

GUILHERME DE SOUZA ABRÃO

**Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao
déficit cognitivo de cães**

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 original

São Paulo
2019

RESUMO

ABRÃO, G. S. Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao déficit cognitivo em cães. 2020. 50 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Durante o processo de envelhecimento pode ocorrer redução de fatores que reforçam a memória, bem como o aumento de fatores que reduzem a manutenção dessa função cognitiva. A caracterização de biomarcadores que indicam o estado cognitivo no processo de envelhecimento é de grande relevância para o diagnóstico e/ou tratamento da disfunção cognitiva. O sistema adenosinérgico desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase cerebral, principalmente através da ação inibitória e facilitatória dos receptores A_1 e A_{2A} , respectivamente. Efeitos mediados por esses receptores controlam a transmissão sináptica basal, a neuroplasticidade cerebral (incluindo a densidade da neurotrofina BDNF) e os processos cognitivos, o que afeta diferentes comportamentos desde a locomoção até o humor. O objetivo do presente estudo foi investigar se os níveis de A_1 , A_{2A} e BDNF no sangue de ratos poderiam ser relacionados à memória e níveis dessas proteínas no cérebro, considerando-as, potencialmente, como biomarcadores periféricos da memória. A mesma relação foi avaliada em cães de companhia, considerando a idade, cognição e níveis sanguíneos dessas proteínas. Para isso, ratos Wistar fêmeas jovens ($n=12$, 3 meses de idade) e velhos ($n=12$, 24 meses de idade) foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para análise das memórias de curta e longa duração. Em seguida, os animais foram anestesiados para extração do hipocampo e sangue. Os cães, de ambos os sexos, foram divididos em jovens ($n=10$, 1-2 anos) e velhos ($n=12$, acima de 10 anos) e o estado cognitivo foi avaliado usando um questionário aplicado aos proprietários (quanto maior a pontuação, pior a memória). O sangue (5 mL) foi coletado por venopunção jugular. A densidade das proteínas relacionadas à memória foi avaliada por western-blotting e ensaio de ELISA. Os dados foram expressos como medianas e intervalos interquartis e analisados pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os ratos velhos apresentaram perda significativa das memórias de curto e longo prazo, quando comparados aos animais jovens. No hipocampo, observou-se aumento significativo na densidade de receptores NMDA-R2B e AMPA2-3-4, pro-BDNF, e redução significativo na densidade de PSD-95, sinaptofisina, pCREB/CREB e CAMKIV nos velhos, comparado aos jovens, demonstrando a relação entre a redução da sinalização molecular da memória e a observação comportamental. Na análise de potenciais biomarcadores nos ratos, foi observada redução significativa de A_1 e BDNF, e aumento significativo de A_{2A} tanto no hipocampo quanto no sangue de velhos, comparado aos jovens, sugerindo que essas proteínas poderiam ser utilizadas como biomarcadores do estado cognitivo dos animais. Em cães velhos, com redução expressiva das funções cognitivas, constatou-se redução significativa de A_1 e BDNF, e aumento significativo de A_{2A} , quando comparado aos jovens, mostrando o mesmo padrão de distribuição em relação à idade, como observado em ratos. Com esse trabalho foi possível mostrar, pela primeira vez, que a alteração dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} e BDNF no envelhecimento está relacionada à perda de memória em ratos e cães. Assim, essas proteínas poderiam ser potenciais biomarcadores do declínio cognitivo e alvos terapêuticos para cães com disfunção cognitiva.

Palavras-chaves: Envelhecimento. Adenosina. Biomarcador. SDCC.

ABSTRACT

ABRÃO, G. S. Characterization of candidate potentials to biomarkers related to the cognitive deficit in dogs. 2020. 50 f. Dissertation (Msc, Master in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

During the aging process a decrease in factors that reinforce memory and an increase in others that reduce this cognitive function may occur. The characterization of biomarkers that indicate the cognitive status in the aging process is of great relevance for diagnosis and/or early treatment of memory loss. The adenosinergic system plays an important role in brain homeostasis, mainly through the inhibitory and facilitatory actions of A_1 and A_{2A} receptors, respectively. Those receptors control basal synaptic transmission, neuroplasticity (including the density of the neurotrophin BDNF) and cognitive process, which affects different behaviors. The aim of this study was to verify if levels of A_1 , A_{2A} and BDNF in the blood of rats can be related to memory and levels of those proteins in the brain, considering them, potentially, as peripheral biomarkers of memory. The same relationship was investigated in companion dogs, considering age, cognition and blood levels of those proteins. For that, young ($n=12$, 3 months old) and old ($n=12$, 24 months old) female Wistar rats were submitted to the novel object recognition test to verify short and long-term memories. After that, they were anesthetized and the hippocampus and blood were extracted. Cognition of young ($n=10$, 1-2 years old) and old ($n=12$, over 10 years old) dogs, both sexes, was evaluated using a questionnaire applied to the dogs owners (the greater the score, the worst the cognition). The blood (5 mL) was collected from the jugular vein. Density of proteins related to memory formation was evaluated by western-blotting and ELISA. Data were expressed as medians and interquartile ranges and compared using Mann-Whitney test ($p<0.05$). Differences were considered significant when $p<0.05$. Old rats presented loss in short and long-term memories, when compared to young. In hippocampus, it was observed a significant increase in the density of NMDA-R2B and AMPA2-3-4 receptors, pro-BDNF, and significant reduction of PSD-95, synaptophysin, pCREB/CREB and CAMKIV in the old animals, when compared to the young, showing the relationship between the reduction of memory signaling and behavior. In the analysis of the potential biomarkers in rats, it was observed a significant reduction in A_1 and BDNF as long as an increase in A_{2A} both in the hippocampus and brain of old animals, when compared to the young, suggesting that those proteins could be taken as biomarkers for the cognitive state. In old dogs, with expressive reduction in cognitive functions, there was a significant decrease in A_1 and BDNF densities and increase in A_{2A} , when compared to the young, showing a similar pattern of distribution related to the age, as observed in rats. This work showed, for the first time, that alteration of A_1 and A_{2A} receptors and the neurotrophin BDNF in the elderly is related to memory loss in both rats and dogs. In this way, those proteins could be considered potentially as biomarkers for the cognitive decline and maybe therapeutic targets for dogs with cognitive dysfunction.

Keywords: Ageing. Adenosine. Biomarker. CCD.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é observado um aumento significativo da expectativa de vida de seres humanos e animais. Esse é claramente um processo ligado à globalização, pois demonstra os avanços em tecnologia, cuidados de saúde e nutrição ao longo do último século, elevando a proporção de humanos e animais idosos na população mundial.

O envelhecimento biológico é composto de um processo de desenvolvimento seguido de comprometimento gradual progressivo da função normal dos tecidos, resultante de muitos eventos moleculares que causam acúmulo de componentes celulares danificados no organismo, incluindo proteínas e DNAs (Head, 2013). Tais eventos moleculares têm sido relacionados tanto ao estresse quanto ao desenvolvimento de demências como à Doença de Alzheimer (DA). Nesse sentido, o estudo das alterações moleculares ao longo do envelhecimento tem sido considerado, de forma extensiva, como importante estratégia para buscar a elucidação dos mecanismos neurobiológicos de doenças comuns à velhice, pois as alterações moleculares apresentam intensa relação com o declínio neurocognitivo nessa fase da vida.

Desse modo, como o aumento da longevidade é acompanhado pela elevação da probabilidade do surgimento de transtornos que causam demências, sobretudo a DA, há uma maior necessidade de investigar candidatos a biomarcadores do comprometimento neurocognitivo, objetivando o diagnóstico precoce e/ou novos alvos terapêuticos.

1.1 Longevidade em cães

Atualmente, com os avanços em tecnologia, cuidados de saúde e nutrição, é observado um aumento significativo da expectativa de vida de seres humanos e animais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a proporção de pessoas com mais de 60 anos está aumentando e espera-se atingir 22% da população mundial em 2050. Embora não haja relatos dessa projeção na Medicina Veterinária, observa-se elevada semelhança com cães e gatos na rotina clínica veterinária, tornando doenças ligadas ao envelhecimento mais evidentes.

A longevidade e a mortalidade do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) estão ligadas à morfologia corporal, o que é extremamente variável, pois a espécie exibe uma imensa diversidade morfológica, variando de 1 kg para o Chihuahua a 85 kg para o Mastiff. Diante desta perspectiva, achados revelam que o tamanho do corpo

dos cães é inversamente proporcional à longevidade, indicando que os cães de pequeno porte apresentam maior longevidade em relação aos cães de médio e grande porte (Patronek et al., 1997). Devido a isso, a estimativa da longevidade canina varia entre 6 e 16 anos, dependendo da população analisada. Por exemplo, a média estimada para o Border collie é de 13 anos contrastando com a do Dogue Alemão, que é de 6,5 a 8,5 anos (O'Neill et al., 2013). As razões para essas diferenças são bastante variadas.

Estudos sugerem que existem relações com os efeitos do estresse oxidativo ao longo da vida, pois em cérebros de cães velhos de grande porte a geração de grupos carbonilas aumenta de acordo com a idade, sendo associada com baixas atividades endógenas da glutamina sintetase e superóxido dismutase, aumentando o dano oxidativo ao DNA ou ao RNA, o que pode reduzir a longevidade desses animais (Head, 2013). Além disso, uma abordagem genômica envolvendo o telômero (extremidade livre dos cromossomos formada por sequências repetidas de DNA, cuja função é garantir que cada ciclo de replicação seja completado) mostrou que o encurtamento dessas estruturas nos cães é fortemente consistente com a raça e extensão da longevidade, pois o estresse oxidativo e a incapacidade da DNA polimerase de replicar as extremidades das moléculas do DNA desempenham papéis importantes na perda de telômeros em diferentes espécies (Epel et al., 2004). Quando suficientemente curtos, como visto no Dogue Alemão, com cerca de 11 pares de base e que apresenta longevidade média de 6,9 anos, os telômeros iniciam uma resposta ao estresse resultando em um rápido envelhecimento celular (Fick et al., 2012; van Deursen, 2014). Nesse mesmo estudo, foi observado que a taxa média da perda de telômero com a idade (360 pares de base/ano) nos cães é muito maior do que a observada em humanos (20-40 pares de base/ano), esclarecendo a diferença da longevidade entre as espécies (Fick et al., 2012) e indicando a relevância de estudar animais do mesmo porte.

A rapidez com que os cães envelhecem, em relação aos seres humanos, é um fator vantajoso quando se trata de investigar os mecanismos biológicos do envelhecimento, já que as mudanças relacionadas à idade podem ser avaliadas em um período de tempo muito mais curto (Gilmore; Geer, 2015). Embora não seja uma equivalência perfeita, usando modelos lineares é estimado que cinco anos e meio a sete anos em seres humanos equivale aproximadamente a um ano de vida de um Beagle. Além disso, para serem considerados velhos, os cães devem possuir mais

de nove anos de idade, que representam humanos entre 66-96 anos. Usando esses mesmos modelos, outros autores consideram cães com idade média entre cinco a nove anos (aproximadamente entre 40-60 anos em seres humanos) e jovens abaixo de cinco anos (inferior a 40 anos em humanos) (Patronek, et al., 1997). Dessa maneira, estudos comparáveis do envelhecimento de cães podem ser realizados de sete a dez vezes mais rapidamente do que em seres humanos, propiciando um estudo translacional entre as espécies relativamente rápido, valioso e compatível.

1.2 Bases biológicas de formação da memória

As bases biológicas da formação da memória envolvem, inicialmente, a percepção sensorial (visual, olfatória, gustativa, auditiva e somestésica). A entrada e codificação de informações advindas do ambiente passam por vias neuronais paralelas no sistema nervoso central e são comparadas com os arquivos de memórias ou de informações pré-existentes. Lesões nas áreas associativas do córtex levam a distúrbios de percepção, ou seja, ao não reconhecimento de objetos, sons, o próprio corpo e o ambiente externo (Lent, 2010). De acordo com o estímulo sensorial, células específicas são despolarizadas gerando um fenômeno que pode ser reproduzido experimentalmente utilizando-se estimulações elétricas do tipo teta (disparos elétricos a 100 Hz, separados por intervalos de 200 ms). Trata-se de uma alteração eletrofisiológica conhecida como potenciação de longa duração (do inglês, "long-term potentiation", LTP). Essas despolarizações, denominadas potenciais de ação, são transmitidas ao longo de todo o axônio de neurônios glutamatérgicos até atingirem o terminal axônico. Nesse ponto, ocorre a liberação do neurotransmissor glutamato e a sinapse química se estabelece. A estimulação de receptores de glutamato AMPA e NMDA leva à entrada de íons cálcio no terminal pós-sináptico determinando uma cascata de reações que culmina com a formação e liberação de neurotrofinas como o BDNF ("brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) e IGF (insulin-like growth factor). Essas estimulações conectam proteínas do citoesqueleto como o sistema integrinas-actina nos dendritos pós-sinápticos e as alterações nesse sistema modificam a densidade de espículas dendríticas (Hotulainen; Hoogenraad, 2010). Dessa forma, o contato entre axônio e dendrito é aumentado e leva a alterações morfológicas e/ou de neurotransmissão em sinapses. Esse fenômeno é denominado neuroplasticidade e fortalece as conexões neuronais, aumentando a associação entre neurônios (Casey et al., 2002). A LTP ocorre no hipocampo e em outras

áreas cerebrais, onde as alterações sinápticas são mantidas por um longo período de tempo após transcrição gênica e síntese de novas proteínas, resultando em aumento da eficácia da transmissão sináptica (Kandel, 2001; Izquierdo et al., 2008, Mayford et al., 2012). Desde a época em que foi proposto até os dias de hoje, esse processo é o que mais se adequa e que é mais aceito para demonstrar o que chamamos de memória de longa duração.

Durante o processo de envelhecimento, pode ocorrer redução de fatores que reforçam a memória, bem como o aumento de fatores que reduzem a manutenção das funções cognitivas, o que torna desejável a caracterização de um biomarcador que indique o status da cognição no processo de envelhecimento, objetivando o diagnóstico e/ou tratamento precoce do declínio cognitivo.

1.3 Síndrome da disfunção cognitiva canina

As alterações do comportamento canino que respondem a alterações fisiopatológicas relacionadas à idade e que envolvem diferentes condutas e alterações cognitivas estão incluídas sob a denominação de Síndrome da Disfunção Cognitiva Canina (SDCC), que também é chamado de Alzheimer Canino, por considerar as similaridades do comportamento cerebral e histopatológico com a DA em seres humanos (Head, 2013; Kaeberlein et al., 2016; Youssef et al., 2016; Mazzatenta et al., 2017).

Há diversos fatores neuropatológicos do envelhecimento cerebral de cães que são semelhantes aos observados em seres humanos acometidos por DA (Youssef et al., 2016; Mazzatenta et al., 2017). Entre os principais achados macroscópicos de ambas as espécies, podem ser encontradas a atrofia generalizada da região cortical, a retração dos giros cerebrais com espessamento dos sulcos e o aumento do volume dos ventrículos, que estão intimamente relacionados com a perda de massa encefálica neuronal. Nos achados histopatológicos, estão presentes os danos ao DNA, calcificação das meninges, alterações vasculares, neuronais e gliais, acúmulo de lipofuscina e edema axonal. Além disso, ocorre deposição de quantidades significantes de peptídeo β A no hipocampo, córtex pré-frontal, entorrinal, occipital e no cerebelo, levando ao desenvolvimento de placas difusas que se correlacionam fortemente com alterações comportamentais, como discriminação de objetos, aprendizagem reversa e aprendizagem espacial. Apesar de não haver relatos consistentes da presença de emaranhados neurofibrilares em cães, a presença da proteína Tau hiper-

fosforilada é relatada em cérebros de cães e gatos idosos, que pode representar um estágio prévio ao envelhecimento neurofibrilar (Borràs et al., 1999; Brione, 2010).

Em seres humanos acometidos por DA e possivelmente em cães que apresentam um quadro de neurodegeneração, causados principalmente pela deposição de β A, são acarretados à degeneração neuronal e disfunção sináptica, a diminuição da função neuronal, dos canais de cálcio, dos potenciais sinápticos e depleção dos neurotransmissores, o que reflete em deficiência de memória e alterações secundárias, como déficit de atenção e/ou codificação de novas informações (Araujo et al., 2007; Araujo et al., 2011).

1.3.1 Características comportamentais da SDCC

Para descrever os sintomas da síndrome, foi caracterizada a sigla em inglês “**DISHA**” “*Desorientation*”, “*altered Interactions with owners/other pets/environment*”, “*Sleep-wake cycle disturbances*”, “*House-soiling*”, “*changes in Activity*” (Landsberg; Araujo, 2005), onde os sinais de desorientação do cão são caracterizados quando o animal se perde em ambiente familiar, olha fixamente para um local, fica preso em lugares sem conseguir sair e anda de forma compulsiva. As alterações da interação se manifestam pela diminuição do contato com os membros da família e o não reconhecimento destes. Alterações do ciclo de sono-vigília são aparentes em cães que passam a dormir durante o dia e ficam mais agitados durante a noite, podendo chorar, vocalizar e arranhar o chão. A perda do treinamento higiênico inclui micção e defecação em locais inapropriados, mesmo na presença dos proprietários, sem causas médicas que justifiquem tal comportamento (Landsberg et al., 2012). Além disso, sinais de medo e ansiedade, que são comumente relatados por proprietários de cães idosos, podem ser semelhantes à agitação e ansiedade encontrado em seres humanos com DA, sendo considerado um componente da SDCC (Landsberg; Araujo, 2005). Por fim, os déficits de memória, que são os primeiros sinais reconhecidos de declínio cognitivo em seres humanos, foram identificados no início do processo de envelhecimento cerebral em cães, caracterizando-os como sinais da SDCC (Landsberg et al., 2012).

1.4 Possíveis biomarcadores para manutenção ou perda de memória

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) é membro da família das neurotrofinas, peptídeos encontrados no sistema nervoso central e periférico. É codificado pelo gene (*bdnf*) e a organização complexa do seu gene é bem conservada entre as espécies, desde peixes a mamíferos (Heinrich; Pagtakhan, 2004; Aid et al., 2007), sugerindo que o controle da sua expressão têm uma forte e importante significância funcional (Cohen-Cory et al., 2010). O BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático como proteína precursora (pró-BDNF) com peso molecular de 32-35 kDa, movendo-se no interior da célula via vesícula para o complexo trans-Golgi, que apresenta extrema importância para modificações pós-transducionais. Na presença do “*raft*” lipídico associado com a carboxipeptidase E, o pró-BDNF é transportado para a membrana de dendritos pós-sinápticos, dependendo da atividade do neurônio. Em seguida, o domínio terminal do pró-BDNF é clivado por enzimas denominadas convertases (PC1-7 e furin), convertendo-o na forma biologicamente ativa, o BDNF maduro (13 kDa). Desse modo, o BDNF maduro age em seu receptor específico TrKB (receptor de tirosina kinase B) exercendo as suas principais funções, como o crescimento e diferenciação de novos neurônios, maturação e refinamento da arborização dendrítica e plasticidade sináptica (Cohen-Cory et al., 2010; Beeri; Sonnen, 2016). Entretanto, o pró-BDNF pode não sofrer clivagem e ser liberado no meio extracelular na presença de metaloproteínas (Lebmann; Brigadski, 2009), podendo ativar seletivamente o receptor de neurotrofina p75, induzindo a via de sinalização pró-apoptótica (Teng, 2005). Além disso, há relatos indicando que a quantidade de BDNF no cérebro de seres humanos é proporcional à proteção ao declínio cognitivo, ou seja, indivíduos que apresentaram níveis maiores de BDNF no cérebro exibiram declínio cognitivo mais lento, quando comparados aos seres humanos com níveis menores, ao longo de sete anos (Buchman et al., 2016). No sistema periférico, o BDNF é produzido e estocado nas plaquetas, onde esse sistema pode representar um marcador de seus níveis em longo prazo, pois as plaquetas circulam no sangue periférico durante 10 dias, tornando-a relevante para o monitoramento dos níveis de BDNF no SNC (Lommatzsch et al., 2005; Pláteníket al., 2014; Lebois; Josefsson, 2016). Alguns trabalhos sugerem que a presença da neurotrofina no sangue poderia ser indicativa do estado cognitivo (Beeri; Sonnen, 2016; Buchman et al., 2016). Dessa forma, a investigação dos níveis

no sangue seria de grande valia, visto que a sua quantidade está intimamente relacionado ao estado cognitivo.

Outro sistema que vem sendo relacionado ao estado cognitivo é o purinérgico. A adenosina é o produto da conversão de adenosina monofosfato (AMP) pela ecto-5'-nucleotidase ou CD75 e atua como agonista em receptores acoplados à proteína G (GPCRs). O seu principal papel é atuar como modular citoprotetor em condições fisiológicas e patofisiológicas (Jacobson; Gao, 2006). Como característica geral dos GPCRs, os receptores de adenosina são compostos por sete hélices transmembranares com a região amino-terminal (N-terminal) localizada no meio extracelular e a carboxi-terminal (C-terminal), na região citosólica. São classificados em quatro subtipos de receptores, conhecidos como A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Em geral, após a interação entre agonista e receptor, há uma mudança conformacional da proteína G, induzindo a troca de uma molécula de GDP (difosfato de guanosina) por GTP (trifosfato de guanosina) no sítio catalítico localizado na subunidade alfa da proteína G. O complexo GTP-alfa se dissocia das subunidades beta e gama, transmitindo o sinal celular para uma variedade de efetores intracelulares de ativação ou inibição de enzimas e, nesse caso, definida principalmente pela adenilato ciclase. Os receptores A_1 e A_3 inibem a produção do AMP cíclico através do acoplamento à proteína G_i ; os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados à proteína G_s ou G_o , respectivamente, por estimularem a adenilato ciclase, tendo como produto final a formação do AMP cíclico (Canas et al., 2018).

O sistema adenosinérgico apresenta um papel essencial na manutenção da homeostasia cerebral, sobretudo, através da ação inibitória e facilitatória dos receptores A_1 e A_{2A} , respectivamente (Pagnussat et al., 2015). Os efeitos paralelos e combinados mediados por tais receptores controlam a transmissão sináptica basal e a neuroplasticidade cerebral, contribuindo para a codificação da informação em circuitos neuronais, o que afeta diferentes comportamentos, desde a locomoção até o humor (Chen et al., 2013). Em particular, foi reconhecida a participação dos receptores de adenosina em processos cognitivos, como demonstrados com o uso da cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, que controlam a execução da memória (Cunha; Agostinho, 2010). Desse modo, demonstrou-se que a administração aguda de cafeína melhora o reconhecimento de objetos (Botton et al., 2010), o desempenho na esQUIVA inibitória em roedores (Angelucci et al., 1999) e na discriminação de tarefas em seres humanos (Borota et al., 2014). Além disso, ob-

servou-se que o consumo crônico de cafeína reduziu não só a disfunção cognitiva observada durante o envelhecimento e na DA em seres humanos (Eskelinen et al., 2009; Cao et al., 2012), como também em modelos animais (Espinosa et al., 2013; Laurent et al., 2014). Em concordância com esses estudos, foi ainda verificado um aumento de receptores A_{2A} em neurônios glutamatérgicos de camundongos velhos e uma melhora da memória com o uso de antagonistas de A_{2A} nesses animais (Costenla et al., 2011).

Outros estudos mostram que o aumento da expressão desses receptores em animais está associado à neurodegeneração e déficit de memória e que o uso de antagonistas preveniu o déficit de memória induzido por escopolamina (Pagnussat et al., 2015). Uma implicação funcional do receptor A_{2A} foi ainda observada na translocação de receptores TrkB de BDNF através da "rafts" lipídicos, influenciando a liberação de glutamato e a plasticidade sináptica hipocampal (Assaife-Lopes et al., 2014). Portanto, acredita-se que os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} , ainda pouco estudado em cães, sejam coadjuvantes na fisiopatologia do declínio cognitivo no envelhecimento, tornando-os substancialmente um futuro alvo de diagnóstico e/ou terapêutica relevante.

Diante disso, pretendemos investigar a densidade dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} , e da neurotrofina BDNF e propor que possam ser considerados como biomarcadores da memória, usando como modelo os cães de companhia, pois além de compartilharem o mesmo ambiente e estilo de vida, sendo expostos a semelhantes fatores que influenciam no envelhecimento, apresentam diversas semelhanças neuropatológicas com os seres humanos, como a disfunção cognitiva. Assim, o projeto tem como escopo criar subsídios, como pesquisa básica, na caracterização de possíveis biomarcadores periféricos relacionados à consolidação e fortalecimento da memória para o futuro desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos objetivando o reconhecimento precoce do declínio cognitivo de ambas as espécies.

6. CONCLUSÕES

Após avaliar a memória e realizar análise comparativa translacional entre os níveis de proteínas relacionadas à formação e manutenção da memória em animais jovens e velhos, podemos concluir que:

- ✓ Ratos velhos com déficit de memória de reconhecimento e alterações moleculares da via da LTP apresentaram aumento de A_{2A} e redução de A_1 e BDNF no hipocampo e sangue.
- ✓ Cães velhos com declínio cognitivo apresentaram aumento de A_{2A} e redução de A_1 e BDNF no sangue.
- ✓ Pela a análise translacional entre ratos e cães, demonstrou-se que as variáveis propostas podem ser consideradas como potenciais biomarcadores para o declínio cognitivo em cães e ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aid, T.; Kazantseva, A.; Piirsoo, M.; Palm, K.; Timmusk, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 3, p. 525-535, 2007.
- Akingbade, O.; Gibson, C.; Kalaria, R.; Mukaetova-Ladinska, E. Platelets: Peripheral Biomarkers of Dementia?. **Journal of Alzheimer's Disease**, n. Preprint, p. 1-25, 2018.
- Angelucci, M. M.; Vital, M. A.; Cesário, C.; Zadusky, C. R.; Rosalen, P. L.; da Cunha, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European journal of pharmacology**, v. 373, n. 2-3, p. 135-140, 1999.
- Angulo, E.; Casadó, V.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Viñals, F.; Ferrer, I.; Lluís, C.; Franco, R. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer's disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. **Brain pathology**, v. 13, n. 4, p. 440-451, 2003.
- Antunes, M.; Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.
- Araujo, J. A.; Nobrega, J. N.; Raymond, R.; Milgram, N. W. Aged dogs demonstrate both increased sensitivity to scopolamine impairment and decreased muscarinic receptor density. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, n. 2, p. 203-209, 2011.
- Araujo, J. A.; Studzinski, C. M.; Milgram, N. W. Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 411-422, 2005.
- Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D. Tan, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 941-952, 2006.
- Assaife-Lopes, N.; Sousa, V. C.; Pereira, D. B.; Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M. Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A_{2A} receptors and its functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. **Purinergic signalling**, v. 10, n. 2, p. 251-267, 2014.
- Baumgartner, R.; Umlauf, E.; Veitinger, M.; Guterres, S.; Rappold, E.; Babeluk, R.; Mitulovic, G.; Oehler, R.; Zellner, M. Identification and validation of platelet low biological variation proteins, superior to GAPDH, actin and tubulin, as tools in clinical proteomics. **Journal of proteomics**, v. 94, p. 540-551, 2013.
- Beason-Held, L. L.; Goh, J. O.; An, Y.; Kraut, M. A.; O'Brien, R. J.; Ferrucci, L.; Resnick, S. M. Changes in brain function occur years before the onset of cognitive impairment. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 46, p. 18008-18014, 2013.
- Beeri, M. S.; Sonnen, J. Brain BDNF expression as a biomarker for cognitive reserve against Alzheimer disease progression. **Neurology**, v. 129, p. 702-703, 2016.

Borras, D.; Ferrer, I.; Pumarola, M. Age-related changes in the brain of the dog. **Veterinary pathology**, v. 36, n. 3, p. 202-211, 1999.

Borota, D.; Murray, E.; Keceli, G.; Chang, A.; Watabe, J. M.; Ly, M.; Toscano, J. P.; Yassa, M. A. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 201, 2014.

Botton, P. H.; Costa, M. S.; Ardais, A. P.; Miorananza, S.; Souza, D. O.; da Rocha, J. B.; Porciuncula, L. O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 254-259, 2010.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Briones, F.; Cáceres, T.; Jarpa, M. Detección de b-Amiloide, Proteína TAU Hiperfosforilada y Ubiquitina por Técnica de Inmunohistoquímica en Cerebros de Caninos Mayores de 10 Años. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 4, p. 1255-1261, 2010.

Buchman, A. S.; Yu, L.; Boyle, P. A.; Schneider, J. A.; de Jager, P. L.; Bennett, D. A. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. **Neurology**, v. 86, n. 8, p. 735-741, 2016.

Calderón-Garcidueñas, L.; Mora-Tiscareno, A.; Ontiveros, E.; Gomez-Garca, G.; Barragan-Meija, G.; Broadway, L.; Chapman, S.; Valencia-Salazar, G.; Jewells, V.; Maronpot, R. R.; Henriquez-Roldan, C.; Perez-Guille, B.; Torres-Jardon, R.; Herrit, L.; Brooks, D.; Osnaya-Brizuela, N.; Monroy, M. E.; Gonzalez-Maciel, A.; Reynoso-Robles, R.; Villarreal-Calderon, R.; Solt, A. C.; Engle, R. W. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. **Brain and cognition**, v. 68, n. 2, p. 117-127, 2008.

Canas, P. M.; Cunha, R. A.; Agostinho, P. Adenosine receptors in Alzheimer's disease. In: Borea, P.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F. (eds) **The Adenosine Receptors**, Human Press, v. 32, p.259-280, 2018.

Cao, C.; Loewenstein, D. A.; Lin, X.; Zhang, C.; Wang, L.; Duara, R.; Wu, Y.; Giannini, A.; Bai, G.; Cai, J.; Greig, M.; Schofield, E.; Ashok, R.; Small, B.; Potter, H.; Arendash, G. W. High blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 30, n. 3, p. 559-572, 2012.

Casey, M.; Marguire, C.; Kelly, A.; Gooney, M. A.; Lynch, M. A. Analysis of the pre-synaptic signaling mechanisms underlying the inhibition of LTP in rat dentate gyrus by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. **Hippocampus**, v. 12, n. 3, p. 377-385, 2002.

Chen, J.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 4, p. 265, 2013.

Cohen-Cory, S.; Kidane, A. H.; Shirkey, N. J.; Marshak, S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 271-288, 2010.

Costenla, A. R.; Cunha, R. A.; De Mendonça, A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S25-S34, 2010.

Cunha, R. A.; Agostinho, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S95-S116, 2010.

Davis, P. R.; Head, E. Prevention approaches in a preclinical canine model of Alzheimer's disease: benefits and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 47, 2014.

Elias, G. M.; Nicoll, R. A. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 7, p. 343-352, 2007.

Eskelinen, M. H.; Ngandu, T.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 1, p. 85-91, 2009.

Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

Epel, E. S.; Blackburn, E. H.; Lin, J.; Dhabhar, F. S.; Adler, N. E.; Morrow, J. D.; Cawthon, R. M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17312-17315, 2004.

Espinosa, J.; Rocha, A.; Nunes, F.; Costa, M. S.; Schein, V.; Kazlauckas, V.; Kalinine, E.; Souza, D. O.; Cunha, R. A.; Porciuncula, L. O. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 2, p. 509-518, 2013.

Fick, L. J.; Fick, G. H.; Li, Z.; Cao, E.; Bao, B.; Heffelfinger, D.; Parker, H; G.; Ostrander, E. A.; Riabowol, K. Telomere length correlates with life span of dog breeds. **Cell reports**, v. 2, n. 6, p. 1530-1536, 2012.

Flaten, V.; Laurent, C.; Coelho, J. E.; Sandau, U.; Batalha, V. L.; Burnouf, S.; Hamdane, M.; Humez, S.; Boison, D.; Lopes, L. V.; Blue, L.; Blum, D. From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease? **Biochem Soc Trans**, v. 42, p. 587-592.

Gilmore, K. M.; Greer, K. A. Why is the dog an ideal model for aging research?. **Experimental gerontology**, v. 71, p. 14-20, 2015.

Gladding, C. M.; Raymond, L. A. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 48, n. 4, p. 308-320, 2011.

Goulart, B. K.; de Lima, M. N.; de Farias, C. B.; Reolon, G. K.; Almeida, V. R.; Quevedo, J.; Kapczinski, F.; Schroder, N.; Roesler, R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 969-973, 2010.

Groc, L.; Bard, L.; Choquet, D. Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 4-18, 2009.

Hardingham, G. E.; Bading, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682, 2010.

Head, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1384-1389, 2013.

Heinrich, G.; Pagtakhan, C. J.. Both 5'and 3'flanks regulate Zebrafish brain-derived neurotrophic factor gene expression. **BMC neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 19, 2004.

Hotulainen, P.; Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. **The Journal of cell biology**, v. 189, n. 4, p. 619-629, 2010.

Izquierdo, I.; Cammarota, M.; da Silva, W. C.; Bevilaqua, L. R.; Rossato, J. I.; Bonini, J. S.; Mello, P.; Benetti, F.; Costa, J. C.; Medina, J. H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 115-127, 2008.

Kaeberlein, M.; Creevy, K. E.; Promislow, D. E. The dog aging project: translational geroscience in companion animals. **Mammalian genome**, v. 27, n. 7-8, p. 279-288, 2016.

Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

Landsberg, G. M.; Nichol, J.; Araujo, J. A. Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 749-768, 2012.

Landsberg, G. M.; Araujo, J. A. Behavior problems in geriatric pets. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 675-698, 2005.

Laurent, C.; Eddarkaoui, S.; Derisbourd, M.; Leboucher, A.; Demeyer, D.; Carrier, S.; Schneider, M.; Hamdane, M.; Muller, C. E.; Buee, L.; Blum, D. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 9, p. 2079-2090, 2014.

Lebmann, V.; Brigadski, T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. **Neuroscience research**, v. 65, n. 1, p. 11-22, 2009.

Lebois, M.; Josefsson, E. C. Regulation of platelet lifespan by apoptosis. **Platelets**, v. 27, n. 6, p. 497-504, 2016.

Leite, M. R.; Wilhelm, E. A.; Jesse, C. R.; Brandao, R.; Nogueira, C. W. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 4, p. 309-315, 2011.

Lent, R. Cem bilhões de neurônios-Conceitos Fundamentais em Neurociência. 2ª. Edição, Editora Atheneu, 2010.

Liu, Y.; Wong, T. P.; Aarts, M.; Rooyackers, A.; Liu, L.; Lai, T. W.; Wu, D. C.; Lu, J.; Tymianski, M.; Craig, A. M.; Wang, Y, T. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2846-2857, 2007.

Lommatzsch, M.; Zingler, D.; Schuhbaeck, K.; Schloetcke, K.; Zingler, C.; Schuff-Wermer, P.; Virchow, J. C. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 1, p. 115-123, 2005.

Mayford, M.; Siegelbaum, S. A.; Kandel, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 6, p. a005751, 2012.

Mazzatenta, A.; Carluccio, A.; Robbe, D.; Giulio, C. D.; Cellerino, A. The companion dog as a unique translational model for aging. In: **Seminars in cell & developmental biology**, v. 70, p. 141-153, 2017.

Ménard, C.; Quirion, R.; Vigneault, E.; Bouchard, S.; Ferland, G.; El Mestikawy, S.; Gaudreau, P. Glutamate presynaptic vesicular transporter and postsynaptic receptor levels correlate with spatial memory status in aging rat models. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 3, p. 1471-1482, 2015.

Mouro, F. M.; Rombo, D. M.; Dias, R. B.; Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M. Adenosine A2A receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 23, p. 4386-4397, 2018.

Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1290-1308, 2011.

Naz, H.; Islam, A.; Ahmad, F.; Hassan, M. I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: a multifunctional enzyme and potential therapeutic target. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 121, n. 1, p. 54-65, 2016.

O'Neill, D. G.; Creevy, K. E.; Austad, S. N.; Hoffman, J. M.; Promislow, D. E. Longevity and mortality of owned dogs in England. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 638-643, 2013.

Ongini, E.; Fredholm, B. B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 17, n. 10, p. 364-372, 1996.

Orr, A. G.; Hsiao, E. C.; Wang, M. M.; Ho, K.; Kim, D. H.; Wang, X.; Guo, W.; Kang, J.; Yu, G. Q.; Adame, A.; Devidze, N.; Dubal, D. B.; Masliah, E.; Conklin, B. R.; Mucke, L. Astrocytic adenosine receptor A2A and G s-coupled signaling regulate memory. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 423, 2015.

Pagnussat, N.; Almeida, A. S.; Marques, D. M.; Nunes, F.; Chenet, G. C.; Botton, P. H.; Mioranza, S.; Loss, C. M.; Cunha, R. A.; Porciuncula, L. O. Adenosine A2A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3831-3845, 2015.

Panza, F.; Solfrizzi, V.; Barulli, M. R.; Bonfiglio, C.; Guerra, V.; Osella, A.; Seripa, D.; Sabbà, C.; Pilotto, A.; Logroscino, G. Coffee, tea, and caffeine consumption and prevention of late-life cognitive decline and dementia: a systematic review. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 19, n. 3, p. 313-328, 2015.

Paoletti, P.; Bellone, C.; Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 383, 2013.

Patronek, G. J.; Waters, D. J.; Glickman, L. T. Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 52, n. 3, p. B171-B178, 1997.

Pláteník, J.; Fisar, Z.; Buchal, R.; Jirak, R.; Kitzlerova, E.; Zverova, M.; Raboch, J. GSK3 β , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 83-93, 2014.

Proctor, D. T.; Coulson, E. J.; Dodd, P. R. Post-synaptic scaffolding protein interactions with glutamate receptors in synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 4, p. 509-521, 2011.

Ritchie, K. Carrière, I.; de Mendonça, A.; Portet, F.; Dartigues, J. F.; Rouaud, O.; Barberger-Gateau, P.; Ancelin, M. L. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, v. 69, n. 6, p. 536-545, 2007.

Rofina, J. E.; van Andel, I.; van Ederen, A. M.; Papaioannou, N.; Yamaguchi, H.; Gruys, E. Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. **Amyloid**, v. 10, n. 2, p. 86-96, 2003.

Rofina, J. E.; van Ederen, A. M.; Toussaint, M. J.; Secreve, M.; van der Spek, A.; van der Meer, I.; van Eerdenburd, F. J.; Gruys, E. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain research**, v. 1069, n. 1, p. 216-226, 2006.

Romero-Calvo, I.; Ocon, B.; Martinez-Moya, P.; Suarez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martinez-Augustin, O.; de Medina, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

Schütt, T.; Toft, N.; Berendt, M. Cognitive function, progression of age-related behavioral changes, biomarkers, and survival in dogs more than 8 years old. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 6, p. 1569-1577, 2015.

Simonin, C.; Duru, C.; Salleron, J.; Hincker P.; Charles, P.; Delval, A.; Youssov, K.; Burnouf, S.; Azualay, J. P.; Verny, C.; Scherer, C.; Tranchant, C.; Goizet, C.; Debruxelles, S.; Defebvre, L.; Sablonnière, B.; Ramon-Rousseaux, M.; Buée, L.; Destée, A.; Godefroy, O.; Durr, A.; Landwehrmeyer, B. Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 58, p. 179-182, 2013.

Surdyk, K. K.; Sloan, D. L.; Brown, S. A. Renal effects of carprofen and etodolac in euvoletic and volume-depleted dogs. **American journal of veterinary research**, v. 73, n. 9, p. 1485-1490, 2012.

Takeda, T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. **Neurobiology of aging**, v. 20, n. 2, p. 105-110, 1999.

Tebano, M. T.; Martire, A.; Potenza, R. L.; Gro, C.; Pepponi, R.; Armida, M.; Domenici, M. R.; Schwarzschild, M. A.; Chen, J. F.; Popoli, P. Adenosine A2A receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 1, p. 279-286, 2008.

Teng, H. K.; Teng, K. K.; Lee, R.; Wright, S.; Tevar, S.; Almeida, R. D.; Kermani, P.; Torkin, R.; Chen, Z. Y.; Lee, F. S.; Kraemer, R. T.; Nykjaer, A.; Hempstead, B. L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 22, p. 5455-5463, 2005.

Thathiah, A.; de Strooper, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73, 2011.

Van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 439, 2014.

Van Galen, P. J.; van Berger, A. H.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Olah, M. E.; Ijzerman, A. P.; Stiles, G. L.; Jacobson, K. A. A binding site model and structure-activity relationships for the rat A3 adenosine receptor. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 1101-1111, 1994.

Veitinger, M.; Varga, B.; Guterres, S.; Zellner, M. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers?. **Acta neuropathologica communications**, v. 2, n. 1, p. 65, 2014.

Vogel-Ciernia, A.; Wood, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current protocols in neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 8.31. 1-8.31. 17, 2014.

Wang, G. Zhai, W.; Yang, H. C.; Fan, R. X.; Cao, X.; Zhong, L.; Wang, L.; Liu, F.; Wu, H.; Cheng, L. G.; Poyarkov, A. D.; Poyarkov, N. A.; Tang, S. S.; Zhao, W. M.; Gao, Y.; Lv, X. M.; Irwin, D. M.; Savolainen, P.; Wu, C. I.; Zhang, Y. P. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. **Nature communications**, v. 4, p. 1860, 2013.

Wei, C. J.; Li, W.; Chen, J-F. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1358-1379, 2011.

Youssef, S. A.; Capucchio, M. T.; Rofina, J. E.; Chambers, J. K.; Uchida, K.; Nakayama, H.; Head, E. Pathology of the aging brain in domestic and laboratory animals, and animal models of human neurodegenerative diseases. **Veterinary pathology**, v. 53, n. 2, p. 327-348, 2016.