de BDNF no homogenato do hipocampo dos animais foi observado que os animais SAMP-8 possuem menor concentração de BDNF (59,79%,  $p < 0,01$ ) do que os animais SAMR-1 (Gráfico 9A). Os animais dos grupos AE e Li+AE apresentaram aumento significativo da concentração de BDNF (2,08 e 3,09 vezes, respectivamente,  $p < 0,05$ ) em relação aos animais SAMP-8 controle, sugerindo a manutenção da densidade da proteína. Os animais tratados com Li também apresentaram aumento da concentração de BDNF de 1,83 vezes em relação aos animais SAMP-8 controle, porém não houve diferença estatística significativa (Gráfico 9B).

**Gráfico 9.** Comparação da concentração de BDNF no hipocampo.



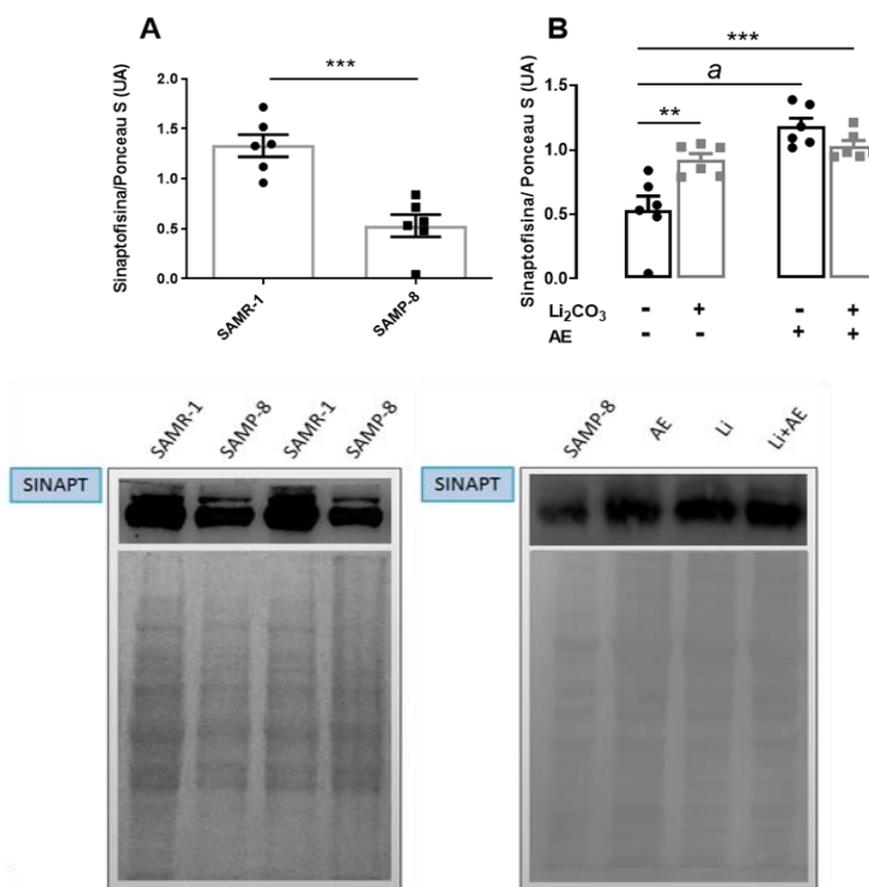
**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão: \*:  $p > 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

## 6.10 Efeitos dos tratamentos para a densidade de terminais sinápticos

Na avaliação da densidade de terminais sinápticos foi observado que os animais SAMP-8 apresentaram uma menor densidade de sinaptofisina em relação aos animais SAMR-1 (58,65%,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 10A). Os tratamentos mantiveram a densidade de terminais sinápticos, pois foi observado aumento significativo da densidade de sinaptofisina em Li (2,24 vezes,  $p < 0,01$ ), AE (1,73 vezes,  $p < 0,0001$ )

e Li+AE (1,94 vezes,  $p < 0,001$ ) em relação aos animais do grupo controle (Gráfico 10B). Não houve diferença entre os tratamentos.

**Gráfico 10.** Comparação da densidade de terminais sinápticos em hipocampo.



**A)** Comparação entre as linhagens SAMR-1 e SAMP-8. **B)** Comparação entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais SAMP-8. Os símbolos e barras verticais são as médias  $\pm$  erros-padrão:  $p > 0,01$ ,  $a$ :  $p < 0,0001$ ,  $***$ :  $p < 0,001$ .

## 7. Discussão

Com o aumento da longevidade devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, a preocupação com uma velhice bem-sucedida vem se mostrando cada vez mais presente na sociedade. O aumento da longevidade, entretanto, leva ao aumento da probabilidade de surgimento de doenças que acometem essa faixa

etária, entre elas a Doença de Alzheimer, sendo que seu efeito mais comum são respostas cognitivas desadaptadas (LUZARDO et al., 2006).

Atualmente existem diversas tentativas farmacológicas de tratamento para essa doença, mas devido aos diversos efeitos colaterais é fundamental a busca de tratamentos alternativos (ORESTES et al., 2005). Nunes e colaboradores em 2007, observaram que pacientes com DA tratados cronicamente com lítio, combinado com anticolinesterásicos, apresentaram um menor declínio cognitivo do que os que realizavam os tratamentos clássicos. Corroborando com esses achados, nosso grupo de pesquisa também demonstrou que o lítio em baixa dosagem estabilizou a memória de pacientes com DA (NUNES et al., 2013) e alterou as características neuropatológicas de um modelo murino de DA (NUNES et al., 2015). Além disso, nosso grupo também demonstrou que o ambiente enriquecido pode causar uma melhora da memória espacial de camundongos com envelhecimento natural (BARALDI et al., 2013) ou transgênicos para a DA (BALTHAZAR et al., 2018).

Mais recentemente (MALERBA, 2017) demonstramos que animais SAMP-8 (com envelhecimento acelerado) apresentaram pior capacidade de memorização do que os animais SAMR-1. Em relação aos grupos SAMP-8 submetidos aos diferentes tratamentos, foi possível observar o efeito benéfico relacionado à manutenção da memória em todas as estratégias a que foram submetidos, pois os animais permaneceram mais tempo no quadrante correto no labirinto de Barnes, mostrando a efetividade do lítio na manutenção da memória (NUNES et al., 2013) e do ambiente enriquecido (KONDO et al., 2016). Em relação aos grupos SAMP-8 tratados foi possível observar a manutenção da memória, pois os animais permaneceram mais tempo no quadrante certo no labirinto de Barnes, confirmando a efetividade do lítio na manutenção da memória, verificada em trabalho anterior (NUNES et al., 2015) e do ambiente enriquecido (BARALDI et al., 2013) e do tratamento combinado, se mostrando eficaz para a manutenção da memória, assim com os tratamentos individuais.

O tratamento combinado, assim como os outros tratamentos propostos, também demonstrou ser efetivo na estabilização da memórias dos animais SAMP-8, sendo uma estratégia eficaz para manutenção da memória.

Sabe-se que a ansiedade influencia o processo de memorização e a manutenção da memória em longo prazo (MORAN, 2016). Nos ensaios para verificar se os tratamentos propostos tiveram influência na ansiedade, foi observado que os animais SAMP-8 apresentaram maior nível de ansiedade do que os animais SAMR-1 devido ao fato de permanecerem menos tempo nos braços abertos do que os animais SAMR-1. Comportamento semelhante foi observado anteriormente e pode estar relacionado ao fato de que os animais SAMP-8 demonstram uma maior atividade ao serem apresentados a novos estímulos ambientais e demonstram, devido a presença de cores, formas e objetos aos quais não estão habituados, maior ansiedade do que os SAMR-1 (BRANDEWIEDE et al., 2005). Além dos fatores ambientais, o aumento da idade desses camundongos influencia diretamente no aumento da ansiedade, sendo a idade um fator determinante para esse comportamento (CHEN et al., 2007).

Mesmo não havendo diferença entre os grupos tratados e o grupo controle em relação ao tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, foi observado que os animais tratados com lítio ou submetidos ao tratamento combinado, apresentaram maior número de entradas nos braços abertos, mostrando-se mais dispostos à exposição de ambientes não conhecidos. Indicando que os animais tratados possuem menos ansiedade comparados aos animais do grupo controle. A diminuição da ansiedade com o tratamento com íons de lítio foi observada anteriormente por nosso grupo (NUNES et al., 2015) tanto em animais transgênicos para a doença de Alzheimer quanto em camundongos C57Bl/6. Outros grupos também demonstraram esse efeito (SANTOS et al., 2003).

Da mesma forma, o ambiente enriquecido além de melhorar a memória, também promoveu diminuição da ansiedade, assim como observado em animais transgênicos para DA (BENAROYA- MILSHTEIN, et al., 2004; PIETROPAOLO et al., 2014). O tratamento combinado também promoveu diminuição da ansiedade desses animais, demonstrando a efetividade de combinação das estratégias.

Além das alterações comportamentais foi possível observar que houve maior densidade de placas senis em animais SAMP-8 em relação aos animais SAMR-1. O acúmulo de placas senis é uma das características neuropatológicas da DA. As placas senis são formadas pela clivagem da proteína precursora do amiloide pela  $\beta$ -secretase na porção extracelular e depois pela  $\gamma$ -secretase na

porção intracelular criando os peptídeos neurotóxicos A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 (JARRET et al., 1993; LaFERLA et al., 2007). Esses oligômeros, antes mesmo de se tornarem altamente neurotóxicos, bloqueiam a potenciação de longa duração (LTP), prejudicando a formação ou manutenção da memória (CHEN et al., 2000). Quando agregados entre os neurônios, também causam morte neuronal, sendo que o peptídeo A $\beta$ 42 é considerado o mais tóxico (LOO, et al., 1993).

Os animais SAMP-8 apresentam aumento de depósito de grânulos do peptídeo A $\beta$ 42 e A $\beta$ 40 com aparente origem neuronal, a partir dos 6 meses de idade, sendo o primeiro encontrado em maior quantidade. O acúmulo desses oligômeros pode ser o motivo pela neurodegeneração progressiva desses animais (MANICH et al., 2011, SOREGHAN et al., 1994, NIE et al., 2011). No presente estudo também foi verificada a presença de placas senis nos animais SAMR-1 aos 10 meses de idade. Jaume e colaboradores (2010) demonstraram que após os 9 meses de idade, os animais SAMR-1, mesmo sem apresentar déficits cognitivos, apresentavam depósito desse peptídeo no hipocampo. Em seres humanos, apesar de o grande depósito de placas senis estar relacionado ao diagnóstico da DA, idosos com envelhecimento normal apresentam depósito de  $\beta$ -amiloide no cérebro, porém são assintomáticos, ou seja, não apresentam déficits de memória (AIZENSTEIN et al., 2008). Visto que os animais SAMR-1, apresentaram melhor desempenho nos testes de memória e menor quantidade de placas comparados aos animais SAMP-8 da mesma idade, o depósito de placas nesses animais seria natural do envelhecimento.

Com relação aos tratamentos realizados em animais SAMP-8, foi observado que todos promoveram diminuição da quantidade de placas senis. Como visto em camundongos transgênicos, o lítio promoveu diminuição na formação de placas no hipocampo (NUNES et al., 2015) e o mesmo foi observado em animais transgênicos para DA expostos ao ambiente enriquecido (BALTHAZAR et al., 2018). O tratamento combinado demonstrou ser mais efetivo na diminuição de placas senis em relação aos animais tratados individualmente na região hipocampal. Logo, todos os tratamentos promoveram diminuição de placas senis no hipocampo de animais SAMP-8, evitando a disfunção neuronal devido à perda de neurônios e diminuição dos contatos sinápticos, evitando o déficit na constituição e evocação de memórias (ROSENZWEIG e BARNES, 2003).

Os animais SAMP-8 também apresentaram maior grau de neurodegeneração no GD, Ca1 e Ca3 em relação aos animais SAMR-1. Além disso, houve diminuição significativa na densidade de neurônios no giro denteado, Ca1 e Ca3 em relação aos animais SAMR-1. Esses fatos podem ser relacionados ao aumento de placas senis nas regiões hipocâmpicas estudadas. A presença de placas, principalmente do subtipo A $\beta$ 42, promove grande neurotoxicidade, induzindo à neurodegeneração (PIKE et al., 1993, OAKLEY et al., 2006) e aumentando a perda neuronal conforme o aumento de sua densidade (YANKNER et al., 1990, KAKU et al., 2003). Os tratamentos individuais com lítio e AE promoveram aumento na densidade neuronal no GD, Ca1 e Ca3 e diminuição da neurodegeneração no GD, Ca1 e Ca3 quando comparados às amostras de animais SAMP-8 não tratados. Essas observações estão de acordo com a literatura, uma vez que já foi demonstrado que o enriquecimento ambiental de animais SAMP-8 de 2 meses e animais transgênicos para a DA promoveu redução da perda neuronal (AKIGUCHI et al., 2017, GRIÑAN-FERRÉ et al., 2016, NICOLETTA et al., 2007). O lítio também promoveu efeito neuroprotetor nas regiões do GD, Ca1 e Ca3, reduzindo a densidade de neurodegeneração e aumento da densidade neuronal. Animais C57Bl/6 com neurodegeneração induzida e animais transgênicos para a doença de Alzheimer, quando tratados com lítio, apresentaram aumento da densidade neuronal (RELAÑO-GINÉS et al., 2018, NUNES et al., 2015). Nos animais submetidos ao tratamento combinado foi observado aumento na densidade de neurônios e diminuição da neurodegeneração em relação aos animais controle na região do GD, Ca e Ca3, porém não se demonstrou mais efetivo do que os tratamentos propostos individualmente.

A manutenção da densidade de neurônios e diminuição da neurodegeneração em região do GD é fundamental para a manutenção da LTP e formação da memória espacial, já que essa região está muito relacionada com esse tipo de memória (McNAMARA e SKELTON, 1993). A diminuição da neurodegeneração e manutenção da densidade neuronal das células piramidais na região do Ca1 é fundamental para reserva cognitiva, visto que auxilia na formação de novas memórias e possui papel fundamental na evocação de memórias já existentes (HUERTA et al., 2000). Por fim, a manutenção neuronal

em Ca<sup>3</sup> é importante devido ao fato de essa região ser fundamental para a codificação de novas informações (NAKAZAWA et al., 2003), demonstrando sua influência sobre a reserva cognitiva desses animais.

Neste trabalho também foram analisadas alterações moleculares em um sistema fundamental para a plasticidade sináptica, aprendizado e memória: o sistema glutamatérgico. Dentre os diversos subtipos dos receptores NMDA o subtipo NMDA-R2B, é fundamental para a estabilização sináptica principalmente durante a maturação neuronal (GROC et al., 2006). Estudos recentes vêm demonstrando que esse subtipo de receptor é responsável pelo aumento da excitotoxicidade em pacientes de DA, pois a grande quantidade de placas beta-amilóide no hipocampo induz à substituição da subunidade Glu-N2A por Glu-N2B permitindo que ele migre para regiões extra-sinápticas devido à sua ligação do receptor com SAP-102, impedindo que ele seja internalizado para endocitose promovendo apoptose neuronal (PARSONS e RAYMOND, 2014; ZHANG et al., 2016; BADING et al., 2017). Mesmo os animais SAMP-8 apresentando uma maior densidade de placas beta-amilóide do que os animais SAMR-1 a densidade desses receptores foi a mesma entre as linhagens. Quando os animais SAMP-8 foram submetidos aos diferentes tratamentos também não foi observada nenhuma alteração na densidade do receptor NMDA-R2B. Nesse caso uma possível explicação é que a densidade desses receptores se manteve a mesma em todos os grupos, porém essa subunidade do receptor NMDA esteja com a expressão reduzida na superfície de neurônios (SYNDER et al., 2005) e aumentada na região extra-sináptica (PARSONS e RAYMOND, 2014; ZHANG et al., 2016; BADING et al., 2017) nos animais SAMP-8 sem tratamento, devido a alta densidade de placas beta-amilóide, como demonstrado anteriormente.

Além dos receptores NMDA-2B também foi analisada a densidade de receptores AMPA, que são fundamentais para que ocorra a neurotransmissão excitatória nos neurônios (BREDT et al, 2003). Normalmente esses receptores são expressos transitoriamente conforme a necessidade fisiológica e são predominantemente não permeáveis ao cálcio, porém em situações específicas essa permeabilidade é fundamental principalmente para a transmissão sináptica (WHITEHEAD et al., 2017). Em cultura primária de hipocampo, foi observado que o tratamento com A $\beta$  induz ao aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup>, em neurônios com

canais AMPA GluR2/3 (ZHAO et al., 2010), logo, uma possível hipótese é que há uma expressão anormal de receptores AMPA permeáveis a  $Ca^{2+}$  causando um influxo intracelular excessivo desse íons promovendo disfunção sináptica e neurodegeneração (WHITHEAD et al., 2017). Neste trabalho os animais SAMP-8 apresentaram maior densidade de receptores AMPA em relação aos animais SAMR-1. O mesmo foi observado em pacientes com DA, pois houve aumento na densidade de receptores AMPA, enquanto não foram observadas alterações nos receptores NMDA (MARCELLO et al., 2012), o aumento do receptor AMPA também foi observado em camundongos transgênicos para DA (MEGILL et al., 2015), fortalecendo a hipótese de que o aumento da densidade desses receptores pode promover neurodegeneração, uma vez que neste trabalho também foi demonstrado aumento de neurônios em processo de neurodegeneração dos animais SAMP-8, comparados aos animais SAMR-1. Quando tratados, os animais SAMP-8 não apresentaram alteração na densidade dos receptores AMPA. Com esses resultados podemos supor que o tratamento possa ter estabilizado os níveis de expressão dos receptores AMPA, principalmente os com a subunidade GluR2, visto que houve diminuição de placas beta-amilóide desses animais e redução da neurodegeneração no hipocampo quando comparados aos animais SAMP-8 sem tratamento.

A proteína calmodulina quinase dependente de cálcio IV (CAMK IV) é localizada no núcleo celular e possui papel fundamental no processo de formação de memória e aprendizado através da indução da LTP por promover a fosforilação do resíduo ser-133 do CREB durante a estimulação sináptica que leva à ativação de genes dependentes de CREB como o BDNF (WANG et al., 2017; KIMURA et al., 2017). Na DA há diminuição da densidade dessa proteína, o que foi relacionado ao déficit na retenção da memória espacial e diminuição da plasticidade sináptica (ARRAZOLA et al., 2009; KANG et al., 2001). Neste trabalho foi observado que os animais SAMP-8 apresentam uma densidade menor da CAMK IV em relação aos animais SAMR-1. A diminuição dessa proteína sugere a diminuição da LTP inicial (TOMOBE, 2009), justificando o pior desempenho desses animais no teste de Barnes. Já nos animais SAMP-8 tratados foi observado que houve o aumento da densidade dessa proteína em relação aos animais controle. Como observado em camundongos transgênicos para DA, o

enriquecimento ambiental promoveu aumento da CAMK IV, com aumento de pCREB (HU et al., 2013). O mesmo foi observado em células linfoblastos tratadas com lítio que apresentaram aumento da densidade de pCREB (ALDA et al., 2013). O tratamento combinado não demonstrou ser mais eficaz do que os tratamentos propostos individualmente, porém também demonstrou eficácia ao promover aumento da densidade de CAMK IV.

A ativação de CAMK IV irá promover a produção de BDNF que é responsável pela neurogênese e regulação da transmissão sináptica, logo, fundamental para a plasticidade sináptica (ZHANG et al., 2018; BRAMHAN et al., 2005). Em pacientes com DA ocorre diminuição da produção de BDNF (LASKE et al., 2006). No presente trabalho, foram encontrados níveis menores de BDNF em amostras de hipocampo de animais SAMP-8, em relação às amostras de animais SAMR-1. Resultados semelhantes foram descritos por Chan e colaboradores (2017), que observaram redução da concentração de BDNF dos animais com envelhecimento acelerado quando comparados aos animais com envelhecimento normal. Em nosso estudo, quando submetidos aos diferentes tratamentos, os animais SAMP-8 apresentaram aumento da concentração de BDNF quando comparados ao grupo sem tratamento, como já demonstrado em animais transgênicos para DA tratados com microdose de lítio (NUNES et al., 2015) e quando colocados em enriquecimento ambiental (BARALDI et al., 2013). O tratamento combinado também foi eficaz, promovendo o aumento de BDNF, porém não demonstrou ser mais eficaz do que os tratamentos propostos individualmente.

Para completar a análise sobre a influência dos tratamentos sobre a manutenção da estrutura neuronal, a densidade da proteína sinaptofisina foi verificada. A proteína sinaptofisina é encontrada em vesículas pré-sinápticas neuronais, estando assim relacionada com a formação de vesículas sinápticas no cérebro, podendo ser utilizada para analisar a densidade de sinapses da região (VALVORTA et al., 2004, WIEDENMANN et al., 1985). Na DA, é observado que há diminuição dessa proteína, inibindo assim, a liberação de neurotransmissores e a plasticidade sináptica, sendo esse um dos motivos que contribuem para o declínio cognitivo apresentado na doença (SZE et al., 1997, ADAMS et al., 2017). Neste trabalho foi observado que os animais SAMP-8 apresentaram diminuição de

sinaptofisina em relação aos animais SAMR-1. A redução da densidade de sinaptofisina está relacionada com a baixa capacidade desses animais de aprendizagem e memória (CHENGET al., 2011), visto que os animais SAMP-8 apresentaram piora da memória com o passar do tempo quando comparados aos animais SAMR-1. Ao serem submetidos aos tratamentos, os animais SAMP-8 tratados com lítio demonstraram aumento dessa proteína, comprovando, assim, seu efeito em relação ao aumento de sinapses no hipocampo (CALSON et al., 2017). Já quando expostos ao ambiente enriquecido, houve aumento dessa proteína em animais SAMP-8, mostrando que somente a exposição a esse estímulo também pode prevenir a diminuição da densidade sináptica (GIACOBBO et al., 2019). O tratamento combinado ao longo do envelhecimento promoveu aumento da densidade de sinaptofisina em relação aos animais controle, mostrando que também possui efeito protetor, assim com os tratamentos propostos individualmente.

Em complementação, foi verificado em análise da densidade de astrócitos feita com marcação com GFAP que não houve diferença entre os grupos SAMR-1 e SAMP-8. Da mesma forma, os tratamentos não alteraram a densidade desse marcador. Não se pode dizer, entretanto, que os tratamentos podem ou não influenciar a função dessas células, o que poderá ser explorado em um trabalho futuro.

## **8. Considerações finais**

Em conclusão, todos os tratamentos promoveram manutenção da memória e diminuição do comportamento ansioso. Também promoveram neuroproteção através da diminuição da densidade de placas beta-amilóide no hipocampo desses animais, manutenção da densidade de NeuN e redução da neurodegeneração em diferentes regiões do hipocampo. Mesmo não sendo observada alteração na densidade de receptores NMDA e AMPA, o aumento da densidade de CAMKIV, e sinaptofisina e da concentração de BDNF demonstra que todos os tratamentos promoveram alterações moleculares benéficas para a promoção da neuroplasticidade. A efetividade do tratamento combinado foi comprovada, como proposto no projeto, porém não se demonstrou mais efetivo do que os tratamentos realizados individualmente. Visto que o enriquecimento

ambiental e o lítio são benéficos para outros fatores fisiológicos além do neurológico, a combinação ou as estratégias propostas individualmente se mostram favoráveis para a promoção do envelhecimento bem sucedido como um todo.

## 9. Referências Bibliográficas

ADAMS, D. J. et al. Synaptophysin is a  $\beta$ -Amyloid Target that Regulates Synaptic Plasticity and Seizure Susceptibility in an Alzheimer's Model. 2017-04-24 2017.

Available at: < <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/129551v1.abstract> >.

AHMED, O. J.; MEHTA, M. R. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 6, p. 329-38, Jun 2009. ISSN 0166-2236.

Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.009> >.

AIZENSTEIN, H. J. et al. Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 11, p. 1509-1517, 2008. ISSN 0003-9942. Available at:

< [https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/articlepdf/1107509/noc80049\\_1509\\_1517.pdf](https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/articlepdf/1107509/noc80049_1509_1517.pdf) >.

AKIGUCHI, I. et al. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. **Neuropathology**, v. 37, n. 4, p. 293-305, Aug 2017. ISSN 0919-6544.

Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/neup.12373> >.

ALDA, M. et al. Alterations in phosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB) signaling: an endophenotype of lithium-responsive bipolar disorder? **Bipolar Disord**, v. 15, n. 8, p. 824-31, Dec 2013. ISSN 1398-5647.

Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/bdi.12131> >.

ALKADHI, K. A.; DAO, A. T. Effect of Exercise and Abeta Protein Infusion on Long-Term Memory-Related Signaling Molecules in Hippocampal Areas. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 7, p. 4980-4987, Jul 2019. ISSN 0893-7648. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1425-x> >.

ALMEIDA, E. B. D. et al. Gerontology: practice, knowledge and the birth of a new professional field. **15**, 2013-11-22 2013. Available at:

< <https://revistas.pucsp.br/kairos/article/view/17318/0> >.

ALVAREZ, G. et al. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. **FEBS Lett**, v. 453, n. 3, p. 260-4, Jun 25 1999. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00685-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00685-7) >.

AMARAL, D. G.; DENT, J. A. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. **J Comp Neurol**, v. 195, n. 1, p. 51-86, Jan 1 1981. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901950106> >.

ANDRADE NUNES, M.; ARAUJO VIEL, T.; SOUSA BUCK, H. Microdose Lithium Treatment Stabilized Cognitive Impairment in Patients with Alzheimer's Disease. 2013 2013. Available at:

< <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/car/2013/00000010/00000001/art00014> >.

BADING, H. Therapeutic targeting of the pathological triad of extrasynaptic NMDA receptor signaling in neurodegenerations. **J Exp Med**, v. 214, n. 3, p. 569-578, Mar 6 2017. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20161673> >.

BALTHAZAR, J. et al. Enriched Environment Significantly Reduced Senile Plaques in a Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease, Improving Memory. **Front Aging Neurosci**, v. 10, 2018. ISSN 1663-4365 (Electronic). Available at:

< <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2018.00288> >.

BARALDI, T. et al. Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 8, p. 831-8, Aug 2013. ISSN 0531-5565. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.05.055> >.

BARTSCH, T. et al. CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness. **Proc**

**Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 42, p. 17562-7, Oct 18 2011. ISSN 0027-8424.  
Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1110266108> >.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 5, p. 1341-7, Sep 2004. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x.  
Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x> >.

BENNETT, I. J.; STARK, S. M.; STARK, C. E. L. Recognition Memory Dysfunction Relates to Hippocampal Subfield Volume: A Study of Cognitively Normal and Mildly Impaired Older Adults. **J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci**, v. 74, n. 7, p. 1132-1141, Sep 15 2019. ISSN 1079-5014. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1093/geronb/gbx181> >.

BLACKSTAD, T. W. et al. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. **J Comp Neurol**, v. 138, n. 4, p. 433-49, Apr 1970. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901380404> >.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31-9, Jan 7 1993. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1038/361031a0> >.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 99-125, Jun 2005a. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.003> >.

BRANDEWIEDE, J.; SCHACHNER, M.; MORELLINI, F. Ethological analysis of the senescence-accelerated P/8 mouse. **Behav Brain Res**, v. 158, n. 1, p. 109-21, Mar 7 2005. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2004.08.012> >.

BREDDT, D. S.; NICOLL, R. A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 361-79, Oct 9 2003. ISSN 0896-6273

(Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00640-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00640-8) >.

BRILLAUD, E.; MORILLION, D.; DE SEZE, R. Modest environmental enrichment: effect on a radial maze validation and well being of rats. **Brain Res**, v. 1054, n. 2, p. 174-82, Aug 30 2005. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.069> >.

BUCKMASTER, P. S.; SCHWARTZKROIN, P. A. Hippocampal mossy cell function: a speculative view. **Hippocampus**, v. 4, n. 4, p. 393-402, Aug 1994. ISSN 1050-9631 (Print)1050-9631. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.450040402> >.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 625-41, Aug 15 2002. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00830-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00830-9) >.

CARLSON, S. W.; YAN, H.; DIXON, C. E. Lithium increases hippocampal SNARE protein abundance after traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 289, p. 55-63, Mar 2017a. ISSN 0014-4886. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.12.006> >.

CASTRO, C. D. P. N.; GIL-MOHAPEL, J.; BROCARD, P. S. EXERCÍCIO FÍSICO E NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL: REVISÃO DE LITERATURA. **29**, 2017-12-23 2017. Available at: < <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/7461> >.

CHALECKA-FRANASZEK, E.; CHUANG, D. M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, 1999a. p.8745-50. ISBN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic).

CHAN, C.-H. et al. Age-Related Decrease of Neurotransmitters in Senescence-Accelerated-8 Mice. 2017-04-01 2017. Available at: < [https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.645.20](https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.645.20) >.

CHEN, Q. S. et al. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. **J Neurosci Res**, v. 60, n. 1, p. 65-72, Apr 1 2000a. ISSN 0360-4012 (Print)0360-4012. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(20000401\)60:1<65::aid-jnr7>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(20000401)60:1<65::aid-jnr7>3.0.co) >.

CHENG, X. R. et al. Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, n. 3, p. 361-75, Mar 2011. ISSN 1074-7427. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.01.010> >.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v. 129, n. Pt 7, p. 1659-73, Jul 2006. ISSN 0006-8950. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl082> >.

CUI, H. et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. **J Neurosci**, v. 27, n. 37, p. 9901-15, Sep 12 2007. ISSN 0270-6474. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1464-07.2007> >.

DAUMAS, S. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 supports the involvement of the hippocampal mossy fiber pathway on contextual fear memory consolidation. **Learn Mem**, v. 16, n. 8, p. 504-7, Aug 2009. ISSN 1072-0502. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1418309> >.

DEL VALLE, J. et al. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. **J Alzheimers Dis**, v. 19, n. 4, p. 1303-15, 2010. ISSN 1387-2877. Available at: < <http://dx.doi.org/10.3233/jad-2010-1321> >.

DIXIT, R. et al. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1086-9, Feb 22 2008. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1152993> >.

DOUGLAS, R. M.; GODDARD, G. V. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 86, n. 2, p. 205-15, Mar 21 1975. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90697-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(75)90697-6) >.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N. J. The hippocampus--what does it do? **Behav Neural Biol**, v. 57, n. 1, p. 2-36, Jan 1992. ISSN 0163-1047 (Print)0163-1047. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90724-i](http://dx.doi.org/10.1016/0163-1047(92)90724-i) >.

EMPSON, R. M.; HEINEMANN, U. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. **J Physiol**, v. 484, n. Pt 3, p. 707-20, May 1 1995. ISSN 0022-3751 (Print)1469-7793 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

FARR, S. A. et al. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. **J Neurochem**, v. 84, n. 5, p. 1173-83, Mar 2003. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01580.x> >.

FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. **Neuron**, v. 25, n. 1, p. 11-4, Jan 2000. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80866-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80866-1) >.

FORLENZA, O. V. et al. Does lithium prevent Alzheimer's disease? **Drugs Aging**, v. 29, n. 5, p. 335-42, May 1 2012. ISSN 1170-229x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.2165/11599180-000000000-00000> >.

FORSELL, Y.; PALMER, K.; FRATIGLIONI, L. Psychiatric symptoms/syndromes in elderly persons with mild cognitive impairment. Data from a cross-sectional study. **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 179, p. 25-8, 2003. ISSN 0065-1427 (Print)0065-1427. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0404.107.s179.4.x> >.

FRANCE, G. et al. Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 112, n. Pt A, p. 76-83, Jan 2017. ISSN 0028-3908. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.010> >.

FRANKLIN, K.B.J; PAXINOS, G. The mouse brain: in stereotaxic coordinates. 3<sup>a</sup> edition. New York: Elsevier, 2008.

FRELAND, L.; BEAULIEU, J. M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. **Front Mol Neurosci**, v. 5, p. 14, Jan 27 2012. ISSN 1662-5099. Available at: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2012.00014> >.

G, M. et al. Characterization of amyloid- $\beta$  granules in the hippocampus of SAMP8 mice. **Journal of Alzheimer's Disease : JAD**, v. 25, n. 3, p. 535-546, 2020. ISSN 1875-8908. Available at: < <https://europepmc.org/article/med/21460438> >.

GARTHE, A.; ROEDER, I.; KEMPERMANN, G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. In: (Ed.). **Hippocampus**, v.26, 2016. p.261-71. ISBN 1050-9631 (Print)1098-1063 (Electronic).

GIACOBBO, B. L. et al. Long-term environmental modifications affect BDNF concentrations in rat hippocampus, but not in serum. **Behavioural brain research**, v. 372, p. 111965, 2019. Available at:< <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111965> >.

GREER, P. L.; GREENBERG, M. E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 846-60, Sep 25 2008. ISSN 0896-6273. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002> >.

GRINAN-FERRE, C. et al. Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8). **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 4, p. 2435-50, May 2016. ISSN 0893-7648. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9210-6> >.

GRIÑÁN-FERRÉ, C. et al. Understanding Epigenetics in the Neurodegeneration of Alzheimer's Disease: SAMP8 Mouse Model. In: (Ed.). **J Alzheimers Dis**, v.62 p.943-63. ISBN 1387-2877 (Print)1875-8908 (Electronic).

GROC, L. et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 49, p. 18769-74, Dec 5 2006. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605238103> >.

HARRIS, K. M.; STEVENS, J. K. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. **J Neurosci**, v. 9, n. 8, p. 2982-97, Aug 1989. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

HU, Y. S. et al. Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3beta, neurotrophin-3 and CREB signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64460, 2013a. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064460> >.

HUERTA, P. T. et al. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 473-80, Feb 2000. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80909-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80909-5) >.

JANKOWSKY, J. L. et al. Environmental Enrichment Mitigates Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. 2005-05-25 2005. Available at: < <https://www.jneurosci.org/content/25/21/5217.short> >.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T., JR. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4693-7, May 11 1993. ISSN 0006-2960 (Print)0006-2960. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi00069a001> >.

JAY, T. M.; WITTER, M. P. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **J Comp Neurol**, v. 313, n. 4, p. 574-86, Nov 22 1991. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903130404> >.

JENSEN, O.; LISMAN, J. E. Hippocampal CA3 region predicts memory sequences: accounting for the phase precession of place cells. **Learn Mem**, v. 3, n. 2-3, p. 279-87, Sep-Oct 1996. ISSN 1072-0502 (Print)1072-0502. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1101/lm.3.2-3.279> >.

JONES, R. S. Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 2, p. 58-64, Feb 1993. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90018-h](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(93)90018-h) >.

JOPE, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 441-3, Sep 2003. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147\(03\)00206-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147(03)00206-2) >.

KAKU, M. et al. Amyloid beta protein deposition and neuron loss in osteopetrotic (op/op) mice. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 12, n. 2, p. 104-8, Oct 2003. ISSN 1385-299X (Print)1385-299x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresprot.2003.09.001> >.

KANG, H. et al. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 771-83, Sep 21 2001. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00497-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00497-4) >.

KESNER, R. P. A behavioral analysis of dentate gyrus function. **Prog Brain Res**, v. 163, p. 567-76, 2007. ISSN 0079-6123 (Print)0079-6123. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123\(07\)63030-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(07)63030-1) >.

KNEISLER, T. B.; DINGLELINE, R. Synaptic input from CA3 pyramidal cells to dentate basket cells in rat hippocampus. **J Physiol**, v. 487, n. 1, p. 125-46, Aug 15 1995a. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020866> >.

KOKUBO, M. et al. BDNF-Mediated Cerebellar Granule Cell Development Is Impaired in Mice Null for CaMKK2 or CaMKIV. 2009-07-15 2009. Available at: < <https://www.jneurosci.org/content/29/28/8901> >.

KONDO, H. et al. O comprometimento da memória espacial dependente do hipocampo devido à perda do dente molar é amenizado por um ambiente enriquecido. **Arch Oral Biol**, v. 61, p. 1-7, janeiro de

2016. ISSN 1879-1506. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476746> >.

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. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 9-12, May 6 2004. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.001> >.

KROPFF, E. et al. Speed cells in the medial entorhinal cortex. **Nature**, v. 523, n. 7561, p. 419-24, Jul 23 2015. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature14622> >.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 499-509, Jul 2007. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2168> >.

LASKE, C. et al. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 113, n. 9, p. 1217-24, Sep 2006. ISSN 0300-9564 (Print)0300-9564. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-005-0397-y> >.

LAZAROV, O. et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 701-13, Mar 11 2005. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.015> >.

LEAL, G. et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. **Brain Res**, v. 1621, p. 82-101, Sep 24 2015. ISSN 0006-8993. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.019> >.

LEUTGEB, J. K. et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 961-6, Feb 16 2007. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1135801> >.

LIMA, D. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **7**, 2014-04-03 2014a. Available at: < <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/9284> >.

LISMAN, J. E. Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. **Neuron**, v. 22, n. 2, p. 233-42, Feb 1999. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81085-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81085-5) >.

LISMAN, J. E.; TALAMINI, L. M.; RAFFONE, A. Recall of memory sequences by interaction of the dentate and CA3: a revised model of the phase precession. **Neural Netw**, v. 18, n. 9, p. 1191-201, Nov 2005. ISSN 0893-6080 (Print)0893-6080. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neunet.2005.08.008> >.

LLORENS-MARTIN, M. et al. GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 451-60, Apr 2013. ISSN 1359-4184. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.4> >.

LOO, D. T. et al. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 17, p. 7951-5, Sep 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)1091-6490 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

MARCELLO, E. et al. Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. 2013-06-03 2013. Available at: < <https://www.jci.org/articles/view/65401> >.

MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 8, p. 599-609, Aug 2001. ISSN 1471-0072 (Print)1471-0072. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/35085068> >.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 2, p. 205-16, Apr 1995. ISSN 0959-4388 (Print)0959-4388. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80028-x](http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388(95)80028-x) >.

MCLEAN, C. A. et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, v. 46, n. 6, p. 860-6, Dec 1999. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Available at:

< [http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249\(199912\)46:6<860::aid-ana8>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::aid-ana8>3.0.co) >.

MCNAMARA, R. K.; SKELTON, R. W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 18, n. 1, p. 33-49, Jan-Apr 1993. Available at:

< [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90006-l](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173(93)90006-l) >.

MEDINA, M.; AVILA, J. New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease. **Expert Opin Ther Targets**, v. 18, n. 1, p. 69-77, Jan 2014. ISSN 1472-8222. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2013.843670> >.

MEGIAS, M. et al. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 527-40, 2001. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Available at:

< [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00496-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00496-6) >.

MEGILL, A. et al. Defective Age-Dependent Metaplasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. In: (Ed.). **J Neurosci**, v.35, 2015. p.11346-57. ISBN 0270-6474 (Print)1529-2401 (Electronic).

MILGRAM, N. W. et al. Neuroprotective effects of cognitive enrichment. **Ageing Res Rev**, v. 5, n. 3, p. 354-69, Aug 2006a. ISSN 1568-1637 (Print)1568-1637. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2006.04.004> >.

MONTGOMERY, S. M.; BUZSAKI, G. Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 36, p. 14495-500, Sep 4 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701826104> >.

MORAN, T. P. Anxiety and working memory capacity: A meta-analysis and narrative review. **Psychol Bull**, v. 142, n. 8, p. 831-864, Aug 2016. ISSN 0033-2909. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1037/bul0000051> >.

NABER, P. A.; WITTER, M. P.; LOPES SILVA, F. H. Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. **Ann N Y Acad Sci**, v. 911, p. 392-403, Jun 2000. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06739.x> >.

NAKAZAWA, K. et al. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 305-15, Apr 24 2003. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00165-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00165-x) >.

NICOLL, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation. **Neuron**, v. 93, n. 2, p. 281-290, Jan 18 2017. ISSN 0896-6273. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015> >.

NICOLL, R. A.; KAUER, J. A.; MALENKA, R. C. The current excitement in long-term potentiation. **Neuron**, v. 1, n. 2, p. 97-103, Apr 1988. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90193-6](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(88)90193-6) >.

NUNES, M. A. et al. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142267, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142267> >.

NUNES, P. V.; FORLENZA, O. V.; GATTAZ, W. F. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. **Br J Psychiatry**, v. 190, p. 359-60, Apr 2007. ISSN 0007-1250 (Print)0007-1250. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.bp.106.029868> >.

OAKLEY, H. et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. **J Neurosci**, v. 26, n. 40, p. 10129-40, Oct 4 2006. ISSN 0270-6474. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1202-06.2006> >.

O'LEARY, O. F.; O'CONNOR, R. M.; CRYAN, J. F. Lithium-induced effects on adult hippocampal neurogenesis are topographically segregated along the dorso-ventral axis of stressed mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 247-55, Jan 2012. ISSN 0028-3908. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.015> >.

PARSONS, M. P.; RAYMOND, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 279-93, Apr 16 2014.

ISSN 0896-6273. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.030> >.

PETROSINI, L. et al. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. **Brain Res Rev**, v. 61, n. 2, p. 221-39, Oct 2009.

ISSN 0165-0173. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.07.002> >.

PHIEL, C. J. et al. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 435-9, May 22 2003. ISSN

0028-0836 (Print)0028-0836. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1038/nature01640> >.

PIETROPAOLO, S.; FELDON, J.; YEE, B. K. Environmental enrichment eliminates the anxiety phenotypes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's

disease. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 996-

1008, 2014-02-04 2014. ISSN 1531-135X. Available at:

< <https://link.springer.com/article/10.3758/s13415-014-0253-3> >.

PIKE, C. J. et al. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. **J Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 1676-87, Apr 1993. ISSN

0270-6474 (Print)0270-6474. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

QUIROZ, J. A.; GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Molecular effects of lithium. **Mol Interv**, v. 4, n. 5, p. 259-72, Oct 2004. ISSN 1534-0384. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1124/mi.4.5.6> >.

RELANO-GINES, A. et al. Lithium as a disease-modifying agent for prion diseases. **Transl Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 163, Aug 22 2018. ISSN 2158-3188. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0209-4> >.

ROSENZWEIG, E. S.; BARNES, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 3, p. 143-79, Feb 2003. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00126-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00126-0) >.

RYVES, W. J.; HARWOOD, A. J. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 3, p. 720-5, Jan 26 2001. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.4169> >.

SAITO, S. et al. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. **J Neurosci Res**, v. 39, n. 1, p. 57-62, Sep 1 1994. ISSN 0360-4012 (Print)0360-4012. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490390108> >.

SCHARFMAN, H. Dentate hilar cells with dendrites in the molecular layer have lower thresholds for synaptic activation by perforant path than granule cells. 1991-06-01 1991. Available at: < <https://www.jneurosci.org/content/11/6/1660> >.

SCHARFMAN, H. E. The CA3 "Backprojection" to the Dentate Gyrus. **Prog Brain Res**, v. 163, p. 627-37, 2007. ISSN 0079-6123 (Print). Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123\(07\)63034-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(07)63034-9) >.

SCHARFMAN, H. E.; MYERS, C. E. Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. **Front Neural Circuits**, v. 6, p. 106, 2012. ISSN 1662-5110. Available at: < <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2012.00106> >.

SCHMIDT-HIEBER, C.; JONAS, P.; BISCHOFBERGER, J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 184-7, May 13 2004. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature02553> >.

SCULLIN, C. S.; PARTRIDGE, L. D. Modulation by pregnenolone sulfate of filtering properties in the hippocampal trisynaptic circuit. **Hippocampus**, v. 22, n. 11, p. 2184-98, Nov 2012. ISSN 1050-9631. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22038> >.

SÉE, V. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0106com>, 2001-01-01 2001. Available at:  
< <https://www.fasebj.org/doi/full/10.1096/fj.00-0106com> >.

SERITA, T.; FUKUSHIMA, H.; KIDA, S. Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017-02-14 2017. ISSN 2045-23222045-2322. Available at:  
< <https://www.nature.com/articles/srep42528> >.

SHANKAR, G. M. et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nat Med**, v. 14, n. 8, p. 837-42, Aug 2008. ISSN 1078-8956. Available at:  
< <http://dx.doi.org/10.1038/nm1782> >.

SHARP, P.; GREEN, C. Spatial correlates of firing patterns of single cells in the subiculum of the freely moving rat. 1994-04-01 1994. Available at:  
< <https://www.jneurosci.org/content/14/4/2339.short> >.

SINOFF, G.; WERNER, P. Anxiety disorder and accompanying subjective memory loss in the elderly as a predictor of future cognitive decline. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 951-9, Oct 2003. ISSN 0885-6230 (Print)0885-6230. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/gps.1004> >.

SMITH, M. A.; ELLIS-DAVIES, G. C.; MAGEE, J. C. Mechanism of the distance-dependent scaling of Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. **J Physiol**, v. 548, n. Pt 1, p. 245-58, Apr 1 2003. ISSN 0022-3751 (Print)0022-3751. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2002.036376> >.

SNYDER, E. M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1051-1058, 2005-07-17 2005. ISSN 1546-17261546-1726. Available at:

< <https://www.nature.com/articles/nn1503?proof=trueInJun> >.

SNYDER, J. S. et al. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 843-52, 2005. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.009> >.

SOREGHAN, B.; KOSMOSKI, J.; GLABE, C. Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation., 1994-11-18 1994.

Available at: < <https://www.jbc.org/content/269/46/28551> >.

SORIANO, E.; FROTSCHER, M. Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. **Hippocampus**, v. 4, n. 1, p. 65-9, Feb 1994a. ISSN 1050-9631 (Print)1050-9631. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.450040108> >.

STAFSTROM, C. E. The Role of the Subiculum in Epilepsy and Epileptogenesis. **Epilepsy Curr**, v. 5, n. 4, p. 121-9, Jul 2005. ISSN 1535-7597 (Print)1535-7511 (Electronic). Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1535-7511.2005.00049.x> >.

STEWART, O.; SCOVILLE, S. A. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. **J Comp Neurol**, v. 169, n. 3, p. 347-70, Oct 1 1976. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Available at:

< <http://dx.doi.org/10.1002/cne.901690306> >.

SZE, C. I. et al. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 8, p. 933-44, Aug 1997. ISSN 0022-3069 (Print)0022-3069. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199708000-00011> >.

TABUCHI, A. et al. Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 35920-31, Sep 27 2002. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M204784200> >.

TAKASHIMA, A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 3 Suppl, p. 309-17, 2006. ISSN 1387-2877 (Print)1387-2877. Available at: < <http://dx.doi.org/10.3233/jad-2006-9s335> >.

TAKEDA, T. et al. A new murine model of accelerated senescence. **Mech Ageing Dev**, v. 17, n. 2, p. 183-94, Oct 1981. ISSN 0047-6374 (Print)0047-6374. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374\(81\)90084-1](http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374(81)90084-1) >.

TAKEDA, T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. **Neurochem Res**, v. 34, n. 4, p. 639-59, Apr 2009. ISSN 0364-3190. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-009-9922-y> >.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; HIGUCHI, K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. **J Am Geriatr Soc**, v. 39, n. 9, p. 911-9, Sep 1991. ISSN 0002-8614 (Print)0002-8614. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.1991.tb04460.x> >.

TAKEMOTO-KIMURA, S. et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. **J Neurochem**, v. 141, n. 6, p. 808-818, Jun 2017. ISSN 0022-3042. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14020> >.

TEYLER, T. J.; DISCENNA, P. The role of hippocampus in memory: a hypothesis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, n. 3, p. 377-89, Fall 1985. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90016-8](http://dx.doi.org/10.1016/0149-7634(85)90016-8) >.

TOMOBE, K.; NOMURA, Y. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. **Neurochem Res**, v. 34, n. 4, p. 660-9,

Apr 2009. ISSN 0364-3190. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-009-9923-x> >.

TULVING, E.; MARKOWITSCH, H. J. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 3, p. 198-204, 1998a. ISSN 1050-9631 (Print)1050-9631. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1063\(1998\)8:3<198::aid-hipo2>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(1998)8:3<198::aid-hipo2>3.0.co) >.

VALENZUELA, M. J. Brain reserve and the prevention of dementia. **Curr Opin Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 296-302, May 2008. ISSN 0951-7367 (Print)0951-7367. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1097/YCO.0b013e3282f97b1f> >.

VALTORTA, F. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **Bioessays**, v. 26, n. 4, p. 445-53, Apr 2004. ISSN 0265-9247 (Print)0265-9247. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20012> >.

VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 21 2005. ISSN 0270-6474. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1731-05.2005> >.

VANN, S. D. Re-evaluating the role of the mammillary bodies in memory. **Neuropsychologia**, v. 48, n. 8, p. 2316-27, Jul 2010. ISSN 0028-3932. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.10.019> >.

WALSH, D. M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 535-9, Apr 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/416535a> >.

WANG, J. et al. Storage of passive motion pattern in hippocampal CA1 region depends on CaMKII/CREB signaling pathway in a motion sickness rodent model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017-02-23 2017. ISSN 2045-23222045-2322. Available at: < <https://www.nature.com/articles/srep43385> >.

WHITEHEAD, G. et al. Ca(2+)-permeable AMPA receptor: A new perspective on amyloid-beta mediated pathophysiology of Alzheimer's

disease. **Neuropharmacology**, v. 112, n. Pt A, p. 221-227, Jan 2017. ISSN 0028-3908. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.022> >.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 1017-28, Jul 1985. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80082-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80082-9) >.

WIMO, A.; WINBLAD, B.; JONSSON, L. The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. **Alzheimers Dement**, v. 6, n. 2, p. 98-103, Mar 2010. ISSN 1552-5260. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2010.01.010> >.

WITTER, M. P. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. **Prog Brain Res**, v. 163, p. 43-61, 2007. ISSN 0079-6123 (Print)0079-6123. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123\(07\)63003-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(07)63003-9) >.

WU, Y.; ZHANG, A. Q.; YEW, D. T. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. **Neurochem Int**, v. 46, n. 7, p. 565-74, Jun 2005. ISSN 0197-0186 (Print)0197-0186. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2005.01.002> >.

YANKNER, B. A.; DUFFY, L. K.; KIRSCHNER, D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. **Science**, v. 250, n. 4978, p. 279-82, Oct 12 1990. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.2218531> >.

ZHANG, P. et al. Senolytic therapy alleviates A $\beta$ -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. **Nat Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 719-728, May 2019. ISSN 1097-6256. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0372-9> >.

ZHAO, W. Q. et al. Inhibition of Calcineurin-mediated Endocytosis and  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors Prevents Amyloid

$\beta$  Oligomer-induced Synaptic Disruption. In: (Ed.). **J Biol Chem**, v.285, 2010.  
p.7619-32. ISBN 0021-9258 (Print)1083-351X (Electronic).