

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

CURSO DE BIOMEDICINA

HEMILY BATISTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LÍTIO E MEMANTINA NA MEMÓRIA ESPACIAL E
NEUROINFLAMAÇÃO EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO
PELO PEPTÍDEO β -AMILOIDE 1-42**

CRICIÚMA

2016

HEMILY BATISTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LÍTIO E MEMANTINA NA MEMÓRIA ESPACIAL E
NEUROINFLAMAÇÃO EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO
PELO PEPTÍDEO β -AMILOIDE 1-42**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obter o grau de Bacharel em Biomedicina
no curso de Biomedicina da Universidade do
Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane Budni

Coorientadora: Msc. Michelle Lima Garcez

Criciúma, Junho de 2016

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. JOSIANE BUDNI – UNESC – Orientadora


Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI – UNESC


Dra. RENATA TISCOSKI NESI – Fisioterapeuta

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em idosos. É caracterizada por disfunção cognitiva progressiva com acúmulo do peptídeo β -amiloide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) extracelular, emaranhados neurofibrilares intracelular, excitotoxicidade glutamatérgica e neuroinflamação. O tratamento farmacológico atual não é totalmente eficaz. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do lítio e/ou memantina na memória espacial e neuroinflamação em um modelo animal tipo DA induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-42}$. Foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos adultos, os quais foram submetidos à cirurgia estereotáxica e após 72 horas foi administrado intrahipocampal o peptídeo $A\beta_{1-42}$ ou fluido cerebrospinal artificial (ACSF). Após 24 horas, iniciou o tratamento por via oral com memantina (5 mg/kg), lítio (5 mg/kg), água ou associação entre memantina e lítio durante 17 dias. Entre o 15º e 19º foi realizado o teste comportamental radial *maze*, onde avaliou-se o tempo total, erros totais, erros de memória de referência e de trabalho. No último dia, os animais foram submetidos à eutanásia, e o córtex frontal e hipocampo foram dissecados para a análise dos níveis de citocinas: TNF- α , IL-1 β e IL-4. Os resultados do teste radial *maze* mostram que o grupo controle (ACSF+água) reduziu o tempo e erros totais para encontrar a comida, diferente do grupo $A\beta_{1-42}$ +água, que reduziu o tempo e erros somente no último dia. O grupo $A\beta_{1-42}$ +lítio reduziu o tempo no 3º e 4º dia e os erros em todos os dias de teste; o grupo $A\beta_{1-42}$ +memantina reduziu o tempo e os erros no 3º e 4º dia, enquanto que o grupo $A\beta_{1-42}$ +lítio+memantina reduziu o tempo em todos os dias de teste, revertendo o dano de memória induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-42}$. Além disso, os animais que receberam a associação obtiveram um pequeno número de erros desde o 1º dia em relação ao grupo peptídeo sozinho. Em relação as citocinas no córtex frontal, houve uma redução nos níveis de IL-4 no grupo peptídeo e este efeito foi revertido pelo lítio, memantina e associação destes; um aumento ocorreu nos níveis de IL-1 β , e este foi revertido pelo lítio, memantina e associação destes; já os níveis de TNF- α não foram alterados. No hipocampo, houve uma redução nos níveis de IL-4 no grupo peptídeo, e o tratamento com memantina e a associação de lítio e memantina aumentou os níveis desta citocina. O peptídeo induziu aumento nos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α e o tratamento com lítio, memantina e associação destes conseguiram reverter este efeito. O tratamento com lítio e memantina mostrou ter resultados benéficos na neuroinflamação e sua associação pode ser uma alternativa promissora na redução dos danos de memória espacial observados em demências como na DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; peptídeo β -amiloide 1-42; lítio; memantina; associação; citocinas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. It is characterized by progressive cognitive dysfunction with accumulation of β -amyloid peptide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) extracellular, intracellular neurofibrillary tangles, glutamatergic excitotoxicity and neuroinflammation. The current pharmacological treatment is not fully effective. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of lithium and/or memantine in spatial memory and neuroinflammation in an AD-like animal model induced $A\beta_{1-42}$ peptide. It were used 80 adult male Wistar rats, which underwent stereotactic surgery and after 72 hours was administered intrahippocampal the $A\beta_{1-42}$ peptide or artificial cerebrospinal fluid (ACSF). After 24 hours, started on treatment with memantine orally (5 mg/kg), lithium (5 mg/kg) water or association between memantine and lithium for 17 days. Among 15th and 19th was carried out radial maze behavioral test, which evaluated the total time, total errors, reference and work memory errors. On the last day, the animals were euthanized, and the frontal cortex and hippocampus were dissected for analysis of TNF- α , IL-1 β and IL-4 levels. Radial maze test results show that the control group (ACSF+water) reduced the total time and error to find the food different from $A\beta_{1-42}$ +water group, which reduced the time and errors only on the last day. The $A\beta_{1-42}$ +lithium group reduced the time in the 3rd and 4th day and mistakes every day test; the $A\beta_{1-42}$ +memantine group reduced the time and errors in the 3rd and 4th day, while the $A\beta_{1-42}$ +lithium+memantine group reduced the time on all test days, reversing memory damage induced by peptide $A\beta_{1-42}$. Moreover, the animals that received the association obtained a small number of errors from the first day compared to peptide alone group. Regarding the cytokines in the frontal cortex, there was a decrease in IL-4 level in the peptide group and this effect was reversed by lithium, memantine and association thereof; an increase occurred in IL-1 β levels, and this was reversed by lithium, memantine and association of these; since TNF- α level was not altered. In the hippocampus, there was a decrease in IL-4 levels in the peptide group and treatment with memantine and the association of lithium and memantine increased levels of this cytokine. The peptide induced increase in the IL-1 β and TNF- α levels and the treatment with lithium and memantine association reversed this effect. The treatment with lithium and memantine was shown to have beneficial results in neuroinflammation and their association may be a promising alternative in reducing memory space damage as seen in the AD-like dementias.

Key words: Alzheimer's disease; β -amyloid peptide 1-42; lithium; memantine; association; cytokines.

Dedico este trabalho àqueles que permaneceram ao meu lado me incentivando, acreditaram e torceram por mim, e me auxiliaram nesta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me dispor de boas energias e por estar sempre comigo em todos os momentos;

Agradeço aos meus pais: Tereza Batista e Carlos Augusto, por desde sempre me incentivarem aos estudos e por serem as pessoas que mais torcem por mim;

Agradeço ao meu namorado e amigo: Lucas Formentin, pelo companheirismo, amizade e atenção, compartilhou comigo este momento desde o início, foi paciente em me ouvir explicar o trabalho por diversas vezes, em compreender minhas ausências, e em me aturar nos momentos de estresse e desabafo, me dando muito apoio moral para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço imensamente à uma pessoa muito especial na qual a iniciação científica no laboratório de neurociências me permitiu conhecer: Michelle Garcez, além de minha parceira “braço direito” de laboratório, foi minha coorientadora e uma grande amiga, que não mediu esforços para me ajudar e me ensinar. Este trabalho somente tornou-se possível devido aos seus ensinamentos, pela colaboração, paciência, atenção, companheirismo e amizade;

Manifesto minha gratidão à Dr^a Josiane Budni, uma pessoa sensacional que tive o privilégio de ter como orientadora. Agradeço primeiramente por me conceder a oportunidade de eu participar de seu grupo de pesquisa científica em doenças neurodegenerativas, à realizar este trabalho acreditando que eu seria capaz e me auxiliando sempre que precisei. Agradeço também pela sua atenção, colaboração, pelos seus ensinamentos e amizade;

Agradeço aos meus parceiros de laboratório: Aline da Luz, Lucas Krasilchik, Francielle Mina, Tattiani Bellettini, Francielle Gonçalves, Afonso Nkadi, Ivo Darella, Ariandne Marques, Júlia Budny, que também me auxiliaram a realizar este trabalho;

Agradeço o laboratório de neurociências por me disponibilizar toda estrutura para realização deste trabalho.

**“Acredito que nossos sonhos sejam a
nossa essência, pois somos totalmente
verdadeiros quando os imaginamos.”**

Hellen Meira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Protocolo experimental.....	26
Figura 2 - Aparato comportamental do labirinto octogonal.....	28

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSF	Fluido Cerebroespinal Artificial, do inglês <i>Artificial Cerebral Spinal Fluid</i> ;
Akt	Agamaglobulinemia tirosina cinase, do inglês <i>Agammaglobulinemia tyrosine kinase</i> ;
Akt1	Agamaglobulinemia tirosina cinase 1, do inglês <i>Agammaglobulinemia tyrosine kinase 1</i> ;
APH	Faringe anterior defeituoso, do inglês <i>Anterior pharynx defective</i> ;
ApoE	Apolipoproteína E;
APP	Proteína Precursora Amiloide, do inglês <i>Amyloid Precursor Protein</i> ;
A β	β -amiloide, do inglês <i>Amyloid-β</i> ;
A β 40	β -amiloide com 40 aminoácidos, do inglês <i>Amyloid- β with 40 aminoacids</i> ;
A β 42	β -amiloide com 42 aminoácidos, do inglês <i>Amyloid- β with 42 aminoacids</i> ;
BACE1	Enzima de Clivagem do Sítio β da Proteína Precursora Amiloide, do inglês <i>Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1</i> ;
BcL-2	Linfoma de células B-2, do inglês <i>B-cell Lymphoma 2</i> ;
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>Brain derived neurotrophin factor</i> ;
C83	Carbono-terminal do aminoácido 83;
C99	Carbono-terminal do aminoácido 99;
Ca ²⁺	Cálcio;
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais;
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;
COX-2	Ciclooxigenase-2;
DA	Doença de Alzheimer;
ELISA	Imunoensaio Enzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ;
FDA	Administração de alimentos e drogas, do inglês <i>Food and Drug Administration</i> ;
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais, do inglês <i>Glial cell derived neurotrophic factor</i> ;
GSK-3 β	Glicogênio sintase cinase 3 β , do inglês <i>Glycogen synthase kinase-3β</i> ;
i.c.v.	Intracerebroventricular;
i.h.	Intrahipocampal;

IL-18	Interleucina-18;
IL-6	Interleucina-6;
IL-1 β	Interleucina-1 β ;
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível, do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i> ;
INF- γ	Interferon- γ ;
LDLr	Receptor de lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low-density lipoprotein receptor</i> ;
Li ⁺	Lítio monovalente;
LiCl	Cloreto de lítio;
LPS	Lipopolissacarídeo;
LRP1	Proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade 1, do inglês <i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i> ;
MDM2	Duplo minuto murino 2, do inglês <i>murine double minute 2</i> ;
NGF	Fator de crescimento derivado do nervo, do inglês <i>Nerve growth factor derivative</i> ;
NMDA	N-metil-D-aspartato;
PBS	Salina com tampão fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PEN-2	Potenciador de presinilina 2, do inglês <i>Presenilin enhancer 2</i> ;
PI-3-K	Fosfatidil inositol-3-cinase, do inglês <i>Phosphatidyl inositol-3-kinase</i> ;
PS1	Presinilina 1;
PS2	Presinilina 2;
sAPP α	Proteína precursora amiloide- α secretada, do inglês <i>secreted amyloid precursor protein-α</i> ;
sAPP β	Proteína precursora amiloide- β secretada, do inglês <i>secreted amyloid precursor protein-β</i> ;
SDS	Duodecil sulfato de sódio, do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i> ;
SNC	Sistema Nervoso Central;
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α , do inglês <i>Tumor necrosis factor-α</i> ;
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense;
v.o.	Via oral;
VLDLr	Receptor de lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>Very low density lipoprotein receptor</i> ;
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i> .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 ANIMAIS	24
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA	24
3.3 TRATAMENTO SUB-CRÔNICO	25
3.4 TESTE COMPORTAMENTAL	277
3.4.1 Labirinto octogonal (Radial maze)	277
3.5 EUTANÁSIA E DISSECÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS	288
3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA	288
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	377
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	56
ANEXO A	57

1 INTRODUÇÃO

A causa mais comum de demência em idosos é a doença de Alzheimer (DA), com prevalência de 5% depois dos 65 anos de idade, aumentando aproximadamente para 30% a partir dos 85 anos (GALIMBERTI, 2012). A DA é geralmente classificada de acordo com a idade que inicia, o principal fator de risco para a desenvolver a DA esporádica (de início tardio) é a idade, a maioria (>95%) dos indivíduos têm uma idade de início acima dos 65 anos de idade, enquanto que aproximadamente 1-5% têm um início mais precoce, ou seja, com idade inferior a 65 anos de idade, (DA de início precoce) que são clinicamente indistinguíveis. No entanto, a DA de início precoce é geralmente mais grave, com uma taxa mais rápida de progressão (RADEMAKERS; CRUTS; BROECKHOVEN, 2003). A DA de início tardio está se tornando cada vez mais prevalente na população, com mais de 15 milhões de pessoas afetadas no mundo inteiro, e sua causa é multifatorial, causada pelo envelhecimento em conjunto com uma interação complexa de ambos os fatores de risco ambientais e genéticos (BU, 2009). Em contrapartida, a DA de início precoce (familiar) é uma rara doença autossômica dominante, podendo ser causada por mutações nos genes da proteína precursora amiloide (APP) localizado no cromossomo 21; gene da presenilina 1 localizado no cromossomo 14 e gene da presenilina 2 no cromossomo 1, ambos ligados ao metabolismo dos peptídeos A β (RADEMAKERS; CRUTS; BROECKHOVEN, 2003; ZEKANOWSKI et al., 2004; BLENNOW et al., 2006) e a expressão do gene da apolipoproteína E (ApoE) no alelo e4. Vários dos receptores da ApoE interagem com a APP modulando o seu tráfego e processamento da APP, além de transportar o colesterol diretamente para o cérebro (ZEKANOWSKI et al., 2004; BLENNOW et al., 2006; BU, 2009).

Segundo *Alzheimer's Association* (2011), a DA é a sexta principal causa de morte nos Estados Unidos e a quinta principal causa de morte em idosos acima de 65 anos, sendo que o total de gastos em 2011 para cuidados especiais em saúde para estes idosos com DA e outras demências foi estimado em aproximadamente 183 milhões de dólares, sem incluir as contribuições dos cuidadores voluntários. Em função da melhoria dos recursos na área da saúde, as mortes causadas por outras doenças, como: doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e o câncer de próstata diminuíram entre os anos 2000 a 2008. Em contrapartida, as mortes

causadas pela DA aumentaram aproximadamente 66% durante esse período, devido a uma maior expectativa de vida e um aumento contínuo da idade média da população (WHO - *World Health Organization*, 2012).

A DA é caracterizada clinicamente por disfunção cognitiva progressiva, perda do julgamento, tomada de decisões e orientação prejudicada, frequentemente acompanhada em fases posteriores por distúrbios psicocomportamentais e de linguagem (GALIMBERTI, 2012). Os primeiros sintomas comportamentais da demência incluem problemas de memória na recordação imediata, na memória de curto ou longo prazo (LEIFER, 2009), incluindo déficit da memória visuoespacial (KASKIE; STORANDT, 1995). Na DA a queixa de memória pode ser atribuída a um déficit na codificação, manutenção e recuperação da informação. A incapacidade para codificar e recuperar a memória está presente nas fases iniciais da doença e se deteriora durante o progresso da mesma (AGGARWAL et al., 2005). Um déficit na obtenção de novas informações e uma alta taxa de esquecimento são características da DA (PASQUIER, et al., 2001). No entanto, todas observações relacionadas à memória são baseadas em testes comportamentais, nos quais o desempenho de memória deficiente poderia ser resultado de qualquer déficit no processamento de informações (LI; TANG; CHEN, 2016). As principais estruturas cerebrais responsáveis pelas memórias declarativas episódicas e semânticas são duas estruturas intercomunicadas do lobo temporal: o hipocampo e o córtex entorrinal. Ambas também trabalham em comunicação com outras regiões do córtex. As lesões características em cada região cerebral aparecem primeiramente no córtex entorrinal e no hipocampo, e posteriormente, no córtex pré-frontal e parietal. Lesões no córtex pré-frontal afetam intensamente a tomada de decisões de portadores da DA e a atribuição de valor moral às ações alheia é inibida, principalmente à do próprio sujeito (IZQUIERDO, 2011).

A detecção e a intervenção precoce na DA são extremamente importantes. Inicialmente, a grande maioria dos pesquisadores concordavam que o déficit cognitivo precoce e predominante na DA é devido a perda de memória declarativa episódica (LI; TANG; CHEN, 2016). Porém, agora a memória de trabalho também oferece uma nova visão sobre a teoria da memória, que é definida como a capacidade de reter informação que está ausente em mente por breves períodos de

tempo (BADDELEY, 2012). Esta memória está intimamente relacionada com o desempenho de atividade diária (LI; TANG; CHEN, 2016).

Neuropatologicamente, a DA é caracterizada pelo acúmulo do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) formando as placas senis no meio extracelular. Há também a formação de emaranhados neurofibrilares intracelular (LAFERLA; GREEN, 2012). Em função disso, ocorrem a perda sináptica, inflamação, dano oxidativo e morte neuronal, principalmente no córtex, hipocampo e amígdala (SELKOE; SHENK, 2003). Porém, o diagnóstico definitivo da DA só pode ser obtido na autópsia *postmortem*, no qual observa-se extensa perda neuronal e lesões cerebrais (presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares), no córtex cerebral, hipocampo e amígdala analisados em exame microscópico (RADEMAKERS; CRUTS; BROECKHOVEN, 2003).

As placas senis resultam do acúmulo extracelular anormal e deposição do peptídeo $A\beta$ com 40 ou 42 aminoácidos ($A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$). Estes são subprodutos da sequência das clivagens proteolíticas da APP (SERRANO et al., 2011). Esta é considerada uma glicoproteína de membrana encontrada nas superfícies celulares, endossomos, retículo endoplasmático e nas membranas de Golgi de diversos tipos celulares. É codificada pelo gene da APP localizado no cromossoma 21. Portanto, indivíduos com síndrome de Down, que possuem três cópias do cromossoma 21 (trissomia do cromossoma 21), possuem também três cópias do gene APP, com isso, desenvolvem os sinais clínicos e patológicos da DA de início precoce (BORDJI; ORTEGA; BUISSON, 2011).

Já se passaram quase trinta anos após a identificação do peptídeo $A\beta$ produzido a partir da APP através clivagens endoproteolíticas (KANG et al., 1987). A APP sofre duas clivagens proteolíticas consecutivas que pode impedir ou causar a formação do peptídeo $A\beta$ (SELKOE, 2001). Na primeira etapa, a parte extracelular da APP é clivada a partir da superfície celular, pela α - ou β -secretase. A clivagem da APP pela α -secretase evita a formação do peptídeo $A\beta$ e leva a formação e liberação de um grande fragmento solúvel extracelular da APP, a APP- α secretada (sAPP α) e de um fragmento não-amiloidogênico C-terminal do aminoácido 83 (C83) (HAASS, et al. 2012). Por outro lado, em uma via amiloidogênica, a APP poderia alternativamente ser clivada no C-terminal do aminoácido 99 (C99) pela β -secretase, uma aspartil-protease conhecida como BACE1 (enzima de clivagem do sítio β da

APP) (HUSSAIN et al., 1999), liberando um curto fragmento solúvel extracelular da APP, o segregado da APP- β (sAPP β) no espaço extracelular e deixa um fragmento C-terminal do aminoácido 99 no interior da membrana. A BACE1 medeia a primeira clivagem amiloidogênica (CAI et al., 2001; LUO et al., 2001). Em uma segunda etapa, ocorre a clivagem proteolítica na porção intramembrana, onde os fragmentos C83 ou C99 são clivados pela γ -secretase dentro da bicamada lipídica para gerar a liberação do peptídeo p3 não-amiloidogênico ou liberação dos resíduos de 40-42 aminoácidos do peptídeo A β (STEINER; HAASS, 2000). Além disso, revelou-se que a γ -secretase é um complexo ativo de alto peso molecular composta de presinilina 1 e 2 (PS1 e PS2), nicastrina, APH-1 (do inglês *anterior pharynx defective*) e potenciador de presinilina (PEN-2) (FRANCIS et al., 2002). O peptídeo A β ₁₋₄₂ exibe propriedades hidrofóbicas mais elevadas que o peptídeo A β ₁₋₄₀, sendo assim, mais suscetível de estar envolvido na formação de fibrilas. Inversamente, A β ₁₋₄₂ representa apenas cerca de 10% do total da espécie A β produzida no parênquima do cérebro, enquanto que A β ₁₋₄₀ é a isoforma mais abundante liberada após transformação da APP (HAASS, 2004).

Normalmente, o A β é gerado pelas células e circula pelos fluidos extracelulares, todavia, qualquer alteração no equilíbrio entre a liberação e a remoção do A β irá acarretar no aumento de seus níveis (SELKOE, 2000). Na DA a detoxificação dos peptídeos A β está prejudicada. Uma das vias de eliminação destes peptídeos é mediada pelos seguintes receptores: apolipoproteína E (ApoE), proteína relacionada com o receptor da lipoproteína de baixa densidade 1 (LRP1), receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr) e receptor de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDLr). Estes estão presentes nas células do parênquima cerebral (micróglia, astrócitos e neurônios), que ao longo da via de drenagem do fluido intersticial, retiram as proteínas A β através da barreira hematoencefálica. A outra via de eliminação ocorre através da degradação proteolítica mediada por endopeptidases (BU, 2009).

Os emaranhados neurofibrilares são filamentos helicoidais emparelhados que são produzidos devido a hiperfosforilação da proteína tau, que é expressa nos neurônios, cuja principal função fisiológica é a regulação da estabilidade dos microtúbulos no axônio (PERRIN, 2009). A hiperfosforilação da tau ocorre devido a desregulação das modificações pós traducionais, como a desregulação da

fosforilação de resíduos de serina e treonina. Esta Os microtúbulos formam o citoesqueleto e são essenciais para a manutenção da estrutura neuronal e o transporte axonal de várias substâncias, como os neurotransmissores. O grau de fosforilação da proteína tau é inversamente proporcional a sua capacidade de estabilização, quanto maior a fosforilação, menor a estabilidade (ANTONIO; SIQUEIRA-BATISTA, 2012).

O sistema glutamatérgico também está envolvido na fisiopatologia da DA. Os receptores ionotrópicos de glutamato, principalmente os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) estão envolvidos no mecanismo celular da aprendizagem e memória (RAI et al., 2013). Entretanto, na DA está envolvida a excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que há influxo excessivo e prolongado de íons de cálcio (Ca^{2+}) por estes receptores, podendo desencadear uma cascata de eventos que levam a lesão e morte neuronal. Os mecanismos que conduzem à condição de membranas cronicamente despolarizadas em neurônios vulneráveis no cérebro com DA pode ser devido a uma interação complexa entre o estresse oxidativo, insuficiência mitocondrial, inflamação cerebral crônica e a presença de peptídeos A β e possivelmente a tau hiperfosforilada (WENK; PARSONS; DANYSZ, 2006). A perda precoce de neurônios glutamatérgicos na DA ocorre comumente no lobo temporal medial e hipocampo (GREENAMYRE; YOUNG, 1989; HU et al., 2012). Além disso, é possível que a desregulação da transmissão glutamatérgica possa aumentar a produção de peptídeos A β , representando um risco de desenvolvimento da DA (BORDJI, 2011).

Outro mecanismo fisiopatológico da DA envolve a atividade exacerbada da glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β), uma serina/treonina cinase. Conseqüentemente sua inibição reduz a formação das placas amiloides e emaranhados neurofibrilares presentes na DA (PHIEL et al., 2003). A GSK-3 β está intimamente envolvida na hiperfosforilação da tau, no aumento da produção de A β através de sua ação na γ -secretase, nas respostas inflamatórias e diminuição da memória (HOOPER; KILLICK; LOVESTONE, 2008). Além disso, regula a produção mediada pelos receptores *toll-like* de citocinas pró e anti-inflamatórias (MARTIN et al., 2005; WANG; BROWN; MARTIN, 2011) influenciando a morte neuronal. Estes dados possibilitam identificar que os inibidores da GSK-3 β podem tornar-se novas

abordagens terapêuticas promissoras e eficazes para o tratamento futuro da DA (MARTINEZ; PEREZ, 2008).

Processos neuroinflamatórios são conhecidos por também contribuírem no dano neuronal e conseqüentemente no desenvolvimento da DA (SPENCER et al., 2011). Processos inflamatórios consistem numa resposta imune inata do cérebro, que envolve principalmente a ativação das micróglia, que são capazes de proteger e reparar tecidos e neurônios, e levam à uma série de alterações celulares e moleculares, indução de sinalização intracelular e liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, no sistema nervoso central (SNC) (ZHANG; JIANG, 2014). A presença das micróglia com intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, torna-se uma característica da patologia cerebral presente na DA (MRAK; GRIFFIN, 2005). A superfície das micróglia está equipada com numerosos transportadores, canais e receptores, incluindo receptores de reconhecimento padrão, principalmente receptores *Toll-like*, *Nod-like* e *scavenger*. Estes receptores são capazes de reconhecer moléculas potencialmente nocivas e ativar o sistema imune inato no SNC (SALMINEN et al., 2009; KIGERL et al., 2014). A ativação das micróglia e astrócitos no cérebro produzem vários fatores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, prostanóides, espécies reativas de oxigênio (ERO) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (HENEKA; O'BANIONA, 2007). Através de estímulos inflamatórios, micróglia e astrócitos sofrem mudanças morfológicas e secretam diversos mediadores inflamatórios, como interleucina-1 β (IL-1 β), óxido nítrico, prostaglandina E2 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), facilitando processos inflamatórios no SNC (NAHMAN, BELMAKER; AZAB, 2011). O estresse oxidativo, pode ser visto como uma causa, ou como conseqüência da neuroinflamação, através da produção de ERO (HENSLEY, 2010).

A ativação da micróglia atualmente é caracterizada por dois fenótipos: tipo M2 e tipo M1 (HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). Entre os subtipos de M2, encontra-se a ativação M2a que é caracterizada pela expressão do receptor de manose 1 e pela capacidade de modular a matriz extracelular com a expressão de proteínas quitinase-3 e arginase 1 (LATTA et al., 2015), uma vez que, a IL-4 estimula a atividade da arginase nos macrófagos/micróglia, o que lhes permite converter arginina em ornitina, um precursor de poliaminas e de colágeno, contribuindo deste modo para a produção da matriz extracelular (KREIDER, et al. 2007). Citocinas

sintetizadas por resposta de linfócitos T auxiliares do subconjunto Th2, tais como a IL-4, podem levar à supressão de respostas Th1, eliminação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos/micróglias, células T e astrócitos (BROWN, 1997). Uma variedade de citocinas controlam fortemente a amplificação e a redução de cada um dos estados da micróglia. A IL-4 é considerada a citocina mais potente para a resposta imunológica M2a. A indução de um fenótipo M2a por exposição a IL-4 tem indicado redução da deposição dos peptídeos A β ₁₋₄₂ em estudos *in vivo* (KREIDER, et al., 2007; KIYOTA, et al., 2010; CHAKRABARTY, et al., 2012).

Quando as micróglias estão ativadas em tipo M1, associa-se a uma resposta exacerbada e crônica das micróglias, que ocasiona aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produção de ERO e mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , interleucina-18 (IL-18); e a diminuição da secreção de fatores neurotróficos, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento derivado do nervo (NGF) e fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) (FERREIRA et al., 2014). Portanto, quando as micróglias estão ativadas cronicamente, possuem sua capacidade reduzida de fagocitar os peptídeos A β , conseqüentemente isso acaba dificultando a eliminação dos peptídeos A β , que por sua vez, acabam ativando constantemente as micróglias, resultando em mais danos neuronais e teciduais (FLODEN et al., 2005). Também podem ser detectados no sangue de pacientes com DA vários mediadores inflamatórios aumentados, incluindo o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (SWARDFAGER et al., 2010).

Estes mecanismos fisiopatológicos elencados acima, são investigados através de importantes ferramentas, como os modelos animais. Estes são de fundamental importância para buscar constantemente novos mecanismos fisiopatológicos da doença, bem como novas possíveis alternativas terapêuticas. A maior relevância encontra-se no fato de que muitas investigações sobre mecanismos da doença e de fármacos não se pode realizar em humanos somente em modelos animais. Portanto, a escolha de um modelo animal em detrimento de outro é importante e vai depender de sua semelhança com o ser humano em termos de anatomia, fisiologia e metabolismo. As espécies mais comumente utilizadas são os roedores, pois proporcionam um baixo custo, são de fácil manuseio, e como são seres menores, podem ser utilizados em maior quantidade (CHAVATTE-PALMER; TARRADE; ROUSSEAU-RALLIARD, 2016). Além disso, os sistemas neuronais de

todas as espécies de mamíferos são muito semelhantes (o homem, o rato e o camundongo possuem lobos cerebrais), tornando-se possível fazer interferências sensatas de achados numa dessas espécies menores e relacioná-las aos humanos. Reações bioquímicas no cérebro do rato e do homem tem efeitos parecidos sobre a memória em ambas as espécies (IZQUIERDO, 2011). Portanto, modelos animais com administração do peptídeo A β são utilizados como modelos para estudar a DA, já que induzem dano no processo de aprendizagem e memória, assim como presente na DA (SHANKAR et al., 2009; POZUETA; LEFORT; SHELANSKI, 2013). Além desses, também se utilizam modelos animais modificados geneticamente para desenvolverem a DA (DONG et al., 2008; LIU et al., 2014; NUNES, 2015).

Atualmente a farmacoterapia da DA inclui a melhoria temporária, estabilização ou diminuição dos sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais, e retardo do declínio sintomático, porém, menos do que se espera. Com isso, o tratamento atual pode reduzir a sobrecarga do cuidador, desde que esteja ciente que as melhorias clínicas podem não ser sempre evidentes (FARLOW; CUMMINGS, 2007). Segundo Geldmacher (2003), na ausência de meios para reverter os processos patológicos da DA, entre os objetivos da farmacoterapia encontram-se: preservação da capacidade cognitiva e funcional, redução dos distúrbios comportamentais e diminuição da progressão dos efeitos provocados pela destruição de neurônios e conseqüentemente a manutenção da qualidade de vida dos pacientes e cuidadores. Entre os cinco medicamentos aprovados para o tratamento da DA pela *Food and Drug Administration* (FDA), quatro deles são inibidores da colinesterase (donepezil, galantamina, rivastigmina e tacrina) e são aprovados para a fase leve e moderada da doença. Além disso, há a memantina, que é um antagonista dos receptores NMDA, aprovada para a fase moderada e fase severa da doença (SALLOWAY; CORREIA, 2009).

A memantina reduz o declínio cognitivo em pacientes com DA moderada e severa, uma vez que, reduz a excitotoxicidade induzida pelo glutamato, aliviando assim, os sintomas da doença (REISBERG et al., 2003). Sendo assim, este fármaco é seguro em aprimorar as capacidades cognitivas e funcionais de pacientes com DA moderada a grave, quer como monoterapia ou em combinação com o inibidor da colinesterase donepezil. Embora ainda haja debate sobre a eficácia da memantina no tratamento de estágios iniciais desta doença, dados emergentes sugerem seu

efeito potencial em pacientes com DA leve a moderada (TAMPI; DYCK, 2007). Também se tem mostrado sua eficácia em proteger neurônios dopaminérgicos contra danos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), por aumentar a produção de GDNF, e pelo seu efeito anti-inflamatório, por inibir a ativação exacerbada das micróglias, que é independente dos receptores NMDA (WU et al., 2009). O tratamento com uma baixa dose de memantina induziu efeitos anti-inflamatórios em estudos pré-clínicos (CHEN et al., 2012).

Portanto, é necessário investigar novos alvos terapêuticos para a DA. Entre estes alvos potenciais encontra-se o lítio, que está se tornando cada vez mais implicado como um fármaco que pode ter efeitos benéficos no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas. Este é utilizado para tratar condições psiquiátricas tais como transtorno do humor bipolar, e também possui efeitos neuroprotetores interessantes, sendo capaz de promover a neurogênese, aumentar os níveis de neurotrofinas, principalmente o BDNF e também inibir a GSK-3 β , que está envolvida na DA (SOFOLA-ADESAKIN et al., 2014).

O lítio (Li⁺) monovalente compete com o magnésio (Mg²⁺) bivalente, sendo semelhantes os raios iônicos destes cátions, tornando a capacidade do lítio para se ligar aos sítios do Mg²⁺. Portanto, o lítio pode inibir diversas enzimas que dependem de Mg²⁺ como um cofator. A competição entre o Li⁺ e Mg²⁺ por estes sítios de ligação tem uma influência significativa sobre a atividade de várias enzimas e a liberação de seus produtos metabólicos. Assim, a GSK-3 β , monofosfatase de inositol (IMP) e agamaglobulinemia tirosina cinase (Akt) são alvos importantes do lítio (FORENZA; DE-PAULA; DINIZ, 2014). A ativação da Akt induz efeitos neuroprotetores, provavelmente, devido à modulação de alvos como FOXO, *Bad*, e MDM2 (do inglês *murine double minute 2*) (CAMINS et al., 2009). Adicionalmente, o lítio pode reduzir a síntese dos peptídeos A β por afetar o processamento da APP, mas não modula a atividade do proteossoma, não aumentando sua degradação (SOFOLA- ADESAKIN et al., 2014).

As propriedades anti-inflamatórias do lítio começaram a surgir em meados de 1970, ao observarem que o lítio é capaz de inibir a síntese de prostaglandinas (KARMAZY; MANKU; HORROBIN, 1978) e reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS (NAHMAN; BELMAKER; AZAB, 2011). Além disso, o tratamento crônico com lítio pode atenuar a produção de ácido araquidônico, uma

característica marcante da resposta inflamatória inata (BASSELIN et al., 2007), e aumentar os níveis de citocinas sintetizadas pelos linfócitos T auxiliares do subconjunto Th2, como a IL-4 e IL-10, uma vez que, na DA os níveis destas citocinas encontram-se reduzidas (RAPAPORTI; MANJU, 2001).

Os efeitos do lítio sobre alterações no estado de fosforilação das subunidades do receptor NMDA podem impedir ou modular o aumento do cálcio intracelular mediado por estes receptores nos neurônios (NONAKA; HOUGH; CHUANG, 1998). Subunidades dos receptores NMDA são alvos para a GSK-3. O tratamento crônico com lítio suprime a função destes receptores por meio da modulação do estado de fosforilação do receptor mediado por esta cinase, diminuindo então, a ativação da Src-cinase, fazendo com que ocorra a inibição da fosforilação da tirosina da subunidade NR2B do NMDA, ocorrendo assim, a regulação deste receptor. O que representa pelo menos uma parte dos mecanismos moleculares pelos quais o lítio altera a função cerebral e exerce a sua eficácia clínica (CAMINS et al., 2009). O lítio modula a hiperatividade dos receptores NMDA fornecendo proteção aos neurônios contra apoptose induzida por excitotoxicidade glutamatérgica. O que faz com que estes dados possuam relevância, uma vez que, atualmente o único fármaco utilizado para bloquear a excitotoxicidade glutamatérgica é a memantina (CHALECKA-FRANASZEK; CHUANG, 1999). Assim, considerando que a expectativa de vida humana está aumentando e conseqüentemente tem-se mais idosos, a DA está se tornando cada vez mais prevalente, uma vez que, a idade é o maior fator de risco para desenvolver esta doença. Esta acaba sendo altamente incapacitante, uma vez que, o indivíduo torna-se completamente dependente de cuidadores e familiares para quaisquer atividades cotidianas, devido ao declínio de funções cognitivas, como a dificuldade progressiva em reter memórias recentes, adquirir novos conhecimentos, a perda do julgamento e tomada de decisões. Após mais de 100 anos de descoberta da DA, apenas cinco fármacos são aprovados para o tratamento da DA, entre eles a memantina. Este fármaco é o que menos causa efeitos colaterais e reduz a excitotoxicidade glutamatérgica, conseqüentemente, acaba reduzindo a morte neuronal. Contudo, os fármacos para a DA estão longe do ideal, já que não são capazes de reverter a fisiopatologia da doença ou a progressão da mesma. Desse modo, há uma grande necessidade de ampliar o conhecimento a respeito de outros fatores

neuropatológicos relacionados a DA para a busca de novos alvos terapêuticos que poderão retardar ou interromper as alterações patológicas iniciais da doença, evitando a progressão da mesma. Atualmente, os efeitos neuroprotetores promovidos pelo lítio em estudos pré-clínicos estão sendo promissores para a DA. Portanto, este fármaco torna-se um alvo potencial para se investigar o efeito do mesmo na DA, bem como sua associação com a memantina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o efeito do lítio, memantina e associação de lítio e memantina na memória espacial e na neuroinflamação em um modelo animal tipo DA induzido pela administração intrahipocampal do peptídeo A β ₁₋₄₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a memória espacial, através do labirinto octogonal (*radial maze*) de animais tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal tipo DA induzido pela administração intrahipocampal do peptídeo A β ₁₋₄₂;
- ✓ Avaliar os níveis das citocinas IL-4, IL-1 β e TNF- α em animais tratados com lítio, memantina e associação de lítio e memantina em um modelo animal tipo DA induzido pela administração intrahipocampal do peptídeo A β ₁₋₄₂.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos adultos pesando em média 280g à 380g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e mantidos em gaiolas em ciclo claro/escuro de 12h, com alimentação e água, disponíveis, com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA): Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA e Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) experimentais da UNESC sob protocolo 024/2015-1, conforme anexo A.

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA

Baseando-se que o hipocampo é uma das principais estruturas cerebrais responsável pelas memórias declarativas episódicas e semânticas (IZQUIERDO, 2011), e que na DA ocorre a perda desta memória (PASQUIER, et al., 2001; LEIFER, 2009), foi administrado o peptídeo $A\beta_{1-42}$ diretamente no hipocampo através da implantação de cânulas guias por meio da cirurgia estereotáxica. Ratos *Wistar* machos adultos (100-120 dias) foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal e colocados no aparelho estereotáxico. Foi realizado uma incisão na pele da cabeça do animal de aproximadamente 1 cm, para expor a calota craniana. Posteriormente, foi realizado uma leve raspagem com peróxido de hidrogênio 10V para visualização do bregma, o qual a partir deste, foram executadas as medidas para localização do hipocampo. Depois de localizada a coordenada do hipocampo, foi utilizado uma broca carbide cirúrgica para perfuração do crânio do animal. Para induzir as características da patogênese da demência tipo DA nos animais, utilizou-se o peptídeo $A\beta_{1-42}$ que foi dissolvido em fluido cerebrospinal artificial (ACSF), 100 pmol/ μL . Este peptídeo foi

incubado a 37°C durante 7 dias para se obter a forma agregada para posterior administração intrahipocampal (i.h.) após a cirurgia estereotáxica (CHRISTENSEN et al., 2008). Foi administrado 2 uL do peptídeo A β ₁₋₄₂ (100 pmol/ μ L) bilateralmente no hipocampo dorsal, totalizando 4 uL, através de uma cânula guia (barra incisora fixado em 1,2 mm lateral, 2,0 mm posterior ao bregma; 3,9 mm ventral) (CHRISTENSEN et al., 2008). Após o término da cirurgia os animais foram mantidos em local aquecido com um aquecedor elétrico até despertarem da anestesia. Foi adicionado 0,2 mg/mL de dipirona sódica na água das garrafas de beber dos animais, disponível *ad libidum* durante 24 horas, para minimizar a dor pós cirúrgica.

3.3 TRATAMENTO SUB-CRÔNICO

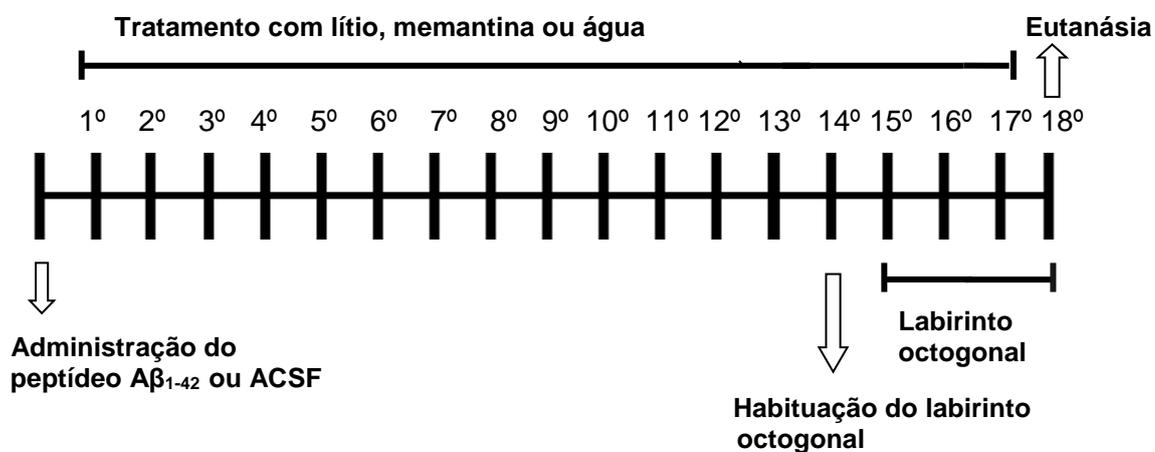
Após um dia da administração intrahipocampal do peptídeo A β ₁₋₄₂ ou ACSF, iniciou o tratamento com carbonato de lítio (5 mg/kg) (ZHAO et al., 2014) e cloridrato de memantina (5 mg/kg), via oral (v.o.) por gavagem (LIU et al., 2014) ou água da torneira, de acordo com o grupo experimental. Ambos os medicamentos foram triturados e diluídos em água da torneira, administrados por v.o. com auxílio de uma agulha especial para gavagem e seringa, a um volume de 1 mL/kg de peso corporal do animal, durante 17 dias, aproximadamente às 10:30 horas. Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais baseados nos tratamentos, como mostra o quadro 1 a seguir. No 14° dia de tratamento, os animais foram submetidos à habituação no aparato comportamental do labirinto octogonal, e nos próximos 4 dias consecutivos à habituação, ocorreu o teste, sendo no 15°, 16°, 17° dia de tratamento, e no último dia do teste do labirinto octogonal, no 18°, em que o animal não recebeu mais o tratamento por gavagem, pois ao finalizar o teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia (Figura 1).

Quadro 1 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	
Grupos	Quantidade de animais por grupo
1. Administrados com ACSF i.h. e tratados com água v.o. (ACSF+água)	10
2. Administrados com $A\beta_{1-42}$ i.h. e tratados com água v.o. ($A\beta_{1-42}$ +água)	10
3. Administrados com ACSF i.h e tratados com memantina v.o. (ACSF+memantina)	10
4. Administrados com $A\beta_{1-42}$ i.h. e tratados com memantina v.o ($A\beta_{1-42}$ +memantina)	10
5. Administrados com ACSF i.h e tratados com lítio v.o. (ACSF+lítio)	10
6. Administrados com $A\beta_{1-42}$ i.h. e tratados com lítio v.o. ($A\beta_{1-42}$ +lítio)	10
7. Administrados com ACSF i.h e tratados com lítio e memantina v.o. (ACSF+lítio+memantina)	10
8. Administrados com $A\beta_{1-42}$ i.h. e tratados com lítio e memantina v.o. ($A\beta_{1-42}$ +lítio+memantina)	10
TOTAL	80

Fonte: do autor.

Figura 1 – Protocolo experimental



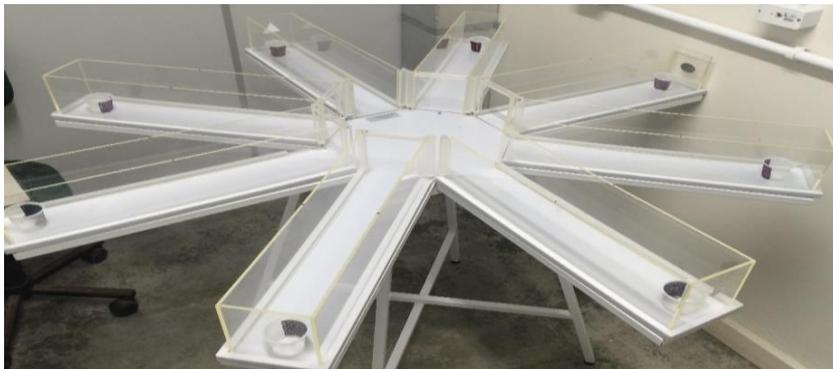
Fonte: do autor.

3.4 TESTE COMPORTAMENTAL

3.4.1 Labirinto octogonal (*Radial maze*)

Este teste comportamental tem como objetivo avaliar a memória espacial dos animais, no qual avaliou-se os seguintes parâmetros: erros de memória de trabalho (entrada em um braço que continha comida já previamente consumida); erros de memória de referência (entrada em um braço sem recompensa); erros totais e o tempo total (latência) que obtiveram para encontrarem a recompensa nos 4 braços (PACKARD; WHITE, 1991). O aparato do labirinto octogonal, também conhecido como *radial maze*, possui 8 braços, numerados de 1 a 8 (48x12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro), como mostra a figura 2. O aparelho foi colocado 50 cm acima do chão, e foram colocadas figuras de pistas geométricas no final dos braços 1, 3, 5 e 7, correspondente aos braços onde coloca-se as recompensas. Dessa forma, no 14º dia de tratamento, o animal foi colocado neste aparato durante 10 minutos apenas para se habituar ao aparato, logo após foram retornados à caixa moradia, onde ficaram 22 horas sem ração. No dia seguinte, correspondente ao 15º dia de tratamento, o animal foi colocado novamente no aparato, porém já com a recompensa (cereais de chocolate) nos quatro dos oito braços do labirinto, como mencionado anteriormente. Foi anotado a entrada em cada braço, assim como, o tempo foi marcado em que cada animal demorou a encontrar os 4 cereais de chocolate. Após finalizar a tarefa, o animal foi retirado do aparato e retornado à caixa moradia. Após retornarem a caixa moradia, os animais receberam a ração do biotério e tiveram a ração durante 2 horas disponível para alimentarem-se, assim os ratos permaneceram em jejum durante as 22 horas subsequentes. O mesmo foi realizado no 16º, 17º dias de tratamento, e após o último teste, 24 horas após o último dia de tratamento, os animais voltaram a se alimentar normalmente com a ração padrão do biotério e neste mesmo dia foram submetidos à eutanásia (FOYET et al., 2011; HRITCU; CIOANCA; HANCIANU, 2012).

Figura 2 – Aparato comportamental do labirinto octogonal



Fonte: do autor.

3.5 EUTANÁSIA E DISSECÇÃO DE ESTRUTURAS CEREBRAIS

Após a avaliação comportamental, os animais (n=10) foram submetidos à eutanásia após a finalização do teste comportamental por decapitação na guilhotina e foram dissecadas as estruturas cerebrais que fisiopatologicamente estão entre as mais afetadas na DA, o córtex frontal e hipocampo. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado da sala de eutanásia para evitar que sentissem o cheiro do sangue. A guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex frontal e hipocampo foram dissecados, colocadas numa caixa térmica contendo nitrogênio para que fossem transportadas até o *freezer* -80°C, onde ficaram armazenadas, para posteriores análises das citocinas IL-4, IL-1 β e TNF- α utilizando os kits de imunoenensaio enzimático (ELISA).

3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Primeiramente, para a dosagem das citocinas IL-4 (DY504), IL-1 β (DY501) e TNF- α (DY510) através de kits de ELISA da R&D Systems (DuoSet), o córtex frontal e hipocampo dos animais de cada grupo experimental (n=5-6) foram homogeneizados com PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) 1x concentrado, centrifugadas à 4°C por 10 minutos à 10.000 rcf. Retirou-se o sobrenadante e foi adicionado PBS na quantidade 1:1, e foi retirado uma alíquota para a dosagem de proteínas. A proteína total foi dosada de acordo com Lowry et al. (1951), usando albumina de soro bovino como padrão. De acordo com as instruções do fabricante, a

curva padrão (*standart*), foi analisada por quatro parâmetros logísticos através do *software* ELISA *analysis* disponível gratuitamente *online*. O *standart* demonstra uma relação direta entre a densidade ótica e as concentrações das citocinas. O resultado das citocinas (pg) foi dividido pelo valor da proteína total (mg) de acordo com cada amostra. Para a realização do teste, as placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas *over night* com o anticorpo de captura (anticorpo primário). Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com *wash buffer* (PBS 1x concentrado com *tween* 20 a 0,05%), e em seguida, as placas foram bloqueadas com uma solução de PBS 1x concentrado com albumina 1% durante 1 hora. Em seguida, a curva padrão com 7 pontos (concentrações diferentes) diluídas em PBS 1x concentrado e as amostras homogeneizadas foram incubadas na placa durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com *wash buffer*, e em seguida, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção (anticorpo secundário) durante mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado a estreptavidina conjugada à peroxidase por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente, em seguida, o substrato para esta enzima (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1) por mais 20 minutos, e para finalizar, foi pipetado o *stop solution* (ácido sulfúrico 2N) para interromper a atividade enzimática, sendo possível determinar os níveis das citocinas através de uma leitura analítica de absorvância à 450nm no espectrofotômetro.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através do programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal. A curva padrão das citocinas foram analisadas em quatro parâmetros logísticos, e os resultados das citocinas foram avaliados por análise de variância ANOVA de duas vias. O teste *post hoc* de Duncan foi utilizado quando houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados tiveram diferenças significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. E o tempo e erros totais do teste radial *maze* foi analisado por ANOVA de medidas repetidas, e erros de memória de referência e trabalho por ANOVA de duas vias. O teste *post hoc* de Duncan foi utilizado quando houve diferença significativa entre os grupos, quando o $p < 0,05$. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

A figura 1A mostra a latência para encontrar a recompensa nos quatro braços, o qual foi observado interação entre a administração do $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [F (3,70) =2,36, $p<0,01$], e a figura 1B os erros totais que os animais cometeram até encontrar as recompensas, o qual também houve interação entre a administração do $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [F (3,70) =3,30, $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que o grupo controle tratado com água reduziu a latência para encontrar a recompensa a partir do 2º dia de teste quando comparado ao 1º dia ($p<0,005$), e também no 3º e 4º dia ($p<0,001$), assim como, reduziu os erros no 3º ($p<0,01$) e 4º dia ($p<0,001$). Os grupos controle tratados com lítio e memantina separadamente também aprenderam a tarefa, nos quais, houve redução significativa do tempo no 2º dia ($p<0,05$), e nos 3º e 4º dias ($p<0,001$), e nos erros no 3º ($p<0,01$) tratados com lítio e ($p<0,05$) tratados com memantina, no 4º dia ($p<0,05$) em ambos. O grupo controle tratado com lítio associado à memantina também reduziu o tempo para encontrar a recompensa quando comparado ao 1º dia de teste no 2º e 3º dias ($p<0,05$) e no 4º dia ($p<0,0001$). Nos erros apenas no 4º dia ($p<0,05$), porém isso se deve a melhor performance observada desde o primeiro dia quando comparado ao controle ($p<0,05$). Já nos animais submetidos a administração do $A\beta_{1-42}$, para induzir característica tipo DA, não houve redução do tempo no 2º dia de teste comparado ao 1º ($p=0,65$) nem no 3º ($p=0,197$), apenas reduziu no 4º dia ($p<0,005$), o mesmo foi observado nos erros (2º: $p=0,063$, 3º: 0,88, e 4º: $p<0,01$), porém em nenhum dos dias de teste os animais administrados com $A\beta_{1-42}$ foram tão rápidos ou erraram tanto quanto os controles (latência: 2º: $p<0,05$, 3º: $p<0,001$ e 4º dia: $p<0,0001$; Erros: 1º: $p<0,05$, 2º: $p<0,05$, 3º: $p<0,001$ e 4º dia: $p<0,05$). Os tratamentos com lítio e memantina isoladamente conseguiram reverter esse dano do $A\beta_{1-42}$ na memória espacial, o lítio a partir do 2º dia, sendo todos os dias comparados ao 1º (latência e erros: $p<0,001$), e a memantina apenas a partir do 3º dia (latência: $p<0,0001$; Erros: $p<0,01$), e ambos os tratamentos foram mais rápidos que o 4º dia do modelo (tempo: $p<0,005$; Erros: $p<0,001$). Já a associação reduziu a latência para encontrar a recompensa apenas a partir do 3º dia ($p<0,05$) e 4º ($p<0,005$) para o tempo de latência e não houve diferença entre os dias quando observados os erros. Porém, os animais já apresentaram uma performance melhor desde o 1º dia quando

comparado com o peptídeo, sendo 1º dia (latência: $p < 0,05$; erros: $p < 0,01$), 2º e 3º (latência e erros: $p < 0,01$) e 4º (tempo: $p < 0,05$). Assim, a associação parece ter sido melhor que os tratamentos isolados, já que desde o segundo dia os animais mostraram uma redução da latência e dos erros quando comparados ao modelo, e além disso, já no primeiro dia estes animais aprenderam mais rápido a tarefa, mostrando uma melhor performance cognitiva.

Figura 1

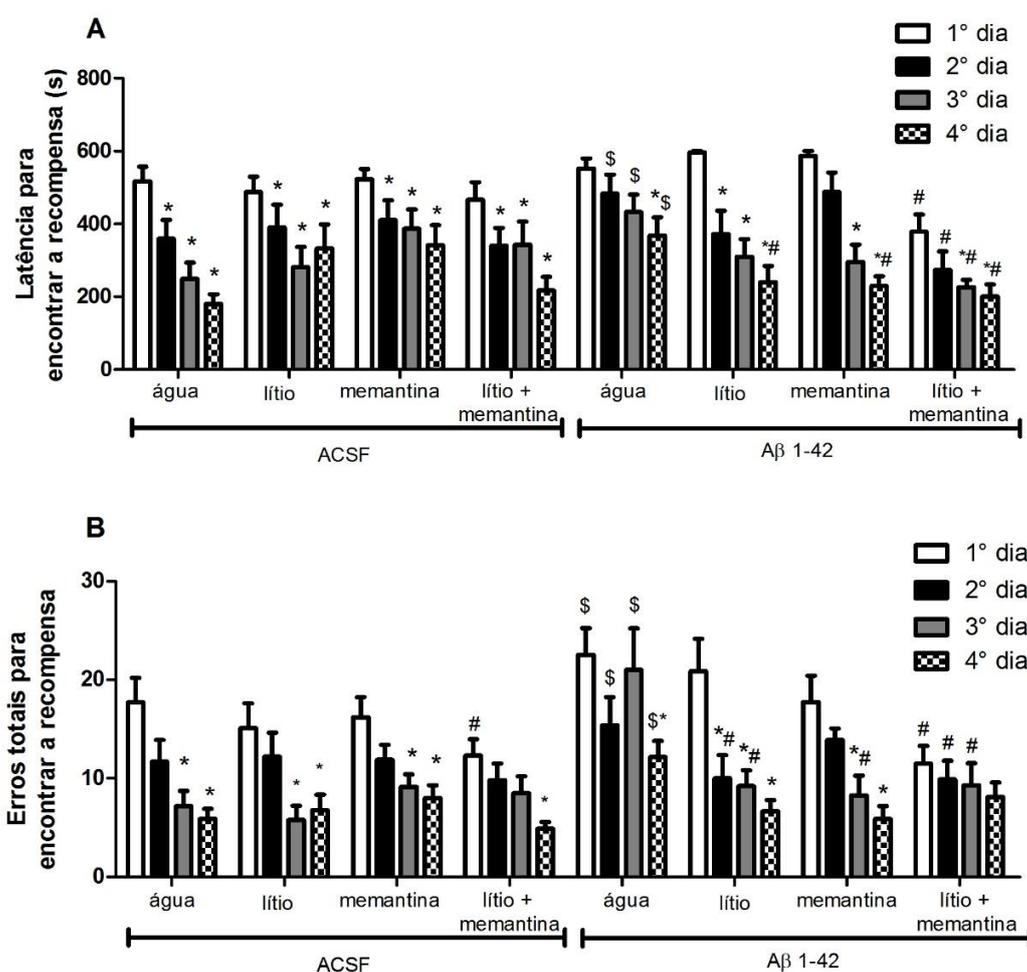


Figura 1: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste do labirinto octogonal realizado em ratos *Wistar* administrados com A β ₁₋₄₂. A figura (A) mostra a latência para encontrar as recompensas em segundos e a figura (B) mostra os erros totais de entrada nos braços cometidos pelos animais até encontrar as recompensas. Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 9-11 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao primeiro dia de teste do respectivo grupo, # $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo dia de teste do grupo A β ₁₋₄₂+água, e \$ $p < 0,05$ quando comparado respectivo dia de teste do grupo ACSF+água.

A figura 2A mostra o erro de memória de referência a qual foi analisada por ANOVA de duas vias. Observou-se que houve interação entre a administração do $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [$F(3,70) = 4,44, p < 0,005$], sendo que o teste *post hoc* de Duncan apontou que a administração do peptídeo $A\beta_{1-42}$ causou danos de memória espacial de referência nos animais quando comparado o último dia de teste com o controle ($p < 0,001$) e que o tratamento com lítio e memantina isoladamente conseguiu reverter o dano observado ($p < 0,005$) e ainda mais significativamente a associação ($p < 0,0001$). A figura 2B mostra os erros de memória de trabalho, o qual houve interação entre a administração do $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [$F(3,70) = 3,77, p < 0,05$], sendo que no 4º dia o modelo retornou mais vezes aos braços onde já tinha ingerido a comida quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e o tratamento com memantina ($p < 0,05$) e ainda mais significativo a associação lítio e memantina ($p < 0,001$).

Figura 2

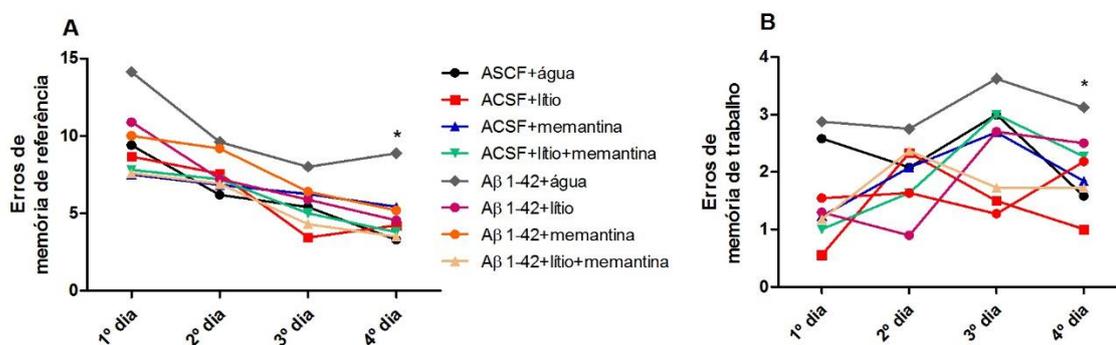


Figura 2: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina no teste de labirinto octogonal realizado em ratos *Wistar* administrados com $A\beta_{1-42}$. A figura (A) mostra o número de entradas em braços que não continham recompensa, os quais foram considerados erros de memória de referência; e a figura (B) mostra o número de entradas em braços que a recompensa já tinha sido ingerida anteriormente, considerados erros de memória de trabalho. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os estão expressos como média \pm erro padrão da média de 9-11 animais por grupo. (A) * $p < 0,05$ quando comparado o quarto dia de teste com todos os outros grupos. (B) * $p < 0,05$ quando comparado o quarto dia de teste com o controle e o modelo tratado com memantina ou associação.

Foi analisado por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* Duncan a citocina IL-4, IL-1 β e TNF- α no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos à administração do peptídeo $A\beta_{1-42}$ e tratados com lítio, memantina ou

associação destes. A figura 3A mostra os níveis de IL-4 no córtex frontal. Quando analisado por ANOVA foi observado interação entre a administração do $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [$F(3,25) = 9,07, p < 0,001$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a administração do peptídeo $A\beta_{1-42}$ reduziu os níveis da IL-4 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). O tratamento com lítio ($p < 0,05$), memantina ($p < 0,0001$) e associação destes ($p < 0,0001$) conseguiu elevar novamente os níveis da IL-4, sendo que esses dois últimos apresentaram níveis de IL-4 maiores inclusive que o controle ($p < 0,05$). No hipocampo (figura 3B), também foi observado interação entre a administração com $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [$F(3,25) = 8,94, p < 0,001$], e a administração do $A\beta_{1-42}$ também reduziu IL-4 ($p < 0,05$), porém, apenas o tratamento com memantina ($p < 0,001$) e associação de lítio e memantina ($p < 0,001$) reverteram essa diminuição, igualando novamente aos níveis do grupo controle.

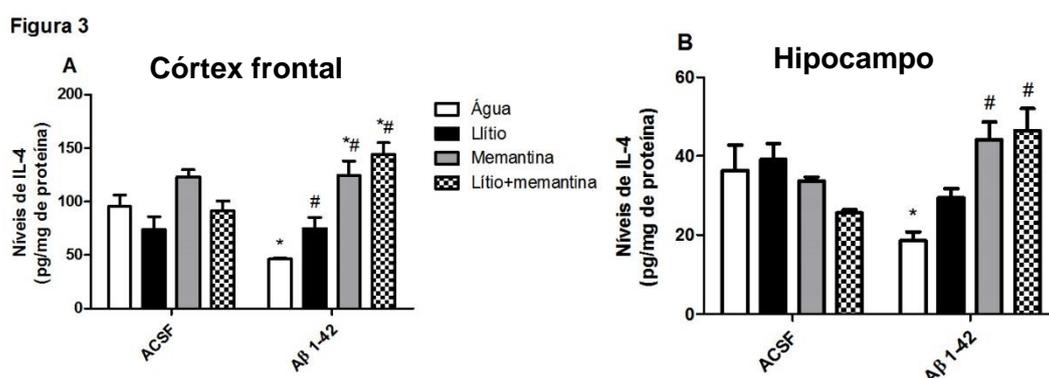


Figura 3: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-4 em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos *Wistar* administrados com peptídeo $A\beta_{1-42}$. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Duncan. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo $A\beta_{1-42}$ +água.

Quando avaliada a IL-1 β (figura 4A) no córtex frontal a ANOVA de duas vias observou-se interação entre a administração do peptídeo $A\beta_{1-42}$ e o tratamento [$F(3,24) = 2,88, p < 0,05$]. Assim, nos animais que receberam o $A\beta_{1-42}$ houve um aumento desta citocina quando comparado aos animais controle ($p < 0,01$) e este aumento foi revertido pelo tratamento com lítio ($p < 0,05$) memantina ($p < 0,001$) e a associação de ambos ($p < 0,001$). Estes dois últimos tratamentos reduziram esta citocina a níveis menores que o do grupo controle ($p < 0,05$). No hipocampo, o

ANOVA mostrou que a IL-1 β (figura 4B) também apresentou interação [F (3,28) =2,86, $p < 0,05$], o qual, a administração do A β ₁₋₄₂ aumentou os níveis desta citocina quando comparado aos animais controle ($p < 0,05$) e o tratamento com lítio, memantina e associação de ambos reverteram este aumento ($p < 0,001$). Vale ressaltar que quando avaliado a IL-1 β em ambas estruturas, os tratamentos *per se*, causaram diminuição desta citocina quando comparados aos animais controle tratados com água. Talvez os tratamentos possam reduzir os níveis fisiológicos desta citocina, ou então, especula-se que a cirurgia estereotáxica, por ser uma cirurgia invasiva, possa ter ocasionado aumento de IL-1 β , uma vez que, foi observado este mesmo efeito quando avaliado o TNF- α no hipocampo (estrutura a qual é fixada a cânula guia). Os tratamentos desta forma, teriam conseguido reduzir também a inflamação ocasionada pela cirurgia. Contudo, é importante mencionar que os animais que apresentaram sinais ou foram constatados com encefalite no momento da eutanásia, foram imediatamente excluídos do estudo.

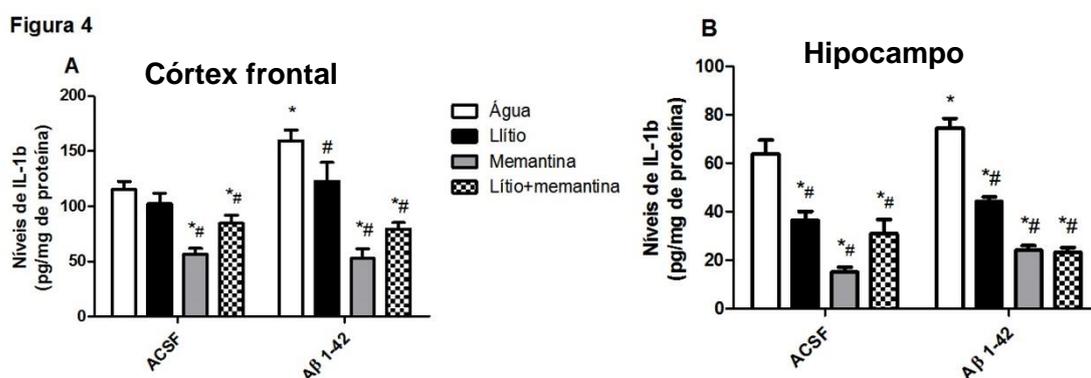


Figura 4: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina IL-1 β em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos *Wistar* administrados com peptídeo A β 1-42. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo A β ₁₋₄₂+água.

A figura 5A mostra os níveis de TNF- α no córtex frontal, o qual não houve interação no ANOVA de duas vias [F (3,28) =0,38, $p = 0,76$], não havendo diferença entre os grupos. No hipocampo (figura 5B) houve interação [F (3,25) =3,451, $p < 0,05$], porém a administração do peptídeo A β ₁₋₄₂ não aumentou os níveis de TNF- α quando comparado aos animais controle ($p = 0,45$). Porém o tratamento com lítio,

memantina e associação de ambos, conseguiu reduzir os níveis desta citocina nos animais controle ($p < 0,001$) e nos animais administrados com $A\beta_{1-42}$ ($p < 0,001$). Novamente não se pode afirmar se o efeito da medicação deu-se por redução dos níveis fisiológicos de TNF- α ou reverteram o dano ocasionado pela própria cirurgia.

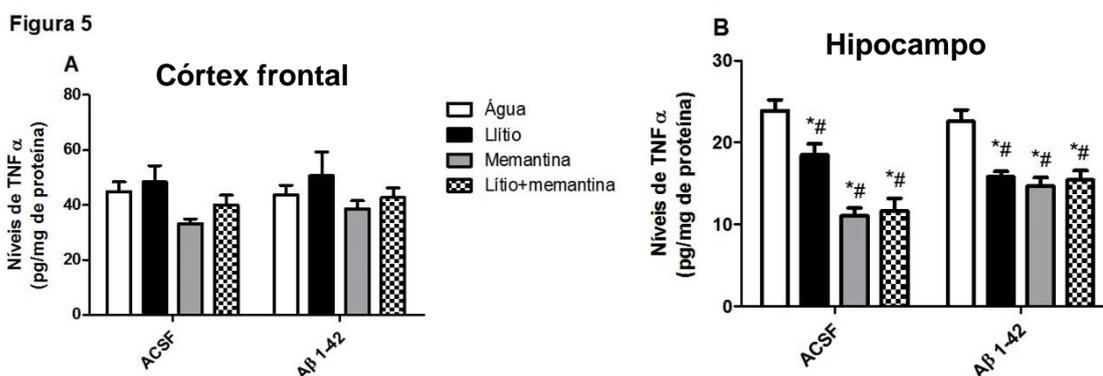


Figura 5: Efeito do lítio (5mg/kg), memantina (5mg/kg) ou associação de lítio e memantina nos níveis da citocina TNF α em córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos *Wistar* administrados com peptídeo $A\beta_{1-42}$. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo $A\beta_{1-42}$ +água.

5 DISCUSSÃO

Considerando-se que o declínio cognitivo e o déficit da memória visuoespacial são sintomas clínicos da DA (KASKIE; STORANDT, 1995), o déficit de aprendizagem e memória espacial foi relatado em estudos com camundongos transgênicos da APP/PS1 modelo de DA (HSIAO et al., 1996; MORGAN et al., 2000; KIYOTA et al., 2011), no qual o presente estudo confirmou que a administração i.h. do peptídeo A β ₁₋₄₂ em ratos modelo de demência, levou ao dano de memória espacial, visto que o peptídeo A β causa toxicidade à célula induzindo danos cognitivos em humanos e roedores (HERRUP, 2010; JOHNSON et al., 2012), uma vez que, o depósito A β é a maior característica patológica da DA (JOHNSON et al., 2012). Portanto, modelos animais com administração do peptídeo A β são utilizados como modelos para estudar a DA, já que induzem dano no processo da aprendizagem e memória como na DA (SHANKAR et al., 2009; POZUETA; LEFORT; SHELANSKI, 2013).

Os efeitos do lítio analisados no presente estudo corroboram com achados da literatura em que mostram um possível papel protetor contra o declínio cognitivo em estudos pré-clínicos e clínico (NUNES; VIEL; BUCK, 2013; NUNES, 2015). O tratamento com 300 ug/dia com carbonato de lítio de pacientes com DA durante 15 meses, mostrou nenhuma diminuição do desempenho no teste do mini-exame do estado mental em comparação ao grupo que recebeu tratamento placebo, mostrando ser eficaz contra o declínio cognitivo em pacientes com diagnóstico clínico de DA (NUNES; VIEL; BUCK, 2013). Camundongos transgênicos da APP (modelo genético da DA) com ou sem tratamento com lítio (0,25 mg/kg) e WT (selvagem) ambos com 6 meses de idade, foram submetidos ao teste do labirinto de Barnes, no qual apresentaram uma redução significativa na latência para encontrar a caixa de fuga, mostrando que todos os animais nessa idade, tinham a capacidade de aprender a tarefa. Os camundongos modelo de DA, após 3 meses avaliados novamente, mostraram latências significativamente mais altas para encontrar a caixa de fuga quando comparado com o controle, sugerindo ter um dano de memória espacial. No entanto, 9 meses após, camundongos modelo de DA tratados com lítio durante 8 e 16 meses mantiveram a memória espacial do labirinto, e a latência para encontrar a caixa de fuga foi significativamente menor do que o grupo modelo de DA

que não recebeu tratamento. Esta é uma informação evidente como a dose baixa e crônica de lítio pode ser eficiente para melhorar a aprendizagem, a consolidação e recuperação da memória (NUNES, 2015). Além disso, Mury et al. (2015) mostraram que o lítio apresenta um importante efeito na retenção da memória de longo prazo e este efeito pode ser mediado pelo aumento da transcrição de membros da família da enzima fosfolipase A2 em ratos *Wistar*.

O presente estudo mostrou que a memantina também apresentou proteção contra o dano cognitivo induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-42}$. Camundongos transgênicos da APP/PS1 (modelo de DA) com 12 meses de idade, foram submetidos ao teste de esQUIVA passiva, labirinto aquático de Morris e teste da atividade locomotora, nos quais mostraram que estes animais apresentavam um déficit de memória. Porém, após o tratamento com memantina (5 mg/kg) durante 4 semanas, estes animais apresentaram uma melhora significativa na aprendizagem e memória em relação ao grupo WT (selvagem) que apenas recebeu água. Relatam também que estes mecanismos neuroprotetores induzidos pela memantina é pelo aumento da expressão do fator de crescimento derivado do nervo (NGF) (LIU et al., 2014), que é considerado uma neurotrofina essencial para a sobrevivência e plasticidade neuronal, contribuindo para a redução de depósitos de $A\beta$. NGF está intimamente relacionado com a memória e aprendizagem (MATRONE, et al., 2011). Além disso, outro estudo mostrou que ratos machos foram submetidos à injeção bilateral intracerebroventricular (i.c.v.) de estreptozotocina (3 mg/kg), a qual causou danos na memória destes animais quando avaliados no labirinto aquático de Morris. Porém, o tratamento com memantina (10 mg/kg) durante 13 dias reduziu significativamente este efeito (RAI et al., 2013).

Os dados do presente trabalho também mostraram que o tratamento combinado com lítio e memantina apresentou uma performance cognitiva muito melhor em relação ao grupo $A\beta_{1-42}$ +lítio e $A\beta_{1-42}$ +memantina. Portanto, a associação entre lítio e memantina parece ser uma alternativa terapêutica a ser investigada para a DA no dano cognitivo. Esta abordagem é muito válida neste trabalho, pois a memantina não é totalmente eficaz na DA (SMITH, 2009). Então, está tendo um grande interesse em se investigar e aplicar associações entre fármacos envolvendo a memantina para potencializar a resposta terapêutica de pacientes com a DA. Entre estas associações encontram-se a combinação de memantina e inibidores da

acetilcolinesterase (RIVEROL; SLACHEVSKY; LÓPEZ, 2011; GAUTHIER; MOLINUEVO, 2013), e pela primeira vez, associando com um inibidor da GSK-3, o lítio, indicando uma nova terapia combinada promissora para a DA.

A inflamação é um mecanismo que contribui na progressão da DA, (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015), no qual o presente estudo mostrou que a administração do peptídeo A β ₁₋₄₂ em ratos modelo de demência, induziu a neuroinflamação. Um estudo realizado com monócitos na presença de um mitógeno expostos ao lítio por 5 dias mostrou um aumento na produção da IL-4 secretada por linfócitos Th2 e uma atenuação na produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas por linfócitos Th1 (RAPAPORT; MANJI, 2001). A administração i.h. de IL-4 em camundongos APP transgênicos, mostrou uma redução significativa de astrócitos e micróglia, sugerindo que esta citocina anti-inflamatória pode atenuar a neuroinflamação induzido pelos peptídeos A β , além de que, dados demonstram que a expressão neuronal da IL-4 pode aumentar o número de neurônios recentemente sintetizadas, podendo estar envolvidos na recuperação, aquisição e recordação da memória, possivelmente por aumentar a fosforilação da subunidade NR2B do receptor NMDA, aumentando sua expressão, *in vitro* (KYIOTA, et al., 2010). O tratamento crônico com cloreto de lítio em concentrações sub-terapêuticas (0,02; 0,2 e 2 mM) foram capazes de modificar a secreção de interleucinas pró e anti-inflamatórias em culturas de neurônios corticais e do hipocampo com células gliais (DE PAULA, et al., 2016).

O presente estudo mostrou que a memantina também apresentou proteção contra o processo inflamatório induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₂. A administração crônica de memantina (5, 10 e 20 mg/kg) em camundongos transgênicos da APP/PS1 (Tg2576), obteve uma diminuição significativa na deposição das placas A β e aumento da densidade sináptica no córtex e hipocampo (DONG et al., 2008), e redução dos níveis corticais da APP (UNGER et al., 2006). A administração i.h. do peptídeo A β em ratas, posteriormente tratadas subcronicamente com memantina (1 e 30 mg/kg), reduziu a ativação crônica das micróglia, evitou-se a apoptose e conseqüentemente a perda neuronal na região CA1 do hipocampo (HIDALGO et al., 2002). Em camundongos transgênicos de receptores de células T submetidos ao tratamento com memantina (1, 3, 5, 10, 20 e 30 μ M) reduziu significativamente a proliferação de células T diretamente

proporcional à concentração, incluindo a forte inibição de resposta proliferativa de células T CD4⁺ (auxiliares) (KAHLFUß et al., 2012), e conseqüentemente a diminuição da secreção de citocinas. Então, os dados do presente estudo indicam que lítio, memantina e a associação promoveu aumento dos níveis de IL-4 no cérebro de ratos, revertendo o efeito do A β ₁₋₄₂, mas a associação não teve um efeito melhor.

O presente estudo mencionou os efeitos anti-inflamatórios da memantina em atenuar os parâmetros inflamatórios que aumentaram devido a administração i.h. do peptídeo A β ₁₋₄₂. Em ratos submetidos a inflamação induzida pela morfina, houve um aumento de IL-1 β no soro, no qual o tratamento com uma dose baixa de memantina (0,2 e 1,0 mg/kg) reverteu significativamente este aumento (CHEN et al., 2013). Em um estudo, ratos machos foram submetidos a injeção bilateral i.c.v. de estreptozotocina (3 mg/kg) para avaliar a neuroinflamação e alterações nas subunidades do receptor NMDA, no qual estes animais apresentaram um aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex, em comparação com o grupo controle que recebeu ACSF. Após o tratamento com memantina (10 mg/kg) v.o. durante 13 dias, houve uma reversão deste aumento das citocinas IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex em relação ao grupo controle (CHAI et al., 2013). Baseando-se que o potencial de ação de longo prazo no hipocampo está prejudicado em idosos, foi realizado um estudo no qual analisaram o hipocampo de ratos com 22 meses de idade, no qual observaram uma significativa correlação inversa entre os níveis hipocâmpais da IL-1 β e IL-4. Então a diminuição dos níveis da IL-4, devido suas propriedades anti-inflamatórias, pode contribuir para um aumento significativo dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β (NOLAN et al., 2005).

Estudos mostram que a memantina também pode reduzir a produção de TNF- α . Um estudo realizado durante 12 semanas com pacientes com transtorno do humor bipolar mostrou que os níveis séricos de TNF- α foram significativamente menores em pacientes que receberam a associação de ácido valpróico e memantina (5mg/dia) em relação aos pacientes que receberam ácido valpróico e placebo (LEE et al., 2014). O pré-tratamento com memantina (10 mg/kg) em camundongos atenuou a lesão pulmonar aguda induzida por LPS (10 mg/kg) e reduziu os níveis de TNF- α do lavado bronco-alveolar (MA et al., 2014). Corroborando com o presente

estudo em que a memantina foi capaz de reduzir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no córtex frontal e hipocampo.

Também foi relatado o efeito anti-inflamatório do lítio em células gliais (micróglias, astrócitos e oligodendrócitos) de ratos submetidos à inflamação induzida por LPS, no qual, o tratamento com lítio *in vitro* (1 e 10 mM) durante 6 horas, reduziu a produção da IL-1 β e TNF- α (NAHMAN; BELMAKER; AZAB, 2012). O tratamento com lítio *in vitro* (2 e 5 mM) também reduziu os níveis da IL-1 β que estavam aumentados devido ao estímulo com LPS em monócitos de pacientes saudáveis (KNIJFF et al., 2007). Ratos *Wistar* machos foram induzidos ao modelo de sepse por perfuração e ligação cecal e à altos níveis de endotoxina bacteriana, e após o tratamento com lítio (25 e 50 mg/kg) levou a uma diminuição dos níveis séricos do TNF- α , IL-1 β e IL-6 (ALBAYRAK et al., 2011).

Células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com agonistas (ácido lipóico, lipídeo sintético) de receptores *toll-like* na presença de SB216763, um inibidor específico da GSK-3, resultou em uma redução seletiva de 50-90% na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e interferon- γ (INF- γ) e uma redução de 60-80% dos níveis do TNF- α (MARTIN et al., 2005). O lítio, por ser um inibidor da GSK-3, pode suprimir a inflamação induzida por LPS, reduzindo a produção de TNF- α (WANG et al., 2009). Com isso, torna-se promissor o tratamento com lítio, pela interação de seus efeitos anti-inflamatórios e a inibição da GSK-3, uma vez que, a inibição da GSK-3 é um de seus principais mecanismos. Os dados do presente estudo mostraram um aumento de IL-1 β no modelo tipo DA e foi revertido pelo tratamento de lítio, memantina e associação de ambos, levando a uma redução maior desta citocina em relação aos animais controle que receberam água. Contudo, a associação não teve efeito melhor quando comparado aos animais tratado com lítio ou memantina. Portanto, parece que este efeito envolve o aumento dos níveis de IL-4 (NOLAN et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o tratamento subcrônico com lítio, memantina e a associação com lítio e memantina reverteram o dano na memória espacial dos animais administrados com peptídeo A β ₁₋₄₂. Contudo, o tratamento combinado de lítio e memantina teve melhor performance cognitiva em relação aos outros grupos experimentais, indicando um efeito terapêutico promissor da associação para a DA. Foi observado também que o efeito protetor do lítio, memantina e sua associação com lítio estão envolvidos na redução da inflamação. A melhor performance cognitiva da associação, observado no comportamento, não é justificada pelo efeito anti-inflamatório, pois embora a memantina e o lítio apresentaram um efeito anti-inflamatório contra a inflamação causada pelo peptídeo A β ₁₋₄₂, a associação não potencializou este efeito. Portanto, os resultados indicam que o lítio e sua associação com memantina podem ser futuras alternativas terapêuticas para a DA.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, N. T. et al. Mild cognitive impairment in different functional domains and incident Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 76, n. 11, p. 1479–1484, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1739422/pdf/v076p01479.pdf>> Acesso em: 08 maio 2016.
- ALBAYRAK A. et al. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. **Internacional Immunopharmacology**, v.16, n. 1, p. 35–40, may 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576913001112>> Acesso em: 28 maio 2016.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, United States, v.7, n. 2, p. 208-244, mar. 2011. Disponível em: <[http://www.alzheimersanddementia.com/article/S1552-5260\(11\)00036-7/pdf](http://www.alzheimersanddementia.com/article/S1552-5260(11)00036-7/pdf)> Acesso em: 16 ago. 2015.
- ANTONIO, V. E.; SIQUEIRA-BATISTA, R. **Neurociências: diálogos e interseções**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. 740 p.
- BADDELEY, A. D. Is working memory still working? **The American Psychologist**, v. 56, n. 11, p. 851-864, nov. 2001. Disponível em: <<http://psycnet.apa.org/index.cfm?fa=buy.optionToBuy&id=2006-22404-001>> Acesso em: 08 maio 2016.
- BADDELEY, A. D. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p. 1-29, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-psych-120710-100422>> Acesso em: 08 maio 2016.
- BASSELIN, M. et al. Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 3, p. 761-772, feb. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2007.04593.x/epdf>> Acesso em: 18 out. 2015.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, England, v. 368, n. 9533, p. 387-403, jul. 2006. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)69113-7/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)69113-7/abstract)> Acesso em: 08 maio 2015.
- BORDJI, K.; BECERRIL-ORTEGA, J.; BUISSON, A. Synapses, NMDA receptor Activity and neuronal A β production in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, Boston, v. 22, n. 3, p. 285–294, 2011. Disponível em: <<file:///C:/Users/HP/Downloads/rns.2011.029.pdf>> Acesso em: 01 set. 2015.

BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-32, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034722/>> Acesso em: 20 maio 2016.

BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways pathogenesis and therapy. **Nature Neuroscience**, United States, v.10, p. 333-344, may. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrn/journal/v10/n5/full/nrn2620.html>> Acesso em: 23 ago. 2015.

CAMINS, A. et al. Potential Mechanisms Involved in the Prevention of Neurodegenerative Diseases by Lithium. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 333–344, nov. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-5949.2009.00086.x/epdf>> Acesso em: 01 out. 2015.

CHAKRABARTY, P. et al. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. **Molecular Neurodegeneration**, v. 7, n. 36, jul. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3441281/>> Acesso em: 22 maio 2016.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 96, n. 15, p. 8745-8750, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC17587/pdf/pq008745.pdf>> Acesso em: 29 set. 2015.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 13, 14 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/6/586/htm>> Acesso em: 27 junho 2016.

CHEN, S. L. et al. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 444-453, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3611110/>> Acesso em: 04 maio 2016.

CHRISTENSEN, R. et al. A β_{1-42} injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT_{2A} levels. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p.164–171, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488607003986>> Acesso em: 17 out. 2015.

DE PAULA, V. J. et al. Lithium distinctly modulates the secretion of pro- and anti-inflammatory interleukins in co-cultures of neurons and glial cells at therapeutic and sub-therapeutic concentrations. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 12, feb. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892291>> Acesso em: 25 maio 2016.

DONG, H. et al. Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 13, p. 3226-3236, dec. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664647/pdf/nihms95121.pdf>> Acesso em: 25 maio 2016.

FARLOW, M. R.; CUMMINGS, J. L. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 5, p. 388-397, may. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934307001660>> Acesso em: 18 set. 2015.

FERREIRA, S. T. et al. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. S76-S83, feb. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526013029245>> Acesso em: 07 out. 2015.

FLODEN, A. M.; LI, S.; COMBS, C. K. β -Amyloid-Stimulated Microglia Induce Neuron Death via Synergistic Stimulation of Tumor Necrosis Factor and NMDA Receptors. **The Journal of Neuroscience**, Netherlands, v. 25, n. 10, p. 2566-2575, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/25/10/2566.full.pdf+html>> Acesso em: 01 out. 2015.

FORLENZA, O. V.; DE-PAULA, V. J. R.; DINIZ, B. S. O. Neuroprotective Effects of Lithium: Implications for the Treatment of Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. **American Chemical Society Chemical Neuroscience**, United States, v. 5, n. 6, p. 443-450, apr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063497/pdf/cn5000309.pdf>> Acesso em: 22 jan. 2016.

FOYET, H. S. et al. Methanolic extract of Hibiscus asper leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. **Journal Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 773-779, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000783X>> Acesso em: 14 out. 2015.

FRANCIS, R. et al. APH-1 and PEN-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of beta APP, and presenilin protein accumulation. **Developmental Cell**, v. 3, n. 1, p. 85–97, jul. 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1534580702001892/1-s2.0-S1534580702001892-main.pdf?_tid=268765ee-51d4-11e5-8f3d-00000aacb362&acdnat=1441240912_2c81229ccb4dcc5cd8e1afa409177b7> Acesso em: 02 set. 2015.

GALIMBERTI, D.; SCARPINI E. Progress in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology**, United States, v. 259, n. 2, p. 201-211, feb. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00415-011-6145-3>> Acesso em: 16 ago. 2015.

GAUTHIER, S.; MOLINUEVO, J. L. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 3, p. 326-331, may. 2013. Acesso em: 04 junho 2016.

GELDMACHER, D. S. Alzheimer's disease: current pharmacotherapy in the context of patient and family needs. **Journal American Geriatrics Society**, v. 51, n. 5s2, p. S281-S325, may 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2389.2003.5154.x/abstract>> Acesso em: 19 set. 2015.

GREENAMYRE J. T.; YOUNG A. B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, United States, v. 10, n. 5, p. 593-602, oct. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2554168>> Acesso em: 01 set. 2015.

HAASS, C. et al. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. a006270, feb. 2012. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/5/a006270.full>> Acesso em: 01 set. 2015.

HAASS, C. Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta peptide generation. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 483-488, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1271800/pdf/7600061a.pdf>> Acesso em: 02 set. 2015.

HENEKA, M.T.; KUMMER M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463-477, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/nri/journal/v14/n7/full/nri3705.html>> Acesso em: 06 out. 2015.

HENEKA, M. T.; O'BANION, M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1-2, p. 69-91, jan. 2007. Disponível em: <[http://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(06\)00470-X/pdf](http://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(06)00470-X/pdf)> Acesso em: 29 out. 2015.

HENSLEY, K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 21, n. 1, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792565/pdf/nihms514132.pdf>>
Acesso em: 30 set. 2015.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 358-372, may 2015. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nrn/journal/v16/n6/full/nrn3880.html>> Acesso em: 25 maio 2016.

HIDALGO, M. J. J. et al. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid (1-40). **Brain Research**, v. 958, n. 1, p. 210-221, dec. 2002. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899302037319>> Acesso em: 25 maio 2016.

HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, vol. 104, n. 6, p.1433-1439, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x/epdf>> Acesso em: 17 set. 2015.

HRITCU, L.; CIOANCA, O.; HANCIANU, M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats.

Phytomedicine, v. 19, n. 6, p. 529-534, apr. 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711312000414>> Acesso em: 14 out. 2015.

HSIAO, K. et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. **Science**, New York, v. 274, n. 5284, p. 99-102, oct. 1996.

Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/274/5284/99.long>> Acesso em: 01 junho 2016.

HU, N. W.; ONDREJCAK, T.; ROWAN, M. J. Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: update on recent advances. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 100, n.4, p. 855-862, 2012. Disponível em:

<http://ac.els-cdn.com/S0091305711001237/1-s2.0S0091305711001237main.pdf?_tid=2bc3eb56-4ffc-11e5-b8f6-00000aacb362&acdnat=1441038199_3c47b3318bfc01084553dc6f55203792>. Acesso em: 01 set. 2015.

HUSSAIN, I. et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 419-427, 1999.

Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1044743199908114/1-s2.0-S1044743199908114-main.pdf?_tid=d09948da-5e28-11e5-a8fa-00000aab0f01&acdnat=1442596689_cc409cb0b598259a9b8e52f7d1d954b2>
Acesso em: 02 set. 2015.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 133 p.

JOHNSON, K. A. et al. Brain Imaging in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 4a006213, apr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312396/>> Acesso em: 05 junho 2016.

KAHLFUß, S. et al. Immunosuppression by N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of Kv1.3 and KCa3.1 channels in T cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 5, p. 820-831, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023824/>> Acesso em: 25 maio 2016.

KARL, H. Re-imagining Alzheimer's disease – an age-based hypothesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 16755-16762, dec. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004746/>> Acesso em: 05 junho 2016.

KANG, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, p. 733-736, feb. 1987. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v325/n6106/pdf/325733a0.pdf>> Acesso em: 01 set. 2015.

KARMAZYN, M.; MANKU, M. S.; HORROBIN, D. F. Changes of vascular reactivity induced by low vasopressin concentrations: interactions with cortisol and lithium and possible involvement of prostaglandins. **Endocrinology**, v. 102, n. 4, p. 1230-1236, apr. 1978. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/endo-102-4-1230>> Acesso em: 01 maio 2016.

KASKIE, B.; STORANDT, M. Visuospatial deficit in dementia of the Alzheimer type. **Archives of Neurology**, v. 52, n. 4, p. 422–425, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7710379>> Acesso em: 01 junho 2016.

KIGERL, K. A. et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. **Experimental Neurology**, v. 258, p. 5-16, aug. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488614000119>> Acesso em: 28 maio 2016.

KIYOTA, T. et al. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP + PS1 bigenic mice. **The Journal of the Federation American of Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 8, p. 3093–3102, aug. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909296/>> Acesso em: 22 maio 2016.

KNIJFF, E. M. et al. An imbalance in the production of IL-1beta and IL-6 by monocytes of bipolar patients: restoration by lithium treatment. **Bipolar Disorders**, v. 9, n. 7, p. 743–753, nov. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-5618.2007.00444.x/full>> Acesso em: 26 maio 2016.

KREIDER, T., et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 448-453, aug. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000338/>> Acesso em: 22 maio 2016.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. Animal models of Alzheimer's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, California, v. 2, n. 11, p. a006320, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543097/pdf/cshperspectmed-ALZ-a006320.pdf>> Acesso em: 17 ago. 2015.

LATTA, C. H. et al. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid- β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 41, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350455/>> Acesso em: 22 maio 2016.

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 178, n. 1, p. 44-51, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X01993202>> Acesso em: 14 out. 2015

LEAL, R. B. et al. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, v. 77, p. 98-104, 2006. Disponível em: <<http://www.lapad.ufsc.br/PDF/pdf0052.pdf>> Acesso em: 13 out. 2015.

LEE, S. Y. et al. The effects of add-on low-dose memantine on cytokine levels in bipolar II depression: a 12-week double-blind, randomized controlled trial. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 337-343, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717258>> Acesso em: 28 maio 2016.

LEIFER B. P. Alzheimer's disease: Seeing the signs early. **American Academy of Nurse Practitioners**, v. 21, n. 11, p. 588-595, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900220>> Acesso em: 21 maio 2016.

LI, B. Y.; TANG, H. D.; CHEN, S. D. Retrieval Deficiency in Brain Activity of Working Memory in Amnesic Mild Cognitive Impairment Patients: A Brain Event-Related Potentials Study. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. 54, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4803731/>> Acesso em: 08 maio 2016.

LIU, M. Y. et al. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice. **Neuroscience**, v. 273, p.141-151, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846616>> Acesso em: 18 out. 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n. 1, p. 265-275, may. 1951. <<http://www.jbc.org/content/193/1/265.long>> Acesso em: 16 out. 2015.

MA, L. et al. Protective effect of NMDA receptor antagonist memantine on acute lung injury in mice. **Journal of Central South University Medical Sciences**, China, v. 39, n. 1, p. 12-16, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473380>> Acesso em: 28 maio 2016.

MARTIN, M. et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nature Immunology**, v. 6, n. 8, p. 777–784. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933525/>> Acesso em: 28 maio 2016.

MARTINEZ, A.; PEREZ, D. I. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 15, n. 2, p. 181-191, oct. 2008. Disponível em: <<http://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad00888>> Acesso em: 17 set. 2015.

MATRONE, C. et al. APP is phosphorylated by TrkA and regulates NGF/TrkA signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 33, p. 11756-11761, aug. 2011. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/31/33/11756>> Acesso em: 01 junho 2016.

MILLINGTON, C. et al. Chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease: new perspectives on animal models and promising candidate drugs. **Biomed Research International**, United States, v. 2014, n. 309129, jun. 2014. Disponível em: <<file:///C:/Users/HP/Downloads/309129.pdf>> Acesso em: 08 out. 2015.

MINOGUE, A. M. et al. Activation of the c-Jun N-terminal Kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid- β on long term potentiation and cell death in hippocampus: A role for interleukin-1 β ? **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27971-27980, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/278/30/27971.long>> Acesso em: 28 maio 2016.

MORGAN, D. et al. A beta vaccination prevents memory loss in na animal model of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 982-985, dec. 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6815/full/408982a0.html>> Acesso em: 01 junho 2016.

MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 3, p. 349–354, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458004002921>> Acesso em: 29 maio 2016.

MURY, F. B. et al. Lithium activates brain phospholipase A2 and improves memory in rats: implications for Alzheimer's disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, dec. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00406-015-0665-2>> Acesso em: 06 junho 2016.

NAHMAN, S.; BELMAKER, R.H.; AZAB, A. N. Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells. **Innate immunity**, v. 18, n. 3, p. 447-458, jun. 2012. Disponível em:

<file:///C:/Users/HP/Downloads/effects%20of%20lithium%20on%20lipopolysaccharide%20induced%20inflammation%20in%20rat%20primary%20glia%20cells.pdf>

Acesso em: 15 out. 2015.

NOLAN, Y. et al. Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9354-9362, mar. 2005. Disponível em:

<<http://www.jbc.org/content/280/10/9354.long>> Acesso em: 26 maio 2016.

NONAKA, S.; HOUGH, C. J.; CHUANG, M. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. **Neurobiology**, United States of America, v. 95, n. 5, p. 2642–2647, mar. 1998. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/content/95/5/2642.full.pdf>> Acesso em: 18 out. 2015.

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, nov. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659557/>> Acesso em: 29 maio 2016.

NUNES, M. A.; VIEL, T. A.; BUCK, H. S. Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. **Currency Alzheimer Research**, v. 10, n. 1, p. 104-107, jan. 2013. Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/106398/article>> Acesso em: 30 maio 2016.

PACKARD, M. G.; WHITE, N. M. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists.

Behavioral neuroscience, v. 105, n. 2, p. 295-306, apr. 1991. Disponível em:

<<http://psycnet.apa.org/index.cfm?fa=buy.optionToBuy&id=1991-20787-001>>

Acesso em: 18 out. 2015.

PASQUIER, F. et al. Memory impairment differs in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. **Neurocase**, v. 7, n. 2, p. 161-171, 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320163/>> Acesso em: 08 maio 2016.

PERRIN, R. J.; FAGAN, A. M.; HOLTZMAN, D. M. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, United States, v. 461, n. 7266, p. 916–922, oct. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810658/pdf/nihms-169707.pdf>>

Acesso em: 21 ago. 2015.

PHIEL, C. J. et al. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **Nature**, v. 423, p. 435–439, apr. 2003. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6938/full/nature01640.html>> Acesso em: 15 set. 2015.

POZUETA, J.; LEFORT, R.; SHELANSKI, M. L. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. **Neuroscience**, v. 251, p. 51-65, out. 2013. Acesso em: 04 junho 2016.

RADEMAKERS, R.; CRUTS, M.; BROECKHOVEN, C. V. Genetics of Early-Onset Alzheimer Dementia. **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 497-519, jun. 2003. Disponível em: <file:///C:/Users/HP/Downloads/586028.pdf> Acesso em: 09 maio 2016.

RAI, S. et al. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (icv) induced memory impaired rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 254, n. 1-2, p. 1-9, jan. 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/HP/Downloads/Rai%20et%20al%202013.pdf> Acesso em: 01 junho 2016.

RAPAPORT, M. H.; MANJI, H. K. The effects of lithium on ex vivo cytokine production. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 3, p. 217-224, aug. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322301011441?np=y>> Acesso em: 01 maio 2016.

REISBERG, B. et al. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, United States, v. 348, n. 14, p. 1333-1341, apr. 2003. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa013128>> Acesso em: 20 set. 2015.

RIVEROL, M.; SLACHEVSKY, A.; LÓPEZ, O. L. Efficacy and tolerability of a combination treatment of memantine and donepezil for Alzheimer's disease: A Literature Review Evidence. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 15-19, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188475/>> Acesso: 06 junho 2016.

SALLOWAY, S.; CORREIA, S. Alzheimer disease: time to improve its diagnosis and treatment. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 76, n. 1, p. 49-58, jan. 2009. Disponível em: <http://www.ccm.org/viewpdf.html?file=fileadmin/content_pdf/ccjm/content_8edb32a_49> Acesso em: 19 set. 2015.

SALMINEN, A. et al. Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 87, n. 3, p. 181-194, feb. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Salminen+A%2C+Ojala+J%2C+Kauppi+n+A%2C+Kaarniranta+K%2C+Suuronen+T.+Inflammation+in+Alzheimer%27s+disease%3A+Amyloid%CE%B2+oligomers+trigger+innate+immunity+defence+via+pattern+recognition+receptors>> Acesso em: 28 maio 2015.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **American Physiological Society**, v. 81, n. 2, p. 741-766, apr. 2001. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/81/2/741.long>> Acesso em: 02 set. 2015.

SELKOE, D. J. Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 924, n. 9, p. 17-25, jan. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05554.x/pdf>> Acesso em: 22 fev. 2016.

SERRANO, P. A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, sep. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3234452/pdf/cshperspectmed-ALZ-a006189.pdf>> Acesso em: 16 ago. 2015.

SHANKAR, G. M. Amyloid β protein dimers isolated directly from Alzheimer brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature Medicine**, v. 14, n. 8, p. 837-842, aug. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772133/>> Acesso em: 06 junho 2016.

SMITH, D. A. Treatment of Alzheimer's disease in the long-term-care setting. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 10, p. 899-907, may. 2009. Acesso em: 06 junho 2016.

SOFOLA-ADESANKIN, O. et al. Lithium suppresses A β pathology by inhibiting translation in an adult Drosophila model of Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 190, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4115666/>> Acesso em: 29 set. 2015.

SPENCER J. P. E. et al. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 83-97, feb. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299711000732>> Acesso em: 30 set. 2015.

STEINER, H.; HAASS, C. Intramembrane proteolysis by presenilins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 217-224, dec. 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/nrm/journal/v1/n3/full/nrm1200_217a.html> Acesso em: 02 set. 2015.

SWARDFAGER, W. et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 68, n.10, p.930-941, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322310006013>> Acesso em: 07 out. 2015.

TAMPI, R. R.; DYCK, C. H. V. Memantine: efficacy and safety in mild to severe Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.3, n. 2, p. 245-258, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654628/pdf/NDT-3-245.pdf>> Acesso em: 01 out. 2015.

UNGER, C. et al. Effect of subchronic treatment of memantine, galantamine, and nicotine in the brain of Tg2576 (APP^{swe}) transgenic mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, p. 30-36, apr. 2006. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/317/1/30.long>> Acesso: 25 maio 2016.

VERKHRATSKY, A.; KIRCHHOFF, F. NMDA Receptors in glia. **Neuroscientist**, v. 13, n. 1, p. 28-37, 2007. Disponível em: <http://www.academia.edu/5659566/NMDA_Receptors_in_Glia> Acesso em: 26 ago. 2015.

VO, T. M. et al. Is lithium a neuroprotective agent? **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 27, n.1, p. 49-54, feb. 2015. Disponível em: <http://www.aacp.com/pdf%2F0215%2F0215ACP_Perry.pdf> Acesso em: 29 set. 2015.

WANG, Y. et al. Inhibiting glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating inflammation and renal cell apoptosis. **British Journal of Pharmacology**, United Kingdom, v. 157, n. 6, p. 1004–1013, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737659/>> Acesso em: 28 maio 2016.

WANG, H.; BROWN, J.; MARTIN, M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p.130-140, feb. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466610007234>> Acesso em: 17 set. 2015.

WENK, G. L.; PARSONS, C. G.; DANYSZ, W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. **Behavioural Pharmacology**, Germany, v. 17, n. 5&6, p. 411–424, mai. 2006. Disponível em: <<http://faculty.psy.ohiostate.edu/wenk/documents/WenkBehavPharmacol2006.pdf>> Acesso em: 26 ago. 2015.

WHO - World Health Organization. **Dementia: A Public Health Priority**, Geneva, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458_eng.pdf> Acesso em: 11 set. 2015.

WU, H. M. et al. Novel Neuroprotective mechanisms of memantine: Increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial over-activation. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 10, p. 2344-2357, sep. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655438/pdf/nihms451859.pdf>> Acesso em: 05 maio 2016.

ZEKANOWSKI, C. et al. Genetic aspects of Alzheimer's disease. **Acta Neurobiologiae experimentalis**, Poland, v. 64, n. 1, p. 19-31, 2004.

Disponível em: <file:///C:/Users/HP/Downloads/ane_6403.pdf> Acesso em: 08 maio 2015.

ZHANG, F.; JIANG, L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 243-256, jan. 2015.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321665/pdf/ndt-11-243.pdf>> Acesso em: 30 set. 2015.

ZHAO, L. et al. Beneficial synergistic effects of microdose lithium with pyrroloquinoline quinone in an Alzheimer's disease mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 12, p. 2736–2745, dec. 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458014004047>> Acesso em: 18 out. 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Representação da carta-resposta da aprovação do CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 024/2015-1

Professora responsável: Josiane Budni

Equipe: João Luciano de Quevedo, José Mauro Moraes dos Santos, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Sabrina da Silva, Tatiani Bellettini, Erico Pigozzi Cassaro, Gustavo Luis Schiavo

Título: Verificar o Efeito Protetor da Associação do Lítio e Memantina ou Galantamina em um Modelo Animal de Doença de Alzheimer Induzido pelo Peptídeo A β 1-42.

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 360 Ratos Wistar machos, de 60 dias e pesando aproximadamente 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 024/2015-1

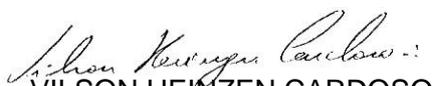
Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: João Luciano de Quevedo, José Mauro Moraes dos Santos, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Sabrina da Silva, Tatiani Bellettini, Erico Pigozzi Cassaro, Gustavo Luis Schiavo

Project title: Evaluation of protective effect of Lithium combined with Memantine or Galantamine on Animal Model of Alzheimer's Disease Induced by A β 1-42 Peptide.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 25 de março de 2015.


VILSON HEINZEN CARDOSO

Coordenador Adjunto da CEUA