



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Natalie Razuck Garrão

**Efeito da vareniclina na prevenção do déficit de memória e aprendizado em
um modelo animal de doença de Alzheimer**

Rio de Janeiro

2016

Natalie Razuck Garrão

Efeito da vareniclina na prevenção do déficit de memória e aprendizado em um modelo animal de doença de Alzheimer

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alex C. Manhães

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia C. Lisboa

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G238 Garrão, Natalie Razuck.
Efeito da vareniclina na prevenção do déficit cognitivo em um modelo de neurodegeneração / Natalie Razuck Garrão. – 2016.
124 f.

Orientador: Alex Christian Manhães.

Coorientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Doença de Alzheimer - Teses. 2. Memória - Fisiologia. 3. Vareniclina - Farmacocinética. 4. Vareniclina - Uso terapêutico. 5. Nicotina - Farmacocinética. 6. Nicotina - Uso terapêutico. I. Manhães, Alex Christian. II. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.894

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Natalie Razuck Garrão

Efeito da vareniclina na prevenção do déficit de memória e aprendizado em um modelo animal de doença de Alzheimer

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de agosto de 2016.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia C. Lisboa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alex C. Manhães (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Paula Campello Costa Lopes
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dr. Pablo Pandolfo
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Viviane Younes Rapozo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Àquele que está acima de todas as coisas, que me deu tudo e que eu amo mais que tudo. O Seu amor e a Sua misericórdia me alcançaram. Ao Senhor, meu lindo Jesus.

Ao meu amor Márcio Garrão, que cuida da minha vida, pastoreia meu coração e ouve minhas 20 mil palavras por dia. Obrigada pelo seu apoio, seu carinho, sua paciência, por me animar e sempre me lembrar que somos um nEle! Amo te amar!

Aos meus príncipes Benjamin e Joãozinho. O Senhor me deu vocês pra tornar os meus dias mais felizes. Vocês agitaram um tantinho todo esse período, mas por outro lado, deram todo o sentido a ele.

Aos meus pais que não medem esforços pra me ajudar, que me amam, me respeitam e são os melhores vovô e vovó do mundo. Obrigada pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Stephanie, Roberto e Eduardo, agora mais conhecidos como tia Teté, tio Betinho e Tio Dudu. Estamos ficando velhos, mas eu continuo amando vocês e querendo fazer parte de suas vidas. Obrigada por me amarem!

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa ao meu orientador Alex Manhães por fazer parte dessa jornada de uma forma especial. Obrigada pela confiança, por sua cumplicidade e empenho na construção desta Tese e também pela amizade, compreensão e apoio nas horas mais difíceis...

À minha querida Gabriela Skinner que teve uma participação incrível nesse trabalho. Não só na bancada, como discutindo milhões de coisas, me ajudando com milhões de contas, trabalhando milhões de finais de semana e ainda sendo amiga e companheira. Love u!

À aluna querida de iniciação científica Anaís, por ser tão aplicada e responsável.

Aos Professores Cláudio, Yael, Anderson e Thomas por esclarecerem minhas rotineiras dúvidas.

À Patrícia Lisboa, por sempre estar disponível. Pelo apoio e todos os sorrisos.

À querida Viviane Rapozo pela ajuda indispensável na imunohistoquímica. Obrigada por dedicar horas comigo ao microscópio e por contribuir com a revisão dessa tese!

À Ana Carolina Brito do Serviço de Anatomia Patológica da UERJ pelas milhares de tentativas com as minhas lâminas! Obrigada por toda contribuição com esse trabalho.

Aos meus colegas do lab que me animavam e alegravam meus dias de trabalho.

Até o pardal encontrou casa pra morar
E a andorinha já achou o seu lugar

Eu encontrei um castelo
Feito pela tua bondade
Sustentado pelo teu amor
Iluminado pela tua glória

Eli Soares

RESUMO

GARRÃO, Natalie Razuck. *Efeito da vareniclina na prevenção do déficit de memória e aprendizado em um modelo animal de doença de Alzheimer*. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A etiologia da doença de Alzheimer (DA), uma das doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC) mais comuns em indivíduos idosos, ainda não está completamente elucidada, mas já se sabe que seus sintomas estão relacionados à presença do peptídeo β -amilóide no cérebro e que seus efeitos patogênicos nesta estrutura induzem uma perda neuronal, principalmente nas regiões do hipocampo e do córtex frontal, estruturas fundamentais para as funções cognitivas de memória e aprendizado. Dentre as diversas abordagens terapêuticas que são propostas para pacientes com DA, nenhuma demonstrou-se claramente capaz de prevenir ou curar a doença. Dentre os tratamentos sintomáticos disponíveis temos os fármacos anticolinesterásicos que atuam aumentando a disponibilidade do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, levando a uma melhora do desempenho cognitivo. Também há relatos indicando que o consumo de nicotina, um agonista colinérgico, ao longo da vida pode retardar o surgimento da DA. A vareniclina, um fármaco agonista parcial dos receptores colinérgicos (nAChRs) $\alpha 4\beta 2$ e total dos nAChRs $\alpha 7$, é uma droga atualmente utilizada no tratamento da dependência à nicotina. Considerando-se o exposto, a hipótese desse estudo é que a vareniclina pode exercer um efeito neuroprotetor, preservando o desempenho de memória e aprendizado, em um modelo animal de neurodegeneração associado à doença de Alzheimer. Com o objetivo de testar esta hipótese, tratamos camundongos a partir do 76º dia de vida pós-natal (PN) com vareniclina nas doses 0,5 mg/kg/dia (VAR1) ou 2 mg/kg/dia (VAR2), ou ainda com nicotina na dose 5 mg/kg/dia. Em PN90, os animais foram submetidos à cirurgia para implantação de minibombas osmóticas preenchidas ou com peptídeo β -amilóide ou com solução controle (fluxo de 0,11 μ l/h durante 28 dias). O tratamento (gavagem) perdurou até o fim dos testes comportamentais em PN128. Os testes utilizados para avaliar os comportamentos associados à memória e aprendizado, locomoção, ansiedade e depressão foram: Esquiva Passiva, Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos, Suspensão pela Cauda e Labirinto em Cruz Elevado Modificado. Os cérebros foram coletados após os testes comportamentais para a verificação da presença de depósitos amilóides e de processos inflamatórios. Observamos que os animais que receberam a infusão do peptídeo β -amilóide que não foram tratados (VEH-A β) apresentaram deficiências de memória e aprendizado, já os animais que receberam um dos tratamentos (vareniclina ou nicotina) tiveram sua memória preservada. Os comportamentos associados à locomoção, depressão e ansiedade não foram afetados pela infusão do peptídeo β -amilóide. A análise histológica indicou, nos animais do grupo VEH-A β , a presença de depósitos de peptídeo A β na parede de artérias, caracterizando uma angiopatia amilóide e a presença de infiltrado inflamatório linfocítico perivascular na região do córtex. Verificamos ainda que o grupo VEH-A β apresentou características de processos inflamatórios ativados pela intensa marcação e morfologia típica de micróglia ativada. Em conclusão, demonstramos que o tratamento com vareniclina e nicotina é capaz de evitar as deficiências de memória e aprendizado em um modelo experimental de doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Alzheimer. Memória. Vareniclina. Nicotina.

ABSTRACT

GARRÃO, Natalie Razuck. *Effect of varenicline on the prevention of memory deficit and learning in an animal model of Alzheimer's disease*. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The etiology of the Alzheimer's disease (AD), the most frequently diagnosed degenerative disease of the central nervous system (CNS), is not yet fully understood, but it is known that their symptoms are related to the presence of the β -amyloid peptide in the brain and its pathogenic effects in this structure induces neuronal loss, mainly in regions of the hippocampus and frontal cortex, key structures in cognitive functions associated with memory and learning. Among the various therapeutic approaches that are proposed for patients with AD, none is clearly capable of preventing or curing the disease. Among the available symptomatic treatments, we have the anticholinesterasics, which increase the availability of the neurotransmitter acetylcholine at synapses, improving cognitive performance. There are also reports indicating that the consumption of the cholinergic agonist nicotine throughout life can delay the onset of AD. Varenicline, a partial agonist of cholinergic receptors (nAChRs) $\alpha 4\beta 2$ and total of $\alpha 7$ nAChRs, is a drug currently used to treat nicotine addiction. Considering the above, the hypothesis of this study is that varenicline can exert a neuroprotective effect, preserving memory and learning performance loss in an animal model of neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. In order to test this hypothesis, we treated mice from postnatal day (PND) 76 with varenicline at doses of 0.5 mg/kg/day or 2 mg/kg/day, or even with nicotine at a dose 5 mg/kg/day by gavage. On PND90, the animals underwent surgery for the implantation of osmotic mini-pumps filled either with β -amyloid peptide or with a control solution (flow 0.11 μ l/h for 28 days). Treatment lasted until the end of the behavioral tests on PND128. The tests used to evaluate the behaviors associated with memory and learning, locomotion, anxiety and depression were: Step down, Open Field, Object Recognition, Tail Suspension and Modified Elevated Plus Maze. The brains were collected after the behavioral tests to verify the presence of amyloid deposits and inflammatory processes. We observed that the animals that received an infusion of β -amyloid peptide and that were not treated (VEH-A β) presented memory and learning impairments. In the other hand, the animals that received one of the treatments (varenicline or nicotine) had its memory preserved. Behaviors associated with mobility, depression and anxiety were not affected by infusion of β -amyloid peptide. The histological analysis showed, in animals from VEH-A β group, the presence of A β peptide deposits on the wall of arteries, indicative of an amyloid angiopathy and also showed the presence of inflammatory reaction with perivascular lymphocytic infiltrate in the cortex. We also verified that the VEH-A β group showed features of inflammation as indicated by intense staining and typical morphology of the activated microglia. In conclusion, we demonstrated that treatment with either nicotine or varenicline can prevent memory and learning impairments in an experimental model of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer. Memory. Varenicline. Nicotine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração de corte transversal do cérebro (Normal e com DA).....	21
Figura 2	Ilustração do tecido neural de um cérebro normal e com DA.....	22
Figura 3	Ilustração das rotas não-amiloidogênica e amiloidogênica.....	24
Figura 4	Ilustração da Neurotoxicidade dos oligômeros A β	25
Figura 5	Ilustração da Hiperfosforilação da proteína Tau e formação dos ENFs.....	26
Figura 6	Teste da Esquiva Passiva.....	51
Figura 7	Linha do tempo do estudo.....	52
Figura 8	Mini bomba osmótica e componentes do Kit de Infusão ALZET.....	54
Figura 9	Animal anestesiado imobilizado no aparelho esterotático.....	55
Figura 10	Arena do Teste do Campo Aberto visto de cima.....	58
Figura 11	Teste de Reconhecimento de Objetos.....	59
Figura 12	Teste de Suspensão pela Cauda.....	60
Figura 13	Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado.....	61
Figura 14	Esquema do animal sendo perfundido para preservação do tecido.....	62
Figura 15	Teste de Esquiva Passiva – Primeira Sessão (Seleção em PN75-76).....	69
Figura 16	Teste de Esquiva Passiva – Segunda Sessão (PN118-119).....	70
Figura 17	Teste de Esquiva Passiva – Diferença de tempos entre a 1a e 2a sessões....	71
Figura 18	Teste de Esquiva Passiva – Tempos (s) em cada teste das duas sessões.....	72
Figura 19	Teste do Campo Aberto – Número de entradas totais.....	74
Figura 20	Teste de Campo Aberto – Percentual de tempo e de entradas no centro.....	75
Figura 21	CA - Dados etológicos: elevações, autolimpezas e alongamentos.....	76
Figura 22	RO - Percentual de tempo de exploração do objeto novo.....	78
Figura 23	RO - Percentual de tempo entre as sessões.....	79
Figura 24	LCEM - Percentual de latência para entrada no braço fechado.....	81
Figura 25	SC - Número de contrações.....	83
Figura 26	SC - Tempo de imobilidade.....	84
Figura 27	Fotomicrografia do cortex cerebral – Vermelho Congo.....	85
Figura 28	Fotomicrografia do cortex cerebral – H&E	86
Figura 29	Fotomicrografia de imunohistoquímica para Iba-1 no hipocampo.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABT-107	(3R)-3-{{6-(1H-indol-5-yl)pyridazin-3-yl}oxy}-1-azoniabicyclo [2.2.2]
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADDLs	A-beta Derived Diffusible Ligands - oligômeros solúveis de A β
ADI	Alzheimer`s Disease International
APP	Proteína precursora do amilóide
AVD	Atividades da vida diária
A β	β -amilóide
BACE	Proteína β -secretase
B-ADL	Escala Bayer de Atividades da Vida Diária
BChE	Butirilcolinesterase
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ⁺²	Cálcio
CA1	Corno de Amon 1
CAT	Acetiltransferase
cdk5	Cinase dependente de ciclina 5
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	Tomografia computadorizada
DA	Doença de Alzheimer
DG	Giro denteado
ENFs	Emaranhados neurofibrilares intracelulares
EVP-6124	[(R)-7-chloro-N-(quinuclidin-3-yl)benzo[b]thiophene-2-arboxamide]
GB	Ginkgo-biloba
GRP	Proteína regulada por glicose
GSK-3	Glicogênio sintase cinase 3
GTS-21	(DMXB-A) [3-[(3E)-3-[(2,4-dimethoxyphenyl) methylidene]-5,6-dihydro-4Hpyridin-2-yl]pyridine
FDA	Administração de alimentos e medicamentos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IChEs	Inibidores da acetilcolinesterase
IPA	Associação Psicogeriátrica Internacional

IQ-CODE	Questionário do Informante sobre o Declínio Cognitivo do Idoso
ISRs	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
K ⁺	Potássio
K-S	Kolmogorov-Smirnov
LCEM	Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado
LTM	Memória de longo prazo
MEEM	Mini-Exame do Estado Metal
ml	Mio-inositol
Na ⁺	Sódio
Naa	Metabólito N-acetilaspártato
NaCl	Salina
NGF	Fator de crescimento neuronal
NIC	Nicotina
NMDA	N-metil D-Aspartato
PBS	Tampão fosfato-salino
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PLA2	Enzima fosfolipase A2
PN	Dia pós natal
RNA _m	RNA mensageiro
RO	Teste de reconhecimento de objetos
Ser/Thr	Serina/Tirosina
SERCA	Ca ²⁺ ATPase de retículo sarcoendoplasmático
SNC	Sistema nervoso central
SPCD	Sintomas psicológicos e comportamentais da demência
STM	Memória de curto prazo
VAR	Vareniclina
α-BTX	α-bungarotoxina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	DOENÇA DE ALZHEIMER	16
1.1	Quadro clínico	16
1.2	Diagnóstico da doença	18
1.2.1	<u>Memória e autonomia em indivíduos idosos</u>	20
1.3	Fisiopatologia da doença de Alzheimer	21
1.3.1	<u>Hipótese da cascata amiloide</u>	23
1.3.2	<u>Hipótese colinérgica</u>	27
1.3.3	<u>Oligômeros da proteína beta-amiloide</u>	29
1.4	Terapias da doença de Alzheimer	29
1.4.1	<u>Terapêutica específica</u>	30
1.4.1.1	Colinérgica.....	30
1.4.1.2	Inibidores da acetilcolinesterase.....	30
1.4.1.3	Estratégia glutamatérgica.....	32
1.4.1.4	Terapia antiamilóide.....	33
1.4.1.5	Outras abordagens terapêuticas.....	34
1.4.2	Terapia dos sintomas	37
1.4.3	<u>Terapia profilática</u>	39
1.5	Papel dos receptores nicotínicos no tratamento da DA	40
1.6	Cálcio e patologia neuronal: perspectivas terapêuticas	43
1.7	Terapias com agonistas do nAChR $\alpha 7$	44
1.7.1	<u>Varenciclina</u>	46
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo geral	48
2.2	Objetivos específicos	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Animais	49
3.2	Formação dos grupos experimentais	50
3.2.1	<u>Seleção dos animais</u>	50
3.2.2	<u>Período de tratamento</u>	51

3.2.3	<u>Cirurgia</u>	53
3.2.3.1	<u>Indução do modelo de doença de Alzheimer</u>	55
3.2.4	<u>Grupos experimentais</u>	55
3.3	Testes comportamentais	56
3.3.1	<u>Teste de Esquiva Passiva (EP)</u>	57
3.3.2	<u>Teste do Campo Aberto (CA)</u>	57
3.3.3	<u>Teste de Reconhecimento de Objetos (RO)</u>	58
3.3.4	<u>Teste de Suspensão pela Cauda (SC)</u>	59
3.3.5	<u>Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM)</u>	60
3.3.6	<u>Observações</u>	61
3.4	Histologia	62
3.4.1	<u>Perfusão</u>	62
3.4.2	<u>Coloração</u>	63
3.4.3	<u>Imunohistoquímica</u>	63
3.4.3.1	<u>Anticorpos</u>	64
3.4.3.2	<u>Análise e aquisição de imagens</u>	64
3.5	Análise quantitativa	64
3.5.1	<u>Aspectos preliminares</u>	64
3.5.2	<u>Análise dos parâmetros comportamentais</u>	65
3.5.3	<u>Aspectos complementares</u>	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Análise comportamental	67
4.1.1	<u>Esquiva Passiva (EP)</u>	67
4.1.2	<u>Campo Aberto (CA)</u>	73
4.1.3	<u>Reconhecimento de Objetos (RO)</u>	77
4.1.4	<u>Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM)</u>	80
4.1.5	<u>Teste de Suspensão pela Cauda (TS)</u>	81
4.2	Análise histológica	85
4.2.1	<u>Coloração</u>	85
4.2.2	<u>Imunohistoquímica</u>	86
5	DISCUSSÃO	88
5.1	Esquiva Passiva	89
5.2	Campo Aberto	90
5.3	Reconhecimento de objetos	92

5.4	Labirinto em Cruz Elevado Modificado	94
5.5	Suspensão pela Cauda	95
5.6	Histologia	97
5.7	Perspectivas	99
	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO

Envelhecer é uma característica normal do ciclo de vida de todos os organismos. Apesar de sua inevitável e irreversível presença em nossas vidas, muitas são as incógnitas que até hoje cercam a dinâmica do envelhecimento. O envelhecer é um processo contínuo e progressivo, com modificações funcionais e estruturais do indivíduo, que resultam na redução da capacidade de adaptação ao meio ambiente e às situações de sobrecarga, tornando-o cada vez mais vulnerável com o passar do tempo (Papaléo–Netto e Brito, 2001).

Especificamente em relação a nossa espécie, o fenômeno do envelhecimento populacional (aumento da longevidade média) tem sido observado em todo o mundo e constatado não só pelas produções científicas como também pela concepção do senso comum. Dentro deste contexto, tanto os aspectos normais do envelhecimento saudável (senescência) quanto do que ocorre associado a problemas de saúde (senilidade) tornaram-se mais frequentes e resultaram em maior esforço da sociedade para manter esta população idosa. Assim, não somente por aspectos morais e éticos, mas também pelos socioeconômicos, o estudo das doenças associadas ao envelhecimento torna-se fundamental.

A demência se coloca como uma das maiores causas de morbidade entre idosos e sua prevalência está entre 2% e 25% dos pacientes com 65 anos ou mais (Fratiglioni e Amaduci, 1990). A demência é uma síndrome clínica adquirida caracterizada pelo declínio progressivo e global das funções cognitivas, tais como dificuldades de memória, transtornos de linguagem e alterações comportamentais, que sejam suficientemente importantes para interferir nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo (Burns, 2009). A doença de Alzheimer corresponde a 60% dos casos de demência (Fratiglioni et al., 2000) que afetam o idoso e comprometem sobremaneira sua integridade física, mental e social (Marinho et al., 1997), podendo acarretar em uma situação de dependência total.

A doença de Alzheimer, conhecida internacionalmente pela sigla DA, foi descrita em 1907 pelo patologista alemão Alois Alzheimer. O médico observou e descreveu as alterações no tecido cerebral da Sra. August D, que mostrou os primeiros sintomas demenciais por volta dos 51 anos. A paciente foi levada ao médico devido a um quadro clínico de delírio. Nos meses seguintes, sua memória deteriorou rapidamente e ela passou a apresentar paralisia, ataxia e desorientação espacial. A paciente faleceu quatro anos e meio após o início dos sintomas. A autópsia da paciente revelou claramente uma atrofia cerebral e a análise microscópica do tecido cerebral revelou a presença de novos neurofibrilares, placas senis e

perdas neuronais (revisto por Almeida, 1997). Os achados de Alzheimer contribuíram significativamente para a investigação de aspectos inerentes à doença, como quadro clínico e progressão dos sintomas, anatomopatologia e a correlação entre estes. Mesmo após pouco mais de cem anos de sua caracterização clínica e patológica, o conhecimento acerca da doença de Alzheimer, bem como seu diagnóstico preciso, ainda representam importantes desafios para as comunidades científicas.

Segundo os pesquisadores, atualmente 35,6 milhões de pessoas no mundo convivem com a doença e a estimativa é que esse número praticamente dobre a cada 20 anos, chegando a 65,7 milhões em 2030 e a 115,4 milhões em 2050. Estima-se que a cada 4 segundos, um novo caso de demência é detectado no mundo e a previsão é de que em 2050, haverá um novo caso a cada segundo (World Alzheimer Report, 2015). A doença de Alzheimer foi considerada em 2002 a 6ª maior causa de morte entre indivíduos com mais de 65 anos nos EUA (Crews et al., 2010; Gillum et al., 2011). Dados do IBGE estimam que no Brasil 1,2 milhão de pessoas sofrem com a doença e há cerca de 100 mil novos casos por ano. Estes dados poderiam ser muito maiores, se houvesse um criterioso estudo sobre isto, pois se acredita que a doença de Alzheimer é subdiagnosticada no país (IBGE, 2012).

Tal como as demências em geral, a DA tem importantes repercussões sociais e econômicas no que diz respeito aos custos médicos e sociais diretos e aos custos referidos a atenção que se presta fora do âmbito institucional. Um estudo sobre o “custo da doença” que foi realizado pela ADI (Alzheimer’s Disease International) em 2010 demonstrou que o custo global da demência para a sociedade em 2010 foi de 604 bilhões de dólares americanos, custo esse que pode ser dividido em “informais” do tratamento (parcela de contribuição não monetária de assistência de familiares, amigos e vizinhos, estimada em termos de horas de apoio com as principais atividades do cotidiano), custos “diretos” (custos médicos do tratamento inclusive utilização de serviços de saúde) e custos sociais do tratamento (para o pagamento de cuidados em domicílio e custos com casas de assistência) (relatório ADI, 2013).

Um estudo realizado na UERJ demonstrou que as famílias avaliadas gastam em torno de 66% de seus recursos com o cuidado com o idoso demenciado. No estágio inicial, este gasto chega a 75%, e no estágio avançado vai a 62%. Quando os idosos demenciados apresentam comorbidades, este percentual se agrava, e chega a 82% da renda familiar mensal entre os diabéticos, e a 81% entre os hipertensos. Nos estágios iniciais, o impacto da demência associada à hipertensão atinge 76%, e quando vinculada à diabetes alcança 77%. Entre os idosos em estágio avançado, no primeiro caso, o impacto é de 84%, e no segundo é de 86%

(Veras. et al. 2007). Vale ressaltar que a Doença de Alzheimer é democrática. Ela surge em qualquer pessoa, de qualquer nível sócio-econômico-cultural.

Em resumo, a DA é uma doença degenerativa e progressiva, geradora de múltiplas demandas e altos custos financeiros, representando um desafio para o poder público, instituições e profissionais de saúde, tanto em nível nacional, quanto mundial. Apesar de todos os esforços, até hoje não se sabe de um tratamento que reverta os danos causados por essa doença tão devastadora. O que se tem são diferentes abordagens terapêuticas que atenuam o declínio cognitivo associado à doença, mas que não trazem o indivíduo com Alzheimer para a cura.

1 DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1 Quadro clínico

De acordo com Seni (1996) e Engelhardt et al. (1998), a DA é clinicamente dividida em dois subgrupos de acordo com seu tempo de início. O surgimento antes dos 65 anos (DA de início precoce) se caracteriza por declínio rápido das funções cognitivas. Esses casos são mais raros, correspondendo a 10% do total. O outro grupo diz respeito à DA esporádica, de início tardio, que responde pela maioria dos casos da doença (Truzzi e Lacks, 2005). Nestes casos, após os 65 anos, começam a aparecer os primeiros sintomas da DA. Nos estágios iniciais da doença, o paciente demonstra dificuldade em pensar com clareza, tende a cometer lapsos e a se confundir facilmente, além de apresentar queda em seu rendimento funcional em tarefas complexas. O paciente tem dificuldade de absorver novas informações, uma vez que tem a tendência de se esquecer de fatos recentes. À medida que a doença progride, o paciente passa a ter dificuldades para desempenhar as tarefas mais simples, como utilizar utensílios domésticos, ou ainda para vestir-se, cuidar da própria higiene e alimentar-se (Laks, 1997). Num estágio mais avançado da doença, o paciente perde a capacidade de ser independente, necessitando de um cuidador. O quadro se agrava quando o indivíduo com Alzheimer desenvolve sintomas psicóticos ou alterações comportamentais como apatia, psicose, alterações do humor e do sono, agitação psicomotora, agressividade, quadros depressivos, afirmações autodepreciativas, manifestações do desejo de morrer, perda de apetite, delírios, entre outras, sendo que estas alterações estão presentes em até 75% dos casos impondo grande desgaste para o próprio paciente e sobrecarga ao cuidador (Forlenza, 2005; Caramelli et al., 2011). Nas fases finais da doença, a necessidade assistencial se torna integral, o paciente geralmente fica acamado, podendo apresentar dificuldade de deglutição, além de sinais neurológicos, como mioclonias e crises convulsivas, incontinência urinária e fecal. Este quadro progride até a morte, uma vez que o paciente se torna cada vez mais fragilizado pela doença crônica (Bottino et al., 2002). Em virtude de comorbidades clínicas ou quadros infecciosos nesses indivíduos que se tornaram cada vez mais fragilizados pela progressão e cronificação da doença, normalmente esses pacientes vão a óbito após 10 a 15 anos de evolução da doença (Engelhardt et al, 2001).

Observando-se e escutando os pacientes portadores de doenças degenerativas e seus familiares, encontra-se com frequência a expressão "morte em vida" para definir uma nova modalidade de velhice. Processos mórbidos degenerativos aceleram a decadência psíquica e funcional do indivíduo, comprometendo sua qualidade de vida e apresentando uma modalidade de morte que destrói o sujeito, sem, contudo, ceifar efetivamente a sua vida (Abreu et al., 2005).

A maioria dos idosos com Alzheimer passa por três fases da doença (Abreu et al., 2005), abaixo caracterizadas:

a) Fase inicial:

- formas leves de esquecimento;
- dificuldade de memorizar;
- descuido da aparência pessoal e no trabalho;
- perda discreta de autonomia para as Atividades da vida diária (AVD);
- desorientação no tempo e espaço;
- perda de espontaneidade e iniciativa;
- alteração de personalidade e julgamento.

b) Fase intermediária:

- dificuldade de reconhecer pessoas;
- incapacidade de aprendizado detém algumas lembranças do passado remoto;
- perambulação;
- incontinências urinária e fecal;
- comportamento inadequado, irritabilidade, hostilidade, agressividade;
- incapaz de julgamento e pensamento obcecado.

c) Fase final:

- perda de peso, mesmo com dieta adequada;
- total dependência;
- mutismo;
- restrito ao leito;
- irritabilidade extrema;
- funções cerebrais deterioradas;
- morte.

Vários estudos afirmam que é muito importante, nas primeiras fases da doença, a percepção dos sintomas de demência por parte dos pacientes, familiares e cuidadores, sendo crucial para o diagnóstico mais precoce de DA, o que auxilia o desenvolvimento e o manejo de abordagens e intervenções farmacológicas ou não-farmacológicas que possam levar a um melhor prognóstico e melhorar a qualidade de vida do paciente. Por outro lado, a percepção dos déficits cognitivos faz com que os pacientes apresentem sintomas depressivos e se manifestam mais tristes em função das alterações causadas pela DA (Dourado et al., 2005). De acordo com Petersen et al. (2001), “o diagnóstico precoce das demências possibilita intervenção terapêutica, diminui os níveis de estresse para os familiares, reduz riscos de acidentes, prolonga a autonomia e talvez, em alguns casos, evite ou retarde o início do processo demencial”. Vale ressaltar que o envelhecimento, com ou sem demência, produz alterações cognitivas, e que se o envelhecimento e a demência compartilham qualitativamente das mesmas alterações neuropatológicas, na DA essas alterações ocorrem em intensidade muito maior. Daí a importância de um diagnóstico precoce e preciso, capaz de excluir ou determinar um caso de demência, ou mais precisamente de DA, a fim de se estabelecer o tratamento específico para cada caso (Luzardo et al, 2006).

1.2 Diagnóstico da doença

A abordagem do paciente com demência deve incluir, sempre, a avaliação e monitoramento das habilidades cognitivas, da capacidade para desempenhar atividades da vida diária, do comportamento e da gravidade global do quadro (Almeida e Nitrini, 1998; Forlenza e Caramelli, 2000). O diagnóstico de demência exige a constatação de deterioração ou declínio cognitivo em relação à condição prévia do indivíduo (Corey-Bloom et al, 1995).

Para o diagnóstico clínico de casos de demência utilizam-se instrumentos de rastreio que são importantes objetos de estudo. Pesquisadores sugerem que a combinação de uma escala funcional, que avalia atividades da vida diária e um teste cognitivo (por exemplo, o Mini-Exame do Estado Metal [MEEM]) seria complementar em indivíduos com suspeita de síndrome demencial e, como consequência, aumentariam a sensibilidade e especificidade para rastrear a doença em uma população não homogênea, como a do Brasil, do ponto de vista cultural e socioeconômico (Mackinnon & Mulligan, 1998). O MEEM é o teste de rastreio e triagem mais utilizado no mundo, pois é simples, de aplicação rápida e autoexplicativo, que

determina a extensão da avaliação cognitiva subsequente à sua aplicação em sujeitos com demência moderada e severa. É composto por diversas questões, caracteristicamente agrupadas em sete categorias, cada uma com a finalidade de avaliar funções cognitivas específicas, tais como orientação, retenção ou registro de dados, atenção, cálculo, memória e linguagem.

Dentre as múltiplas escalas de avaliação funcional existentes, as mais utilizadas são: o Questionário do Informante sobre o Declínio Cognitivo do Idoso (Informant Questionnaire of Cognitive Decline in the Elderly [IQ-CODE]) (Jorm e Jacomb, 1989); a Escala Bayer de Atividades da Vida Diária (B-ADL) (Hindmarch et al., 1998); e o Índice de Katz (Gorestein, 2000). O IQ-CODE avalia cognição entrevistando o cuidador ou alguém que tenha contato próximo ao paciente. São 26 questões que avaliam o desempenho atual em diferentes situações da vida diária, comparando com o desempenho anteriormente observado ao longo de um seguimento de dez anos (Bustamante et al., 2003). Sua validade reflete um declínio cognitivo prévio, prevê quadros demenciais e se correlaciona com vários testes cognitivos. Essa avaliação não sofre influência de escolaridade. A B-ADL (Escala Bayer de Atividades da Vida Diária) avalia o desempenho atual do paciente em atividades da vida diária. O cuidador ou alguém próximo ao paciente deve responder a 25 questões em uma escala que varia entre 1 e 10. Utilizada em diferentes populações, permite detectar casos leves de demência, bem como, ao ser associada ao MEEM, apresenta sensibilidade de 86,7% para diagnosticar a doença. O Índice de Katz é uma escala mais descritiva que também avalia o desempenho em atividades da vida diária, ou seja, sua capacidade funcional e as divide em rotineiras (tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro, continência e alimentação) e instrumentais (usar telefone, preparar comida, fazer compras, locomoção fora de casa, medicação e dinheiro). Classifica os pacientes em independente (I), dependente (D) e necessitado de assistência (A). Também é respondida pelo cuidador ou pelo paciente. A combinação de um teste cognitivo, como MEEM, e uma escala funcional (IQ-CODE e B-ADL) proporcionam maior precisão diagnóstica (Bustamante et al. 2003).

Atualmente o uso de novas técnicas de diagnóstico mais específico está auxiliando na descoberta precoce de distúrbios neurológicos do organismo. A combinação das imagens geradas por PET/CT (tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada), um equipamento que une os recursos diagnósticos da medicina nuclear e da radiologia, com a ressonância magnética, permite identificar os locais de maior concentração de células inativas no cérebro do paciente. Visto que o PET demonstra as alterações biológicas, enquanto que o CT fornece informações anatômicas do corpo (Ferreira & Busatto, 2011; Benadiba et al.,

2012), acredita-se que o recurso pode permitir o desenvolvimento de tratamento precoce ou preventivo de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

1.2.1 Memória e autonomia em indivíduos idosos

A memória é um fator de destaque dentre os muitos aspectos da cognição avaliados nos teste para o diagnóstico da DA. A doença é caracterizada pelo déficit na memória episódica de longo prazo (devido à baixa performance na evocação) e na memória de curto prazo que pode estar relacionada com a gravidade do quadro (Izquierdo, 2002). Um estudo de Grossman e colaboradores (1997) observou que pacientes com DA apresentam um mau desempenho em tarefas que envolvem nomeação, fluência verbal e uso correto de sentenças e vocabulários. Portanto, as ações para realizar atividades da vida cotidiana ficam comprometidas, ou pelo esquecimento, ou pelo déficit no próprio conceito da ação em si.

A memória biográfica é caracterizada pelo reconhecimento da identidade e a perda de memória dificulta a aproximação das pessoas em suas relações afetivas, sociais e familiares (Rozenhal et al., 1995). Quando a pessoa não se lembra de fatos, de lugares e de pessoas, diz-se que há menos dessa pessoa a cada dia. A mesma fica impossibilitada de se relacionar, cuidar de si, planejar sua qualidade de vida; perde sua razão, autonomia e coerência. Na velhice, a manutenção da qualidade de vida está intimamente ligada à autonomia (Leibing, 1997). Uma forma de procurar quantificar a autonomia é através de índices de qualidade de vida de uma pessoa que pode ser indicada pela capacidade que ela tem de desempenhar as funções necessárias à manutenção da sua vida diária. No entanto, além da incapacidade de desempenhar uma tarefa, os déficits cognitivos impossibilitam a iniciativa de ações voluntárias que caracteriza a "memória prospectiva" (Eistein & McDaniel, 2002). Quando essa memória falha, o indivíduo se torna incapaz de iniciar uma sequência de ações que são demandadas pelo ambiente e pelas atividades da vida cotidiana, prejudicando sua autonomia. Sendo assim, podemos concluir que a memória, como função central nos processos cognitivos, tem relação direta com atividades que afetam a autonomia do indivíduo.

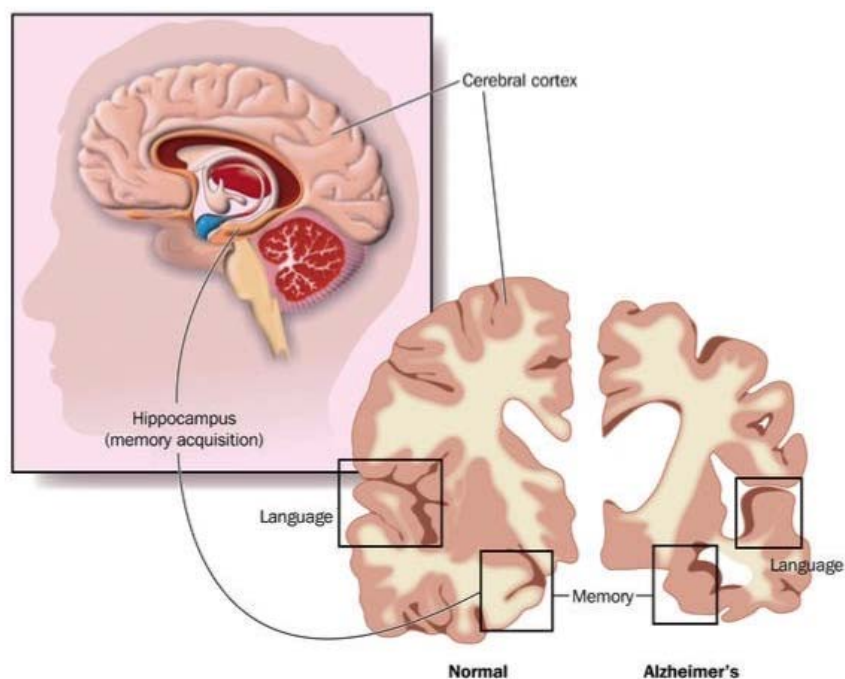
Diante desse quadro, quanto mais cedo o diagnóstico, maiores são as chances das intervenções serem mais eficazes. Portanto, o diagnóstico da DA é feito associando os achados clínicos, aos exames de triagem e testes neuropsicológicos, porém o diagnóstico definitivo ainda é feito por análise do exame histopatológico do tecido cerebral post-mortem,

onde se confirma os achados de emaranhados neurofibrilares e placas amilóides extracelulares, o que torna o diagnóstico definitivo mais complicado (Charchat et al., 2001).

1.3 Fisiopatologia da doença de Alzheimer

Macroscopicamente, a DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada por atrofia do córtex cerebral e do hipocampo que se acompanha de aumento difuso dos sulcos e fissuras corticais devido à redução dos giros, estruturas estas que estão relacionadas aos processos de memória. (Alves et al., 2012) (Figura 1). As áreas corticais límbicas (como o núcleo basal de Meynert), paralímbicas e do córtex de associação são mais comprometidas desde o início, ao passo que as áreas primárias, como o córtex motor, o visual ou o auditivo, são poupadas até as fases mais avançadas da doença (Mesulam, 2000). Assim, pode-se concluir que existe uma sequência da progressão patológica na DA.

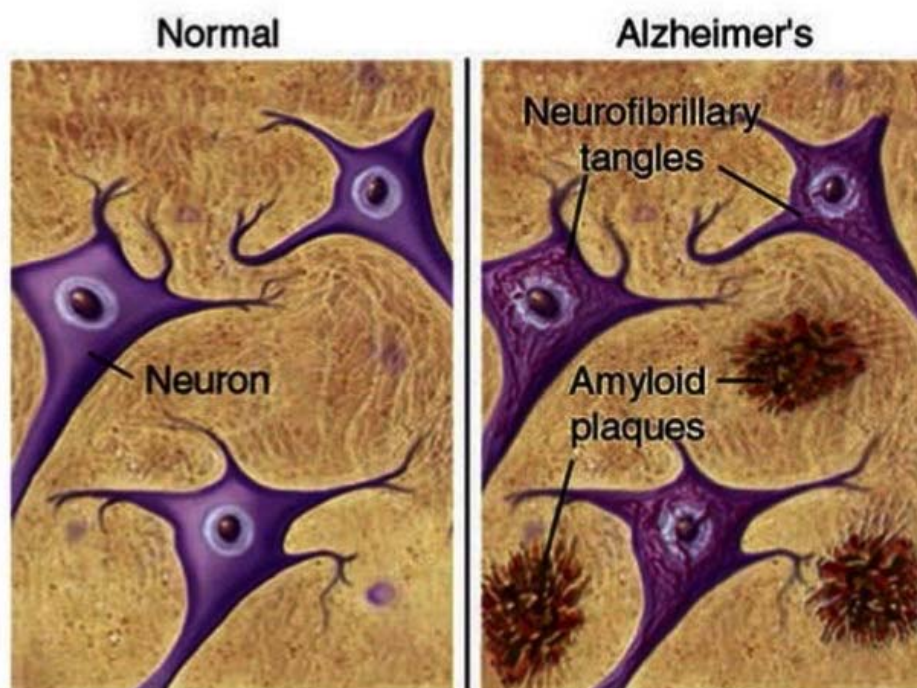
Figura 1: Ilustração de corte transversal do cérebro (Normal e com DA).



Fonte: Retirado de <http://pt.dreamstime.com/photos-images/alzheimer.html>.

Microscopicamente, as características neuropatológicas da doença são a presença de placas extracelulares de β -amilóide ($A\beta$), os emaranhados neurofibrilares intracelulares (ENFs) (Figura 2), que resultam da hiperfosforilação anormal da proteína tau, e uma extensa perda neuronal e sináptica, além da ativação da glia e inflamação (Alves et al., 2012, Holtzman et al., 2011). Outras alterações menos importantes para o diagnóstico e para a fisiopatologia, de acordo com as teorias atuais, são os corpúsculos de Hirano e a degeneração grânulo-vacuolar (Duyckaerts & Dickson, 2003).

Figura 2: Ilustração do tecido neural de um cérebro normal e com DA apresentando placas amiloides e emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Retirado de <http://quimicalzheimer.wordpress.com>.

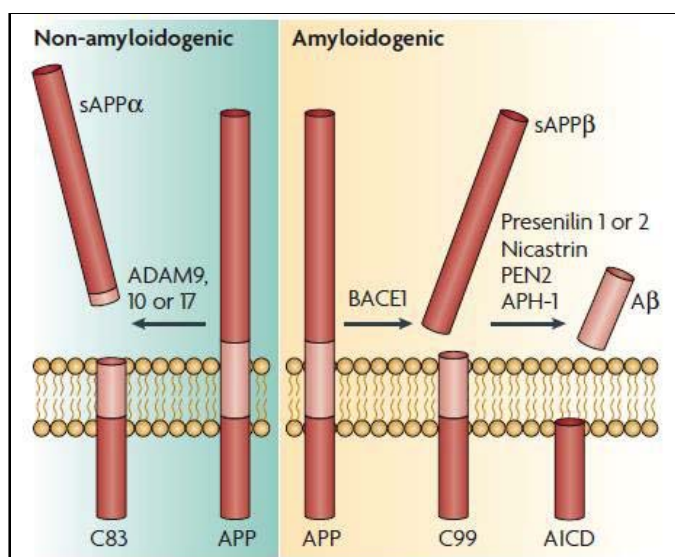
Sabe-se que a DA é uma doença que envolve diferentes tipos de alterações, sendo então altamente heterogênea, o que dificulta a sua descrição e a determinação de um tratamento eficaz (Fridman et al., 2004). Apesar das placas amiloides e dos emaranhados neurofibrilares desempenharem um importante papel no desenvolvimento da DA, outros mecanismos neurodegenerativos foram propostos, tais como: respostas pró-inflamatórias, disfunção mitocondrial, dano oxidativo, fatores genéticos e ambientais, apoptose e perturbações da homeostase iônica (Chu, 2012, Wyss-Coray T, 2006, Nelson, 2011). Os efeitos causados por

essas alterações são tão nocivos que vão resultar em disfunção sináptica e perda de células neuronais em áreas do cérebro particularmente vulneráveis responsáveis pela memória e cognição (Alves et al., 2012). Baseadas nesses marcadores neuropatológicos, duas hipóteses principais foram propostas a fim de explicar a etiologia da doença: a hipótese da cascata amiloidal e a hipótese colinérgica.

1.3.1 Hipótese da cascata amiloidal

O principal constituinte da placa senil é um peptídeo fisiológico de 42 aminoácidos depositado na forma de polímeros que formam fibrilas com estrutura alterada em folha beta e com as características físico-químicas de amilóide. Portanto, a DA pode ser considerada uma amiloidose, grupo bastante heterogêneo de doenças caracterizadas pela presença de material amilóide no tecido. Esse peptídeo fisiológico conhecido como peptídeo β -amilóide ($A\beta$) é um fragmento de uma proteína maior, denominada proteína precursora do amiloide (APP, do original em inglês *amyloid precursor protein*), que é codificada por um gene localizado no cromossomo 21. A APP é uma proteína de 695 a 770 aminoácidos que tem um importante papel no crescimento dos neuritos, na adesão celular, em funções sinápticas e na indução de apoptose (Thomas et al., 2007). O peptídeo $A\beta$ é produzido no cérebro pela clivagem proteolítica sequencial da APP através da ação de enzimas da família secretase, gerando fragmentos de tamanho variável (Bero et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Ilustração das rotas não-amiloidogênica e amiloidogênica da proteólise da molécula APP e consequente síntese do peptídeo A β .



Fonte: Retirado de Laferla et al., 2007.

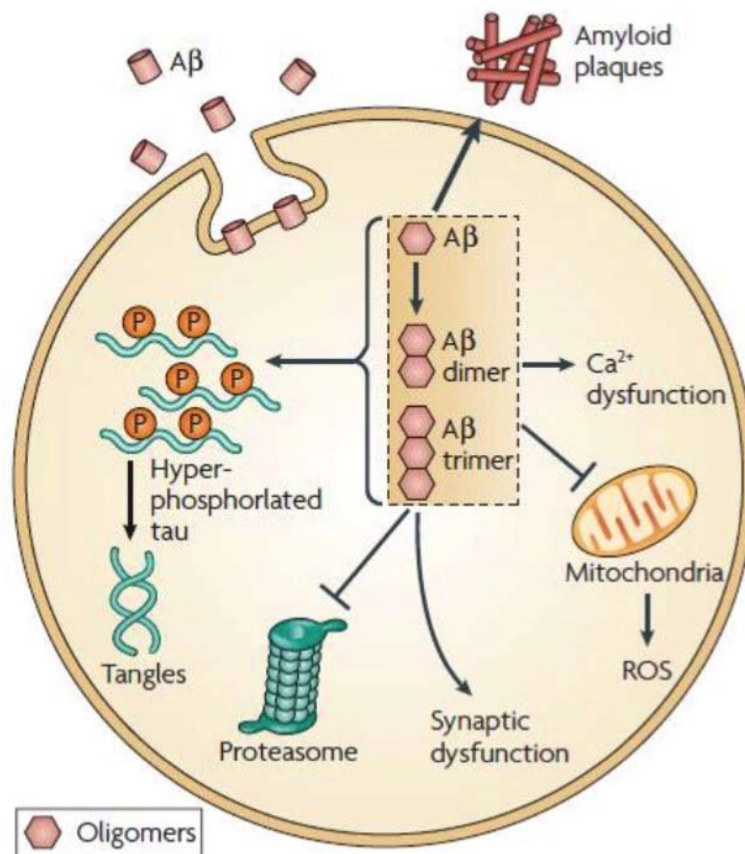
A clivagem sofrida pela APP resulta em diferentes polipeptídeos. A APP pode sofrer proteólise intramembrana regulada pelas α , β e γ secretases, em duas vias – a via não-amiloidogênica e a via amiloidogênica (Lazarov et al., 2008). A clivagem da APP pela α secretase segue a via não-amiloidogênica e produz um fragmento que é inócua ao organismo. (Lazarov et al., 2008, Hooper et al., 2008). O peptídeo A β é formado pela clivagem sucessiva da β (também denominada BACE1 – β -site APP-cleaving enzyme) e γ secretases (via amiloidogênica) (Bertram & Tanzi 2003, Lazarov et al. 2008). O padrão de clivagem da γ secretase, que produz o terminal-C do peptídeo A β , pode formar várias isoformas deste (Alves et al., 2012). As mais comuns são a isoforma A β -40, com 40 aminoácidos, e a A β -42, com 42 aminoácidos (Alves et al., 2012, Lazarov et al. 2008). A isoforma A β -40 é a mais prevalente. A A β -42 tem propriedades hidrofóbicas e agrega-se mais rapidamente do que a anterior, o que a torna mais amiloidogênica, mais susceptível a polimerizar, logo a formar placas senis (Perl, 2010).

Na DA familiar, todas as mutações do gene da APP resultam em substituições de aminoácidos (Bertram & Tanzi, 2003) que favorecem a via amiloidogênica, com superprodução do peptídeo A β , particularmente do A β 42, que forma fibrilas mais facilmente e é mais amiloidogênico. Outras mutações conhecidas, como as das presenilinas, também amplificam a via amiloidogênica. A DA autossômica dominante condicionada por mutações da presenilina 1 é mais frequente que a causada por mutação da APP, e sabe-se que a

presenilina faz parte da complexa estrutura da enzima gama-secretase. Esta teoria explica também porque DA é muito frequente em adultos com síndrome de Down: a trissomia do cromossoma 21 aumenta em 50% a possibilidade de ser produzida a APP e conseqüentemente o peptídeo A β (Blass & Poirier, 1996).

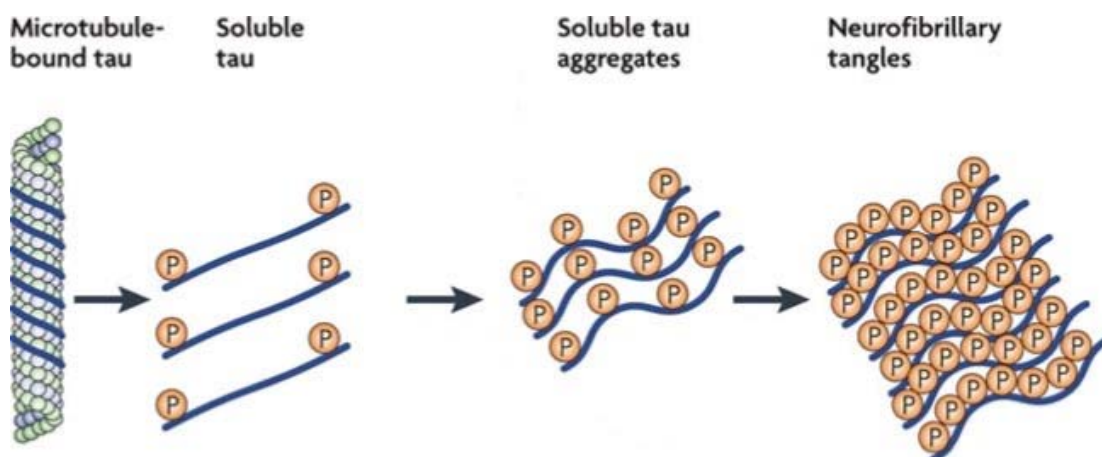
Na Doença de Alzheimer esporádica há falha nos mecanismos de eliminação de peptídeo A β . Deste modo, a acumulação anormal de A β , com formação de oligômeros tóxicos, resulta do desequilíbrio entre a sua produção, agregação e eliminação (Crews et al., 2010). O aumento da atividade anabólica ou da diminuição da atividade catabólica do peptídeo A β resulta no depósito desse peptídeo no parênquima ou nas paredes vasculares do cérebro. A hipótese da cascata de amilóide postula que o evento inicial da patogênese da doença de Alzheimer é a excessiva formação e deposição de A β fibrilar e insolúvel e a conseqüente agregação em placas. Este evento inicia uma cascata neurotóxica, com formação de emaranhados neurofibrilares (ENFs), que conduz, em último caso, à perda sináptica e neuronal em áreas críticas (Alves et al., 2012) (Figura 4).

Figura 4: Neurotoxicidade dos oligômeros A β .



A outra característica histopatológica da DA inclui as lesões neurofibrilares intraneurais. Os ENFs são depósitos intracelulares neuronais que contêm como principal componente a proteína Tau, normalmente presente nos neurônios, mas que na DA encontra-se anormalmente hiperfosforilada pela ação de quinases como GSK-3 (glicogênio sintase cinase) e cdk5/p25 (cinase dependente de ciclina e sua subunidade p25) (Querfurth & LaFerla, 2010). A proteína tau é importante para manter a estabilidade do sistema dos microtúbulos que fazem o transporte de fatores tróficos, neurotransmissores e proteínas entre o corpo celular e dendritos e axônios e vice-versa. Quando hiperfosforilada em resíduos de Ser/Thr, são impedidas de se ligar às proteínas dos microtúbulos, agregam-se na forma de filamentos helicoidais pareados e acumulam-se no pericário (Figura 5). Com a perda de estabilidade dos microtúbulos, o transporte por este sistema é comprometido, o neurônio perde progressivamente suas conexões e caminha para a morte celular (Iqbal & Grudke-Iqbal, 2006). A proteína tau é o principal constituinte dos emaranhados neurofibrilares, mas outros têm sido identificados como ubiquitina, colinesterase e peptídeo β -amilóide (Perry et al., 1987, Mesulam et al., 1987, Hyman et al., 1989).

Figura 5: Hiperfosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Retirado de Martin Citron., 2010.

Como descrito anteriormente, a hipótese da cascata amilóide propõe que alterações na tau e formação dos ENFs são provocados por altas concentrações de $A\beta$ (Zhang et al., 2011). Tal hipótese tem recebido suporte a partir de estudos genéticos com os dos casos da forma familiar da DA, nos quais mutações tanto na APP quanto nas presenilinas têm mostrado

aumento na produção do peptídeo A β (Hardy & Selkoe, 2002). No entanto, investigações neuropatológicas encontraram uma correlação fraca entre o número de placas amilóides e a gravidade da demência. Foram encontradas evidências de que o estado cognitivo e a duração da demência estão fortemente correlacionados com a densidade de emaranhados neurofibrilares e com os oligômeros A β solúveis (Nordberg, 2011). Além disso, as razões para a vulnerabilidade neuronal dos casos esporádicos da DA permanecem desconhecidas (Fuentealba et al., 2004). Desse modo, a hipótese da cascata de amilóide, como modelo explicativo da patogênese da DA fica enfraquecida (Alves et al., 2012, Davinelli et al., 2011). Já a hipótese colinérgica, na qual as anormalidades sinápticas poderiam representar a causa da demência, admite uma melhor correlação entre o padrão e a severidade das alterações cognitivas em comparação às placas senis e novos neurofibrilares (Braak et al., 1997).

1.3.2 Hipótese colinérgica

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema colinérgico que atua como principal modulador das funções dos neurônios corticais e do hipocampo, estando associada a uma série de funções cognitivas, uma vez que, liberada na fenda sináptica, pode se ligar a dois tipos de receptores – muscarínico e nicotínico. A região denominada nucleus basalis de Meynert é a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). Essa enzima é transportada para estruturas-alvo no sistema nervoso central (SNC): formação hipocampal, córtex cerebral e amígdala, dentre outros. Nessas regiões, ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina e da acetilcoenzima A. A ACh é metabolizada pela acetilcolinesterase (AChE), enzima pertencente à família das colinesterases, que é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise da acetilcolina em colina e acetato, que são os substratos de sua síntese (Viegas et al., 2004).

Na DA existe uma atrofia no nucleus basalis de Meynert, resultando em uma deficiência da síntese da CAT e, conseqüentemente, da ACh. Por esse motivo, uma das principais estratégias adotadas, dentre outras que serão descritas adiante, no desenvolvimento das drogas no tratamento da DA é a de melhorar a função colinérgica. Níveis sinápticos de ACh podem ser aumentados inibindo a AChE, usando precursores de ACh, aumentando a liberação de ACh ou estimulando os receptores pós-sinápticos. Estudos mostraram que o bloqueio farmacológico desses receptores altera a evocação e o aprendizado em jovens e idosos

normais sob o aspecto cognitivo (Beatty et al., 1986). Portanto, existe uma correlação entre a gravidade da DA e o declínio da CAT (Davies, 1997). Essa deficiência acentuada e desproporcional de acetilcolina é capaz de provocar um estado confusional característico da doença. Além dos efeitos decorrentes desta baixa disponibilidade sináptica de acetilcolina no nível do primeiro mensageiro, a disfunção colinérgica está associada ao comprometimento da transdução de sinais no nível pós-sináptico (segundos e terceiros mensageiros), resultando em mais prejuízos no metabolismo neuronal. Outros neurotransmissores que também se encontram alterados na DA são noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão (Forlenza, 2005; Viegas et al., 2004).

Outro aspecto fisiopatológico presente na hipótese colinérgica é a redução da atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 age sobre os fosfolípidios de membrana formando o ácido araquidônico, que é fundamental para a síntese dos mediadores da resposta inflamatória (Gattaz et al. 2004). Além disso, quando ocorre a redução da atividade dessa enzima há um declínio no catabolismo da fosfatidilcolina, que também é clivada pela PLA2, reduzindo a formação de colina e, conseqüentemente, de acetilcolina, o que contribui para a deficiência colinérgica na DA. Assim, a redução da atividade da PLA2 na DA está intimamente ligada à severidade da demência e ao déficit cognitivo (Gattaz et al., 2004). Algumas células cerebrais especializadas estão envolvidas nas respostas inflamatórias, entre elas os astrócitos (Parihar & Hemnani, 2004 e Brown & Bal-price, 2003). Na DA, o número de astrócitos reativos se encontra elevado e a expressão de PLA2 nessas células mostra-se aumentada, levando ao aumento da atividade inflamatória com liberação de moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fatores de coagulação, além de compostos neurotóxicos, como radicais livres, glutamato e óxido nítrico (Sereniki & Vital, 2008).

Apesar de ainda não haver terapias para prevenir o Alzheimer, a detecção em estágio inicial da doença é vital tanto para retardar o aparecimento dos sintomas por meio de drogas, como para mudanças no estilo de vida e avaliação do potencial terapêutico de alguns tratamentos. Estudos mostraram que na DA ocorrem alterações de alguns metabólitos que podem ser previamente identificados, como por exemplo o metabólito N-acetilaspártato (Naa), importante marcador de integridade neuronal em pacientes com doenças neurodegenerativas. Outro metabólito que também se encontra alterado é o mio-inositol (mI), um marcador de neuróglia que se encontra aumentado em casos de demência. A combinação da diminuição de Naa e do aumento de mI é considerado característico da DA. Finalmente, a creatina, que está envolvida com a atividade metabólica energética, é outro metabólito que

está alterado na DA e que se mantém relativamente estável até fases muito adiantadas do processo degenerativo. De acordo com as alterações destes metabólitos pode-se determinar uma cronologia das variações no processo patológico, com aumento de mI em fases iniciais, diminuição de Naa e alteração da creatina em fases mais avançadas (Engelhardt et al., 2001; Azevedo et al., 2005).

1.3.3 Oligômeros da proteína beta-amiloide

Uma nova hipótese, que vem sendo testada nos últimos anos, pode conciliar as duas hipóteses anteriormente descritas. Além das placas, verificou-se que também ocorre a formação de oligômeros solúveis de A β , que são pequenos agregados de 2 a 12 peptídeos (Ballard et al., 2011). Inicialmente foram identificados com o nome de ADDLs (oligômeros solúveis de A β), pois foram encontrados ligados ao amilóide das placas senis. Estudos mostraram que a concentração de oligômeros no cérebro de pacientes com DA atinge níveis 70 vezes maiores do que os observados em controles (Gong et al., 2003) e a correlação com o comprometimento cognitivo é mais forte com as concentrações de oligômeros solúveis do que com a densidade das placas de peptídeo A β (McLean e cols., 1999). Esses oligômeros, por serem solúveis, podem agir em diversas regiões, extra e possivelmente intracelularmente, e podem ser a chave para a compreensão de alguns fenômenos clínicos e patológicos até agora inexplicáveis (Terry, 2001). Os axônios e as sinapses são seletivamente vulneráveis ao acúmulo intracelular de substratos patológicos e podem ser nestes locais onde se inicia o processo de morte celular. Assim, o acúmulo desses oligômeros nas sinapses resulta na hiperfosforilação da tau e na formação dos ENFs distante do local de depósitos iniciais de A β (Kapogiannis & Mattson, 2011).

1.4 **Terapias da doença de Alzheimer**

A DA atinge vários aspectos da vida do paciente (Almeida, 1997). Por isso, quatro alvos no tratamento farmacológico da doença são propostos. Dentre eles temos: (1) a terapêutica específica, que tem como objetivo reverter processos fisiopatológicos que conduzem à morte

neuronal e à demência; (2) o tratamento sintomático, que visa restaurar, ainda que parcial e/ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono; (3) a abordagem profilática, que visa retardar o início da demência ou prevenir o declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado o processo (Orestes, 2005).

1.4.1 Terapêutica específica

1.4.1.1 *Colinérgica*

Como visto anteriormente, um dos principais sistemas neuroquímicos afetados no DA é o colinérgico, com modificações neuroquímicas primárias e morte celular nos neurônios colinérgicos. É importante lembrar, nesse momento, que as anormalidades nos sistemas cerebrais que utilizam acetilcolina incluem: grande redução desproporcional de acetilcolina (Katzman, 1986; Nordberg, 1992), redução de atividade da colina-acetiltransferase (Katzman, 1986; Nordberg, 1992), degeneração do núcleo basal de Meynert (Whitehouse, 1982, Schröder, 1998); alteração no número e sensibilidade de receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (Newhouse, 1997; Schröder, 1998); e sensibilidade aumentada aos efeitos de drogas anticolinérgicas como a escopolamina (Newhouse, 1997). Com base nessas características, as estratégias para a terapia da DA têm sido melhorar o déficit colinérgico presente na doença. A abordagem terapêutica que vem sendo utilizada e que tem se mostrado mais eficaz até o momento foi a da inibição da enzima responsável pela degradação da acetilcolina, a acetilcolinesterase.

Os inibidores da acetilcolinesterase (IChEs) (tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina, aumentando assim a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (Grossberg, 2003). Desde a introdução desses medicamentos na prática clínica, os inibidores da AChE constituem o tratamento específico de escolha para a doença de Alzheimer (Grossberg, 2003).

1.4.1.2 Inibidores da acetilcolinesterase

a) Tacrina:

A tacrina foi o primeiro IChE aprovado para tratamento da DA (Qizilbash et al., 1998). Apesar de sua eficácia, apenas um percentual baixo dos pacientes foi capaz de tolerar doses elevadas mais eficazes devido a sua hepatotoxicidade (Qizilbash et al., 1998; Rogers, 1996). É um inibidor reversível da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE), de meia vida curta (2-4 h). Os novos IChEs tornaram a prescrição da tacrina muito restrita atualmente. Os trabalhos controlados iniciais demonstraram uma diferença fármaco-placebo significativa, conforme avaliado através de instrumentos padrão cognitivos e funcionais, com maior eficácia com as doses mais elevadas, embora com o ônus de efeitos adversos mais frequentes. A necessidade de monitorização da função hepática, além de uma maior dificuldade posológica (quatro tomadas diárias), fizeram com que a tacrina caísse em desuso. Os IChEs de segunda geração, donepezil, rivastigmina e galantamina, são atualmente os mais utilizados no tratamento da DA nos estágios leve a moderado (Engelhardt et al., 2005).

b) Donepezil:

O donepezil é outro inibidor reversível e seletivo da AChE, com meia-vida de aproximadamente 70 h (Winblad et al., 2001; C o rey-Bloom et al., 1998). Esse fármaco é metabolizado pelo citocromo P450, de modo que seu uso com outros fármacos deve ser feito com cautela. Roger e colaboradores (1998) ampliaram os resultados iniciais sobre a eficácia e segurança do donepezil no tratamento de pacientes com DA. A vantagem observada entre os pacientes recebendo donepezil em relação aos controles utilizando placebo desapareceu na 30ª semana, sugerindo que a medicação não interfere com a evolução natural da doença (Rogers et al., 1998).

c) Rivastigmina:

A rivastigmina é atualmente um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da DA, uma vez que é um inibidor pseudo-irreversível da AChE e da BChE, apresentando, assim, maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de acetilcolina (Grossberg, 2003). A meia vida é 1-2 h, porém apresenta uma atividade prolongada (8-10 h). A eliminação é principalmente renal e não envolve o sistema citocromo P450, não ocorrendo

praticamente interações medicamentosas. Embora esse medicamento cause vários efeitos colaterais, em geral, apresenta boa tolerabilidade (Orestes, 2005).

d) Galantamina:

A galantamina é mais um inibidor reversível da AChE que possui meia vida de aproximadamente 7 h. Uma vez que é metabolizada pelo citocromo P450 hepático, suscita cuidados em relação à interação com alguns fármacos (Levin & Simon, 1998; Caramelli et al., 2004). Além do seu efeito como IChE, a galantamina também tem ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos (Maelicke & Albuquerque, 2000). O papel dos receptores nicotínicos na cognição é bastante conhecido, entretanto, o significado clínico da modulação nicotínica no tratamento da doença de Alzheimer não está completamente elucidado. Os receptores nicotínicos pré-sinápticos controlam a liberação de neurotransmissores, os quais são importantes para a memória e para o humor (Levin & Rezvani, 2000). A galantamina melhorou a função cognitiva e a memória quando ligada aos diferentes subtipos de receptores nicotínicos (Levin & Rezvani, 2000).

1.4.1.3 *Estratégia glutamatérgica*

A memantina é um antagonista não-competitivo de receptores NMDA, permitindo sua ativação fisiológica durante os processos de formação da memória, porém bloqueando a abertura dos canais e sua ativação patológica (Parsons et al., 1993). Essa propriedade deve-se aos efeitos rápidos, voltagem-dependentes, das interações da memantina com os receptores NMDA. Em condições fisiológicas, a memantina exerce ação semelhante aos íons magnésio, bloqueando os receptores NMDA no estado de repouso e deslocando seu sítio de ligação em condições de ativação fisiológica. Em contrapartida, não se desprende do receptor na vigência de ativação patológica. Essas propriedades conferem à memantina uma ação neuroprotetora contra a ativação excitotóxica de receptores de glutamato (Misztal et al., 1996). O uso de memantina mostrou eficácia em pacientes com DA moderada a grave (Reisberg et al., 2003). Sua eliminação é renal e não interfere com o sistema do citocromo P450, havendo pouca interação com outros medicamentos. Parece não interferir com o metabolismo dos IChEs (Jarvis & Figgitt, 2004). Em pacientes com DA moderada a grave recebendo doses estáveis de IChE, o tratamento combinado com memantina, além de seguro é bem tolerado (Wenk et al.,

2000), pode ter resultados mais favoráveis em relação aos parâmetros cognitivos, funcionais e comportamentais, sustentando a indicação do tratamento combinado (Tariot et al., 2004).

1.4.1.4 *Terapia antiamilóide*

A hipótese que a DA inicia-se com a acumulação de peptídeos β -amilóide e formação das placas senis leva a crer que, se for possível impedir a formação dessas lesões, a instalação e a evolução da doença poderão ser retardadas ou até evitadas. Como descrito anteriormente, além da formação das placas, a ação tóxica dos peptídeos β -amilóide nos neurônios também está relacionada com o comprometimento do citoesqueleto celular e, como consequência, a formação de outra marcante lesão histopatológica, os emaranhados neurofibrilares. As drogas com ação antiamilóide podem ser divididas em três grandes grupos, os quais são descritos a seguir:

a) Inibidores da fibrilogênese:

Dentre os inibidores de fibrilogênese temos o NC-531 e o clioquinol. O NC-531 é uma droga do Laboratório Neurochem e recebe o nome de Alzhemed®. Tem como mecanismo de ação a inibição da fibrilogênese e a remoção das formas solúveis do β -amilóide, prevenindo assim a sua deposição em tecidos cerebrais e os eventos subsequentes da cascata do amilóide. É uma molécula orgânica de baixo peso molecular que impede a interação entre as glicosaminoglicanas e o peptídeo A β , supostamente necessária para que os polímeros de β -amilóide adquiram a conformação β -pregueada (Huang et al., 2000). O estudo preliminar com essa droga demonstrou que ela é bem tolerada e reduziu a concentração da proteína β -amilóide no líquido cefalorraquidiano (Geerts, 2004).

O clioquinol (iodocloro-hidroxiquina) é um quelante de metais (cobre, ferro e zinco). Acredita-se que haja uma correlação entre o peptídeo β -amilóide e esses metais, que favoreceriam a formação e maturação de placas neuríticas (Finefrock et al., 2003). A ação quelante do clioquinol apresenta a possibilidade de interferir e inibir esse processo. Cobaias modificadas geneticamente que receberam clioquinol apresentaram redução no depósito de β -amilóide em tecidos cerebrais (Nordberg, 2003). No entanto, os estudos com o clioquinol foram abandonados após a constatação de efeitos colaterais graves.

b) Inibidores da formação do peptídeo β -amilóide:

Como visto anteriormente, duas proteases fracionam a APP, levando a formação do peptídeo amiloidogênico. As duas principais enzimas-alvo nessa estratégia são a β -secretase (BACE) e a γ -secretase. O objetivo da utilização desses inibidores é o de diminuir a ação dessas enzimas e então reduzir a produção amilóide, retardando a evolução da doença. O inibidor da γ -secretase teve seu uso descontinuado durante a fase III dos estudos clínicos, e continua-se estudando os inibidores de β -secretase.

c) Remoção do peptídeo β -amilóide – imunoterapia:

A possibilidade de remover o peptídeo β -amilóide depositado no tecido cerebral é a mais recente abordagem antiamilóide e se apoia na imunoterapia na qual o objetivo seria estimular o sistema imunológico a destruir a formação das placas, lentificando o curso ou até mesmo levando a prevenção da doença. Em 1999, estudos em camundongos transgênicos imunizados preveniu o desenvolvimento e a formação de placas β -amilóide, da distrofia neurítica e de astrogliose (Schenk et al., 1999). Estudos posteriores, de Janus et al. (2000) e Morgan et al. (2000), descreveram que a imunização ativa com peptídeo β -amilóide, em camundongos transgênicos, também melhorava o desempenho cognitivo, com reversão do comprometimento de memória e de aprendizado. Estes e outros trabalhos impulsionaram o estudo da imunoterapia em humanos, no entanto, as administrações foram interrompidas após a constatação do quarto caso de meningoencefalite (Check, 2002), levando à suspensão dos estudos clínicos em humanos.

1.4.1.5 Outras abordagens terapêuticas

a) Fator de crescimento neuronal

Os neurônios colinérgicos são sensíveis à ação do fator de crescimento neuronal (NGF, do original em inglês: *nerve growth factor*). Assim, alguns estudos tentaram testar essa nova possibilidade terapêutica no tratamento da DA. O NGF poderia reduzir a perda de neurônios colinérgicos no córtex e hipocampo. A administração intraventricular do NGF em 3 pacientes com DA melhorou o fluxo sanguíneo cerebral e o metabolismo da glicose avaliado por tomografia por emissão de pósitrons (PET). Esses pacientes apresentaram, entretanto, sérios efeitos adversos, com perda de peso e dores intensas. O estudo foi interrompido sem que

houvesse a possibilidade de se avaliar uma eventual melhora do estado cognitivo (Nordberg, 2003).

b) Antioxidantes:

Considerando as evidências de que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da DA, a utilização de medidas antioxidantes parece ter um papel importante no tratamento (Berman et al., 2004). Desse modo, a vitamina E (alfa-tocoferol) em doses altas e a selegilina têm sido empregadas como adjuvantes do tratamento da DA. Embora não proporcionem melhora objetiva da cognição, podem retardar a evolução natural da doença, exercendo um suposto efeito neuroprotetor (Orestes, 2005).

c) Estrógenos:

O estradiol promove uma neuroproteção uma vez que pode alterar o balanço de genes responsáveis pela expressão de proteínas pró e antiapoptóticas, estimular a síntese de fatores de crescimento e seus receptores e também pode interagir com vias de transdução de sinal. Algumas características estruturais das células nervosas são também influenciadas pela ativação de receptores estrogênicos, como a melhora da plasticidade celular, a manutenção do citoesqueleto celular e a recuperação de axônios após um dano. Tudo isto leva à recuperação de conexões sinápticas entre neurônios e pode fortalecer as células na luta pela sobrevivência pós-insulto (Cardona-Gómez et al., 2001). Dados epidemiológicos dos efeitos fisiológicos do estrogênio sugerem seu uso como potencialmente favorável. Entretanto, até o presente não há evidências clínicas suficientes nesse sentido. Além disso, considerando os efeitos adversos recentemente demonstrados, a sua prescrição específica para a DA não se justifica (Henderson et al., 2005; Mulnard et al., 2000; Mulnard et al., 2004).

d) Antiinflamatórios:

Considerando a reação inflamatória que ocorre na formação das placas amilóides, os antiinflamatórios parecem exercer um importante papel neuroprotetor na patogênese da DA. Estudos têm observado o uso de drogas antiinflamatórias não-esteroidais e glicocorticóides esteroidais como opção de tratamento para pacientes portadores da DA (Tuppo & Arias, 2005). Além disso, dados epidemiológicos indicaram que as drogas antiinflamatórias não esteroidais foram capazes de reduzir o risco de desenvolvimento da DA (Hoozemans et al., 2003). Estudos têm demonstrado que o RNA mensageiro (RNAm) da ciclooxigenase-2 (COX-2) está consideravelmente aumentado em áreas afetadas pela doença de Alzheimer (Ho

et al., 1999), sugerindo o envolvimento da COX-2 nessa doença. Portanto, a eficácia dos antiinflamatórios não-esteroidais pode ser atribuída ao bloqueio específico da isoforma COX-2 no cérebro de pacientes portadores da doença (Li et al., 2004).

e) Estatinas:

Diversos estudos básicos mostram a influência dos níveis de colesterol na via metabólica do amilóide com implicações sobre a patogenia da DA (Evans et al., 2004). Entretanto, clinicamente não há ainda resultados consistentes em relação ao uso de estatinas na DA (Li et al., 2004; Zamrini, 2004).

f) Ginkgo-biloba:

O extrato de Ginkgo-biloba (GB), denominado EGb761, contém porcentagens específicas de glicosídeos de ginkgoflavonas (24%) e terpenóides (6%), entre estes últimos os bilobalídeos e os ginkgolídeos A, B, C, M e J. A ação combinada desses princípios ativos presentes no extrato promove o incremento do suprimento sanguíneo cerebral pela vasodilatação e redução da viscosidade sanguínea, além de reduzir a densidade de radicais livres de oxigênio nos tecidos nervosos (Kleijnen & Knipschild, 1992). O ginkgolídeo B é antagonista do receptor do fator ativador de plaquetas, daí suas propriedades de antiagregação plaquetária (Luo et al., 2002). Contudo, os benefícios à saúde humana, em particular sobre a cognição, não foram totalmente estabelecidos (Dartigues et al., 2007, Gabryelewicz et al., 2005, Frank & Gupta, 2005).

Laboratórios farmacêuticos do mundo inteiro afirmam que o extrato de GB pode aumentar a concentração, melhorar a memória e aliviar sintomas de demência, porém isso ainda não foi comprovado com estudos clínicos. Uma revisão com base em dados da literatura investigou a eficácia do tratamento com o GB e demonstrou em linhas gerais que não há diferença significativa entre GB e placebo nas escalas de avaliação cognitiva. O uso de Ginkgo-biloba parece ser seguro pois a taxa de eventos adversos nos estudos descritos é similar à do placebo. Entretanto, conforme já indicado, não há evidência suficiente que comprove a eficácia do medicamento no tratamento e/ou prevenção de distúrbios de memória (Carmo Filho, 2010).

1.4.2 Terapia dos sintomas

A sintomatologia psiquiátrica em pacientes portadores de demência começou a ser estudada mais intensamente nas décadas de 80 e 90. Nesse período, várias escalas para mensurar as alterações psiquiátricas foram desenvolvidas. Em 1996, um consenso do *International Psychogeriatric Association* (IPA) criou o termo sintomas psicológicos e comportamentais da demência (SPCD) para se referir às alterações psiquiátricas associadas às demências e as definiu como: alterações na sensopercepção, no conteúdo de pensamento, no humor ou no comportamento que ocorrem frequentemente em pacientes portadores de demência (Finkel et al., 1996).

Portanto, o paciente com DA pode desenvolver uma ampla variedade de transtornos comportamentais, que incluem depressão, agitação, alucinação, delírios, ansiedade, violência, insônia, perambulação, que podem causar sofrimento considerável para os membros da família e para quem cuida do paciente profissionalmente. As abordagens não farmacológicas devem anteceder à terapia medicamentosa. Entre elas, podemos encontrar atividades simples, que ocupem o tempo e tragam satisfação e bem-estar, como se sentar à mesa, tirar o pó da casa e uma variedade de atividades manuais, além de promover reuniões sociais, evitar sestas durante o dia, usar o banheiro antes de deitar, manter ambiente calmo, evitar confronto com o paciente. Tudo isto preenche a sua vida e promove um sono noturno mais tranquilo. Entre as medidas não farmacológicas para o tratamento do paciente com DA cabe destacar a estimulação para pacientes com apatia, a melhor estruturação do tempo, da ocupação e do meio ambiente, elaboração de programas para o cotidiano, desenvolvimento de rotinas, etc (Maria et al., 2005)..

Muitos estudos sugerem haver melhoras em pacientes deprimidos com DA quando tratados com antidepressivos e, ainda mais, que tal melhora pode ocorrer mesmo que o quadro depressivo não esteja claramente definido (Reifler, 1989). Este é um dado muito importante e justifica a ênfase do tratamento psicofarmacológico para o paciente com Alzheimer, principalmente se considerarmos que, de modo geral, a depressão na DA tende a responder bem às medicações antidepressivas. Mas os candidatos ao tratamento antidepressivo devem ser minuciosamente avaliados, pois ao lado dos benefícios dos antidepressivos, muitos problemas de conduta na DA podem ser mais bem conduzidos com um importante apoio de mudanças ambientais e sem esses medicamentos (Maria et al., 2005).

Para os pacientes com DA, os antidepressivos do tipo Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) constituem as drogas de primeira escolha no tratamento da depressão na demência, uma vez que não apresentam os efeitos colaterais anticolinérgicos, cardíacos e autonômicos dos antidepressivos tricíclicos, além de serem seguros em superdosagens. Os ISRS podem melhorar múltiplos sintomas da doença de Alzheimer, incluindo a irritabilidade, inquietude, ansiedade, medos e episódios de confusão (Nyth & Gottfries, 1990; Gottfries et al., 1992).

A fluoxetina, por ser uma substância ativadora, deve ser prescrita aos pacientes mais apáticos e pela manhã. Esse ISRS tem maior tendência de causar anorexia e perda de peso, um efeito indesejável e potencialmente importante se considerarmos a tendência natural dos pacientes com DA a perder peso. A paroxetina deve ser preferida em pacientes com ansiedade mais proeminente devido ao seu efeito ansiolítico, além de antidepressivo. Entre os antidepressivos atípicos, aqueles com ação fundamental de agonistas adrenérgicos, a reboxetina, cujo perfil clínico o torna muito estimulante, pode ser útil em pacientes apáticos. Também a mirtazapina, outro antidepressivo atípico, pode ser usada seletivamente por causa do seu efeito antináusea e estimulante do apetite.

Atualmente não têm sido recomendados os antidepressivos tricíclicos para idosos. Além de poderem piorar os déficits cognitivos, também podem provocar hipotensão ortostática e estranheza da consciência. A hipotensão ortostática é potencialmente perigosa para os idosos considerando o risco de quedas. Apesar disso, alguns tricíclicos, como é o caso da amitriptilina e da nortriptilina, podem ser usados na DA devido aos seus efeitos sedativo e antidepressivo.

Existem duas categorias de antipsicóticos que podem ser utilizadas no tratamento psicofarmacológico dos SPCD:

- a) antipsicóticos típicos – o mecanismo de ação é de alta afinidade e de alto antagonismo a receptores dopaminérgicos D2. Esses compostos bloqueiam receptores dopaminérgicos D2 no estriado quando utilizados cronicamente, o que acarreta no surgimento de sintomas extrapiramidais. Constituem exemplos dessa categoria o haloperidol, a tioridazina e a clorpromazina.
- b) antipsicóticos atípicos – embora existam diferenças na afinidade por receptores nos medicamentos dessa classe, o mecanismo de ação envolve maior afinidade por receptores serotoninérgicos 5HT₂ do que por receptores dopaminérgicos D2. A ação antagonista serotoninérgica dos antipsicóticos atípicos diminui o aparecimento de sintomas

extrapiramidais. Os agentes disponíveis dessa classe são a clozapina, a olanzapina, a risperidona, a quetiapina e a ziprasidona.

Os antipsicóticos atípicos têm sido utilizados como drogas de escolha frente aos típicos por apresentarem eficácia semelhante e menor perfil de efeitos adversos tais como: sedação, confusão mental e parkinsonismo secundário (Gareri et al., 2004; Tariot et al., 2006).

1.4.3 Terapia profilática

Baseado no que se entende da evolução da DA e na relação existente entre o tratamento farmacológico e a progressão da doença, e uma vez que o tratamento não leva a cura, a prevenção da doença começa a ter um importante papel nesse contexto. Estudos mostraram que atividades que estimulem a cognição, como leitura de jornais e livros, assistir TV, jogar cartas, palavras cruzadas e tocar instrumento musical foram associadas com a redução de risco para DA após 4 anos de acompanhamento. O aumento da atividade cognitiva associou-se a redução de risco de 64% de DA mas, no entanto, não modificou o declínio cognitivo em 4 anos (Wilson et al., 2002).

O controle e prevenção de algumas doenças parecem colaborar para a diminuição do risco de DA. O uso de medicações para o controle de pressão está associado com a preservação cognitiva em idosos, reduzindo o risco de DA em 38% durante cinco anos de acompanhamento. Tanto a pressão arterial sistólica muito elevada quanto a pressão arterial diastólica muito baixa foram associadas com aumento do risco de DA e demências em geral (Murray et al., 2002). O nível de colesterol aumentado também demonstrou-se um fator de risco para a doença, portanto, as medicações redutoras dos níveis de colesterol poderiam ser usadas como protetores da doença. No entanto, como visto anteriormente, as estatinas ainda não possuem sua eficácia bem definida (Whitmer, 2005).

A resistência à insulina nos tecidos pode promover aumento nos níveis do peptídeo β -amilóide e de agentes inflamatórios estando, portanto, associada a patogenia da DA. Medidas comportamentais que previnam o surgimento de Diabetes Mellitus, como redução de peso pela prática de atividades físicas e controle dietético são favoráveis na prevenção do surgimento da DA (Risner et al., 2006).

Alguns fatores dietéticos podem estar associados ao risco de DA. Por exemplo, o alto consumo de gorduras saturadas e não tão altos de gorduras trans-saturadas aumentam o risco

de DA. Já em relação as gorduras poli-insaturadas ou monoinsaturadas e vegetais parece apresentar um efeito protetor contra o declínio cognitivo em idosos, com considerável redução do risco de DA (Morris et al., 2003). Em um modelo experimental ajustado para idade e outros fatores de risco, pacientes que consomem peixes ricos em ômega 3, uma vez por semana ou mais apresentaram 60% menor risco de desenvolverem DA, comparados àqueles que raramente ou nunca consumiam peixes (Morris et al., 2003 - 2).

A respeito dos tratamentos descritos, é importante ter expectativas realistas sobre os potenciais benefícios das propostas adotadas. Nenhum fármaco atualmente em uso cura a DA ou impede definitivamente o seu avanço. Quando os medicamentos funcionam, o seu grande mérito é conseguir atrasar o curso da doença, prolongando a qualidade de vida e as capacidades cognitivas do paciente. Porém, cedo ou tarde, a doença irá causar demência grave e morte do paciente. De fato, no momento em que o diagnóstico da doença é feito, o quadro de demência já está instalado, ou seja, já é possível observar danos cognitivos causados pela destruição dos neurônios. Danos esses que, por ocasião do diagnóstico, já seriam irreparáveis. Estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce vêm recebendo uma grande ênfase. Além disso, a preocupação com a prevenção da doença tem sido alvo de inúmeros trabalhos científicos. Porém, deve-se levar em conta que a terapêutica preventiva descrita até agora não oferece garantias do não desenvolvimento da doença.

Baseado na fisiopatologia da doença e em dados epidemiológicos dos casos de DA, é possível constatar uma relação entre os receptores nicotínicos e o desenvolvimento da doença de Alzheimer, sugerindo uma potencial via de ação preventiva. Tal relação será descrita a seguir.

1.5 **Papel dos receptores nicotínicos no tratamento da DA**

Atualmente, existem muitas evidências indicando que substâncias moduladoras de receptores nicotínicos afetam o aprendizado e a memória. A nicotina e outros agonistas nicotínicos podem melhorar as funções cognitiva e psicomotora, enquanto que antagonistas nicotínicos causam deficiência na cognição (Maelicke & Albuquerque, 2000). A nicotina ((S)-3-(1-Methyl-2-pyrroli-dinyl) pyridine), principal componente psicoativo do cigarro, é uma substância alcaloide que se liga ao receptor nicotínico de acetilcolina, exercendo um efeito dose-dependente.

O tabagismo é amplamente reconhecido hoje como uma doença crônica gerada pela dependência da nicotina. O fumante de tabaco é exposto continuamente a mais de 4 mil substâncias tóxicas, muitas delas cancerígenas. Esta exposição faz do tabagismo o mais importante fator de risco isolado de doenças graves e fatais. Estudos mostram que o hábito de fumar promove um risco médio de 72% como fator para o desenvolvimento da DA (Cataldo et al., 2010).

O possível efeito protetor da nicotina foi entendido por outros autores como produto de um viés causado pela mortalidade precoce entre os fumantes, resultando em uma porcentagem mais alta de pacientes não fumantes com DA (Riggs, 1995). Na verdade, estudos de coortes recentes sugerem que, ao contrário do que foi indicado, o tabagismo aumenta, sim, a probabilidade das demências em geral e particularmente da DA (Ott et al., 1998). Porém, esse entendimento inicial de uma relação inversa entre tabagismo e surgimento da DA, além de ter sido um pontapé inicial para a investigação do papel da nicotina na fisiopatologia da doença, continua sendo objeto de estudo de bastante interesse. Essa relação entre a DA e a dependência da nicotina foi inicialmente descrita como uma associação inversa, uma vez que se acreditava que fumantes teriam menor predisposição para o desenvolvimento da doença em relação à população em geral (VanDujin, 1994). Uma revisão da literatura de 19 estudos caso-controle concluiu que o consumo de cigarros em algum período da vida diminuiria a probabilidade de desenvolvimento da DA (Lee, 1994).

O efeito neuroprotetor da nicotina está associado ao fato dela intensificar a produção de acetilcolina tanto em modelos animais quanto no homem (Court et al., 1991; Grossberg et al., 1989, London et al., 1989). Sugere-se, pois, que a nicotina isolada ou veiculada pelo tabaco pode compensar a perda dos receptores colinérgicos, retardando a progressão da doença (Breteler et al., 1992; Dujin & Hofman, 1997). Todavia, as pesquisas com nicotina administrada em pacientes com Alzheimer, em várias doses por via subcutânea, endovenosa ou por meio de patch-nicotina, fornecem resultados contraditórios e pouco encorajantes: de um lado, agravamento da ansiedade e efeitos depressivos, e de outro, resultados discretos ou nulos quanto à atenção visual, informação e aprendizado e memória (Jones et al., 1992; Newhouse et al., 1988, Sahkian et al., 1989). Uma vez que é uma droga tóxica, as pesquisas sobre o assunto precisam ser aprofundadas com os cuidados exigidos para a administração da nicotina.

Para entender melhor esse efeito de neuroproteção exercido pela nicotina, há um interesse crescente sobre o papel dos receptores nicotínicos na DA. Foi descrito que a nicotina pode proteger os neurônios contra a toxicidade do A β (Kihara et al., 1998). Por outro lado, a

observação de que a nicotina aumenta a cognição (Rusted et al., 2000) sugere o envolvimento dos receptores nicotínicos no efeito neuroprotetor da nicotina. Outros estudos demonstraram que a nicotina pode ter propriedades antioxidantes potentes e que apresenta efeito de neuroproteção frente ao peptídeo A β em culturas de neurônios hipocampais (Liu & Zhao, 2004). No cérebro de fumantes foi observado um aumento na expressão dos receptores nicotínicos da ACh, o que está relacionado com neuroproteção (Gentry & Lukas, 2002). Alguns estudos sugerem um possível mecanismo para este efeito neuroprotetor, sendo que a maioria deles se refere à ativação dos nAChRs. No entanto, estudos mostraram que neurônios corticais de ratos são protegidos pelo metilcaconitina, um antagonista da subunidade $\alpha 7$ (Martin et al., 2004), o que sugere a possibilidade de que a neuroproteção mediada pelos agonistas $\alpha 7$ pode, na verdade, ser devida à dessensibilização em vez da ativação deste receptor.

Como visto, a participação de alterações dos receptores nicotínicos na DA tem sido motivo de bastante interesse pela comunidade científica. Estudos mostraram que na avaliação post-mortem direta da expressão de receptores, seja por western blot (Burghaus et al., 2000), seja por imunohistoquímica (Sparks et al., 1998), observa-se a perda de receptores nicotínicos. A redução também foi demonstrada *in situ* com o uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Nordberg et al., 1995). Em 2000, Wang e colaboradores demonstraram uma interação direta entre nAChRs $\alpha 7$ e o peptídeo β -amilóide (1-42), com a ligação ocorrendo em concentrações picomolares.

Os receptores nicotínicos são proteínas integrais de membrana pertencentes à superfamília de canais iônicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na⁺ e K⁺ (Halliwell RF, 2007). Os nAChRs são combinações pentaméricas de subunidades individuais, organizadas ao redor de um poro central (Nai et al., 2003). No cérebro são formados por várias subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 10$ e $\beta 2$ - $\beta 4$, e as combinações pentaméricas dessas subunidades tanto podem ser heteroméricas ($\alpha 2\beta 3$, por exemplo) quanto homoméricas ($\alpha 7$, por exemplo) (Le Novere et al., 2002). Em mamíferos, os subtipos de nAChR $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ são os mais proeminentes e estão presentes em regiões pós-, pré-, peri e extrasinápticas, sendo amplamente expressos no SNC, exercendo propriedades diferentes. O nAChRs $\alpha 4$ é expresso apenas no córtex e no cerebelo, enquanto que o $\alpha 7$ é expresso no córtex, no hipocampo e no tálamo. A principal característica do $\alpha 4\beta 2$ é possuir alta afinidade pela nicotina. Já o $\alpha 7$, que liga com alta afinidade a α -bungarotoxina (α -BTX), uma neurotoxina de veneno de serpente, tem uma dessensibilização rápida e reversível e sua ativação promove um aumento da permeabilidade celular ao cálcio (Albuquerque et al.,

1995). Os nAChR $\alpha 7$ são caracterizados por sua alta taxa de permeabilidade a íons Ca^{2+} em relação ao Na^+ e curto tempo médio de abertura dos canais ($\sim 100\text{-}400 \mu\text{s}$) (Uteshev, 2012; Shen & Yakel, 2009). O curto tempo de abertura e a rápida dessensibilização do $\alpha 7$ pode ser considerado como um mecanismo de proteção celular contra um excessivo influxo de Ca^{2+} (Franklin & Johnson, 1992). Quando um agonista (ACh ou nicotina) está continuamente presente, os nAChRs $\alpha 7$ são bloqueados pela dessensibilização ou pelo longo tempo de abertura dos canais induzidos pelo próprio agonista (Uteshev et al., 2002). Os nAChR $\alpha 7$ são capazes de alternar entre um canal ativo, aberto, que se liga seletivamente a agonistas, e um estado de repouso, com o canal fechado, que se liga seletivamente a antagonistas (Monod et al., 1965). Devido a sua alta permeabilidade a íons Ca^{2+} , a ativação dos nAChRs $\alpha 7$ pode produzir respostas metabotrópicas nas células excitadas, incluindo a liberação de neurotransmissores controlada por Ca^{2+} nas regiões pré e pós-sinápticas, respectivamente, podendo controlar a eficácia da transmissão sináptica, a estimulação da transcrição genética e a biossíntese proteica (Maelicke et al., 2000; Maelicke & Albuquerque, 2000; Maelicke et al., 2001).

1.6 Cálcio e patologia neuronal: perspectivas terapêuticas

A sobrecarga das células com excesso de Ca^{2+} é um mecanismo citotóxico que pode causar a morte. Na verdade, acredita-se que a entrada de Ca^{2+} excessiva é um mecanismo patogênico crítico em várias doenças do sistema nervoso central e cardiovascular, por exemplo: hipertensão, doença isquêmica cardíaca, infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral. A acumulação excessiva de Ca^{2+} nos neurônios também tem sido associada com as doenças neurodegenerativas crônicas, como a DA ou de Parkinson. O Ca^{2+} parece desempenhar também um papel importante em patologias do tipo epilepsia, que cursam com hiperexcitabilidade neuronal. Dada esta importância patológica, não é de se estranhar que a maioria dos esforços em pesquisa e desenvolvimento de drogas que interfiram com a homeostase celular do Ca^{2+} foram canalizados para a prevenção da entrada e da sobrecarga celular de Ca^{2+} . No entanto, nos últimos anos, está incorporada a ideia de "stress reticular" como mecanismo patogênico da morte neuronal na DA (Paschen, 2001). A disfunção do retículo endoplasmático é manifestada por uma diminuição dentro do retículo endoplasmático dos níveis de Ca^{2+} . O Ca^{2+} está circulando continuamente entre a luz reticular e o citosol.

Escapa para o citosol via receptor de Ca^{2+} intracelulares e retorna ao retículo via SERCA. Quando se bloqueia a SERCA (Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoendoplasmático) pela tapsigargina, provoca-se o esvaziamento de Ca^{2+} reticular e a entrada da célula em apoptose por excitotoxicidade. Portanto, a tapsigargina é frequentemente utilizada como ferramenta experimental para induzir a apoptose em determinados tipos celulares (Wei et al, 1998). Também ocorre a depleção dos depósitos de Ca^{2+} quando há redução dos níveis da “proteína do stress” GRP78 (proteína regulada por glicose), que está curiosamente diminuída nos cérebros dos pacientes com Alzheimer (Katayama et al., 1999). A capacidade de tamponamento de Ca^{2+} do retículo é diminuída nos neurônios mais velhos (Kisichuk e Verkhratsky, 1996), um achado que sugere uma maior vulnerabilidade e que está relacionado com o fato de que a idade é um fator de risco importante na DA. Também tem sido observado que a alteração de Ca^{2+} reticular está relacionada com o depósito de β -amilóide (Querfuth & Selkoe, 1994). Como visto anteriormente, o peptídeo β -amilóide é formado no retículo endoplasmático (Hartmann et al., 1997) como resultado do processamento da APP pelas presenilinas que também estão localizados no retículo (Kovacs e al., 1996). O peptídeo β -amilóide 1-42 pode alterar a homeostase de Ca^{2+} reticular dada a sua capacidade de se ligar a poros permeáveis a este cátion (Engstrom et al, 1995; Pollard et al., 1995). Assim, a alteração da capacidade do retículo de manter os níveis intracelulares de Ca^{2+} pode ser um mecanismo patogênico importante na lesão neuronal típica da DA e de outras doenças neurodegenerativas.

1.7 Terapias com agonistas do nAChR $\alpha 7$

- a) Bencherif e Lippiello (2010) sugeriram que "o elo perdido na compreensão da etiopatogenia da AD pode ser o $\alpha 7$ nAChR". Baseando-se no fato de que a atuação dos nAChR nos processos de memória e aprendizado indicam sua participação na fisiopatologia e nos processos inflamatórios característicos da DA (Albuquerque et al., 2009). E estes receptores, particularmente, o nAChRs $\alpha 7$, foram apontados como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos para a DA (Nordberg, 2001). Diferentes agonistas dos nAChRs $\alpha 7$ vêm sendo propostos (Taly & Charon, 2012; Thomsen & Mikkelsen, 2012; Toyohara & Hashimoto, 2010). Essas drogas

melhoram a performance nos testes de aprendizado e memória em modelos animais, incluindo primatas (Cannon et al., 2013). Alguns exemplos são:

- b) GTS-21: (DMXB-A) [3-[(3E)-3-[(2,4-dimethoxyphenyl) methylidene]-5,6-dihydro-4Hpyridin-2-yl]pyridine:

Um agonista parcial do nAChRs $\alpha 7$ e inibidor dos receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ e serotoninérgicos 5HT3. Foi bem tolerado, melhorou a atenção, a memória de trabalho (curto prazo) e a memória secundária episódica (Kitagawa et al., 2003). Os estudos com essa droga parecem estar completos, mas os resultados ainda não foram divulgados.

- c) ABT-107: (3R)-3-{{6-(1H-indol-5-yl)pyridazin-3-yl}oxy}-1-azoniabicyclo [2.2.2] octane (2R,3R)-3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoate:

Um potente e seletivo agonista do nAChRs $\alpha 7$, com alta afinidade para esses receptores em humanos, é atualmente desenvolvido pelo laboratório Abbott para o tratamento da DA e também para o tratamento de déficits cognitivos associados a esquizofrenia (Malysz et al., 2009).

- d) EVP-6124: [(R)-7-chloro-N-(quinuclidin-3-yl)benzo[b]thiophene-2-carboxamido]:

Um agonista parcial com alta afinidade pelo nAChR $\alpha 7$. Os resultados mais significativos em termos de eficácia e segurança foram melhora cognitiva e clínica, sendo seguro e bem tolerado. O estudo estava em fase III, mas parece que não será liberado pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Patrizia et al., 2014).

- e) RG3487: [N-[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-1Hindazole-3-carboxamide hydrochloride:

Um potente agonista parcial do nAChRs $\alpha 7$ em humanos. A droga mostrou resultados significativamente positivos em relação à memória de trabalho, velocidade da memória, atenção e continuidade da atenção. Apesar de se acreditar que o RG3487 tem potencial para o tratamento da DA, a Roche descontinuou a produção da droga (Patrizia et al., 2014).

De fato, a justificativa para os estudos com agonistas do nAChR $\alpha 7$ no tratamento dos déficits cognitivos parece ser forte e, como visto, é claro o papel neuroprotetor desses receptores. Dentre os agonistas propostos até o momento, o único que teve seu estudo de fase

II completo com sucesso foi o EVP-6124, mas até agora não foi aprovado pela FDA. Visto que a ativação desses receptores pode induzir proliferação celular e inibição da apoptose, a utilização clínica de novos agonistas do nAChRs $\alpha 7$ é de significativa importância. Um destes fármacos é a vareniclina.

1.7.1 Vareniclina

A vareniclina foi sintetizada através de pesquisas da estrutura e das propriedades funcionais dos nAChRs e dos efeitos da citisina (um ligante útil para estudar os nAChRs) (Pabreza et al., 1991). A droga sintética possui um tempo de meia-vida de aproximadamente 24h (Faessel et al., 2006c). Sua concentração máxima ocorre dentro de cerca de 3-4 h após a administração oral, e concentrações plasmáticas constantes são normalmente atingidas dentro de 4 dias após doses regulares em adultos saudáveis (Faessel et al., 2006b). As concentrações plasmáticas e os parâmetros farmacocinéticos após a administração da vareniclina não foram afetados pelo consumo de alimentos e foram semelhantes para fumantes e não fumantes (Faessel et al., 2006a). Sua metabolização e excreção são simples em camundongos, ratos, macacos e seres humanos (Obach et al., 2006b). Nos seres humanos, menos de 10% da vareniclina é excretada como metabólitos e aproximadamente 92% é excretada inalterada na urina, indicando que a principal via de depuração é a excreção renal (Obach et al., 2006a). Não há contraindicações e não possui interações medicamentosas conhecidas (Pfizer Ltd. 2007. Champix™ summary of product characteristics. UK). Além disso, ela parece ser segura e bem tolerada em adultos saudáveis de 18 a 65 anos de idade (Gonzales et al., 2006) e também em idosos saudáveis com mais de 65 anos (Burstein et al., 2006).

A vareniclina foi desenvolvida para ter um alta afinidade ao nAChR $\alpha 4\beta 2$ no sistema dopaminérgico-mesolímbico (Coe et al., 2005; Rollema et al., 2007) e agir como um agonista parcial seletivo do nAChR $\alpha 4\beta 2$. Como outros agonistas parciais (por exemplo, a buprenorfina), tem tanto efeito agonista como antagonista. Ligando-se no nAChR $\alpha 4\beta 2$, aumenta o tônus dopaminérgico em áreas cerebrais relevantes, o que diminui o desejo de nicotina e alivia os sintomas de abstinência (efeito agonista). Além disso, o bloqueio da ligação da nicotina nestes receptores reduz a liberação de dopamina induzida pela nicotina e, conseqüentemente, seus efeitos de reforço/recompensa (efeito antagonista) (Coe et al., 2005; Rollema et al., 2007) justificando seu uso no tratamento do tabagismo (Raybuck et al., 2008).

A vareniclina também se liga com alta afinidade ao nAChR $\alpha 7$, agindo como um agonista total desse receptor (Coe et al., 2005; Rollema et al., 2007). A interação entre o peptídeo A β e o nAChR $\alpha 7$ tem sido descrito em diversos estudos (Buckingham et al., 2009). Como visto anteriormente, estudos post-mortem iniciais em tecidos cerebrais com DA observaram nAChRs $\alpha 7$ ligados aos peptídeos A β (Wang et al., 2000). Essa observação foi confirmada por outros estudos em cérebros com DA (Nagele et al., 2002) e no hipocampo de ratos (Pettit et al., 2001). Foi observado também em camundongos transgênicos knockout dos nAChRs $\alpha 7$ os efeitos de proteção contra a toxicidade (Dineley et al., 2001) e melhora da função cognitiva (Hernandez et al., 2010).

Outro estudo post-mortem que caracterizou a interação entre diferentes subtipos de receptores nicotínicos e o peptídeo A β fibrilar sugere que a vareniclina perturba essa interação entre o A β fibrilar e os nAChRs $\alpha 7$ no córtex frontal de cérebros com DA (Ruiqing Ni et al., 2013). Vários modelos pré-clínicos de cognição e atenção sugerem um potencial benefício do tratamento com vareniclina (Rollema et al., 2009), e os estudos clínicos parecem confirmar esses resultados. Um estudo realizado com 14 fumantes com esquizofrenia revelou que a vareniclina estava associada com os resultados positivos dos testes cognitivos em fumantes que buscavam largar o vício (Patterson et al., 2009). No entanto, outro estudo onde foi administrado vareniclina por seis semanas, sugeriu que o tratamento não melhorou a cognição em sujeitos com DA moderada (Seong Yoon Kim et al., 2014).

Como visto, o tratamento com drogas que estimulam o nAChR $\alpha 7$ modulam os mecanismos de sinalização patogênico dos nAChRs $\alpha 7$ em cérebros com DA, no entanto, atualmente existem pouquíssimas pesquisas relacionando a DA ao tratamento com o agonista $\alpha 7$ vareniclina. A vareniclina, apesar de ser um medicamento em fase II de testes clínicos (clinicaltrials.gov NCT00744978), é um candidato promissor na investigação da melhora cognitiva em pacientes com DA. Diante do potencial terapêutico da vareniclina, é imprescindível o estudo mais aprofundado dos efeitos deste fármaco sobre o surgimento e evolução do Alzheimer em modelos in vivo. Assim, no presente estudo testamos a hipótese de que a vareniclina, atuando como agonista parcial dos receptores $\alpha 4\beta 2$ mas principalmente como agonista total do receptores nAChRs $\alpha 7$, exerça um efeito protetor, preservando a memória em camundongos com características de doença de Alzheimer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo principal testar a possibilidade de que o tratamento preventivo com vareniclina é capaz de reverter deficiências de desempenho em tarefas de memória e aprendizado em um modelo experimental de neurodegeneração por infusão intracerebroventricular de peptídeo β -amilóide em camundongos Suíços.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho de memória e aprendizado no Teste da Esquiva Passiva;
- b) Avaliar o desempenho de memória e aprendizado no Teste de Reconhecimento de Objetos;
- c) Avaliar o desempenho de memória e aprendizado no Teste do Labirinto em Cruz Elevado modificado;
- d) Avaliar os comportamentos associados à depressão no Teste de Suspensão pela Cauda;
- e) Avaliar a atividade locomotora através do teste do Campo Aberto e Teste de Suspensão pela Cauda;
- f) Investigar os efeitos morfológicos no sistema nervoso central da infusão do peptídeo β -amilóide associada ou não com os tratamentos com vareniclina e nicotina;
- g) Investigar, através de análise imunohistoquímica, possíveis evidências de ativação de processos inflamatórios associados às alterações morfológicas da micróglia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia (LN) do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG/UERJ (protocolo nº CEUA/006/2012), em conformidade com a Lei nº 11.794/2008, e estão de acordo com a Declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelos Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health - NIH*) dos E.U.A.

3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 86 camundongos Suíços machos, provenientes de 36 ninhadas, criados e mantidos no biotério de camundongos do LN num ciclo diário de 12 h claro/escuro (escuro a partir das 13 h), com temperatura controlada (21 ± 1 °C) e com livre acesso à água filtrada e comida (ração comercial padrão para roedores).

Para a formação das ninhadas foram utilizados camundongos adultos, na proporção de três fêmeas para um macho. Após duas semanas do início dos cruzamentos e à medida que a gravidez fosse constatada, as fêmeas grávidas eram separadas em gaiolas individuais e observadas diariamente até o dia do nascimento da prole (PN1). Nesse estudo foram utilizadas ninhadas que contavam, ao nascimento, com 8 a 12 filhotes com o objetivo de padronizar o aporte nutricional. O desmame foi feito no 25º dia pós-natal (PN25), momento em que cada ninhada foi separada da progenitora. As fêmeas foram redirecionadas para outros projetos do laboratório e os machos realocados em caixas com três ou quatro animais que permaneceram juntos até o final do experimento.

3.2 Formação dos grupos experimentais

3.2.1 Seleção dos animais

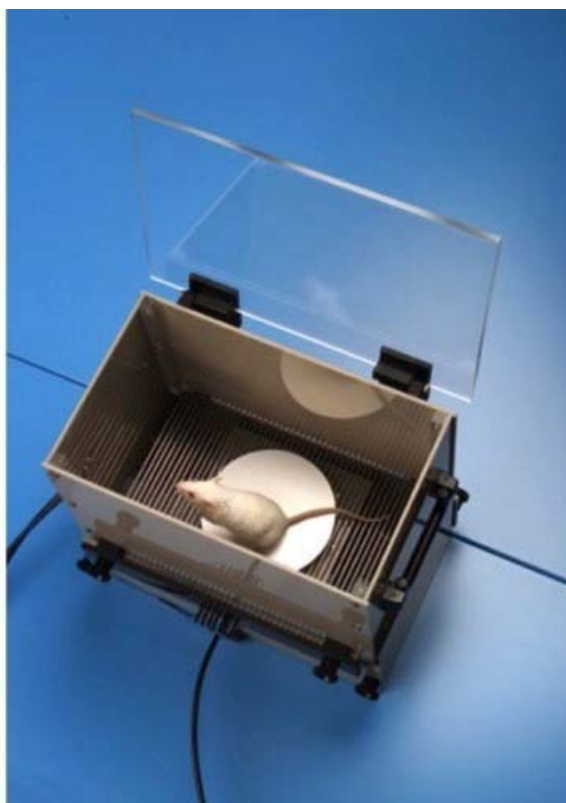
Os animais que participaram do projeto foram selecionados de acordo com sua capacidade de aprender e memorizar uma tarefa de esquiva inibitória em uma sessão de testes que ocorreu em PN75-76. Entre os testes comportamentais mais utilizados para este fim está o Teste de Esquiva Passiva (Izquierdo, 1999; Cammarota et al., 2004). O equipamento de teste (*Ugo Basile Biological Research Apparatus, Varese, Italy*, Figura 6) é constituído de uma plataforma circular de 7 cm de diâmetro, localizada no centro de uma caixa (28 cm × 23,5 cm × 15 cm) a 3 mm acima do piso, com paredes de acrílico. Este último é composto por 40 barras de aço inoxidável (espaçamento entre barras: 5 mm; diâmetro das barras: 2 mm) que estão conectadas a um circuito de corrente elétrica contínua gerada por uma Unidade Eletrônica de Controle (UEC) programável pelo experimentador. Após serem posicionados em cima da plataforma, os animais podem se mover livremente. Ao descer da plataforma e tocar no piso, o animal poderá receber ou não um choque de baixa intensidade (3 mA por 3 s) em função do protocolo adotado pelo experimentador. O mostrador digital localizado no painel da UEC registra o tempo de latência para a descida do animal de cima da plataforma para o piso.

No protocolo adotado no presente estudo para o processo de seleção, no 1º teste (treino: T0) desta 1ª sessão (de seleção), realizada em P75, os animais, ao descerem da plataforma, receberam o choque de baixa intensidade. A latência (medida em segundos) até a descida da plataforma foi anotada. Três horas (T3) e 24 h (T24) após o teste de treino (T0), os animais foram novamente expostos àquele ambiente para avaliação da sua memória ao contexto, cabendo mencionar que o choque não foi aplicado em T3 nem em T24. As latências para a descida da plataforma nestes dois testes (T3 e T24) da sessão de seleção também foram anotadas.

Os animais que atingiram um desempenho satisfatório de aprendizagem, ou seja, aqueles que atingiram um aumento da latência de descida acima de 30% em relação a T0 (Viel et al., 2008) foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais utilizados no presente projeto e que serão apresentados a seguir. Os animais que não obtiveram o

percentual de aumento de latência indicado acima foram retirados do estudo. Aproximadamente 37% dos animais foram excluídos do protocolo experimental neste ponto.

Figura 6: Teste da Esquiva Passiva - Ugo Basile Passive Avoidance StepDown.

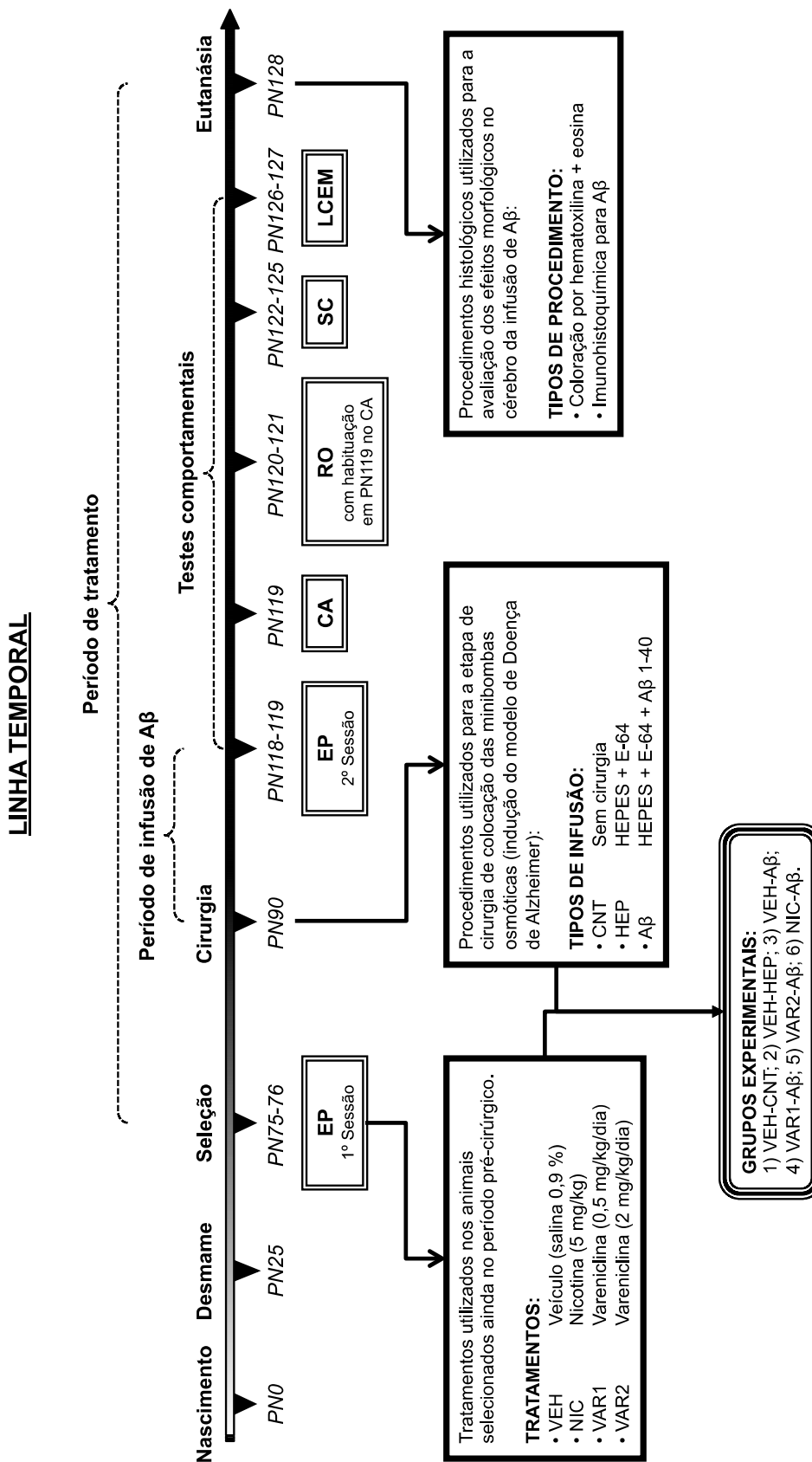


Fonte: Global Biotech.

3.2.2 Período de tratamento

O período de tratamento iniciou-se em PN76 e estendeu-se por 52 dias, até PN127 (Figura 7, Linha do Tempo), período aproximado no qual os camundongos exibem características comportamentais típicas de adultos maduros. Neste período, os animais foram aleatoriamente alocados nos diferentes grupos de tratamento, correspondendo aos 6 grupos experimentais que serão descritos adiante. Animais de uma mesma ninhada não foram alocados para um mesmo grupo experimental, evitando-se assim possíveis efeitos de ninhada. Os seguintes tratamentos foram adotados:

Figura 7: Linha do tempo do estudo.



- a) Tratamento com salina (NaCl 0,9%) v.o. (VEH);
- b) Tratamento com vareniclina (Sigma) na dose 0,5 mg/kg/dia v.o. (VAR1);
- c) Tratamento com vareniclina (Sigma) na dose 2 mg/kg/dia v.o. (VAR2);
- d) Tratamento com nicotina free base (Sigma) na dose 5 mg/kg/dia v.o. (NIC).

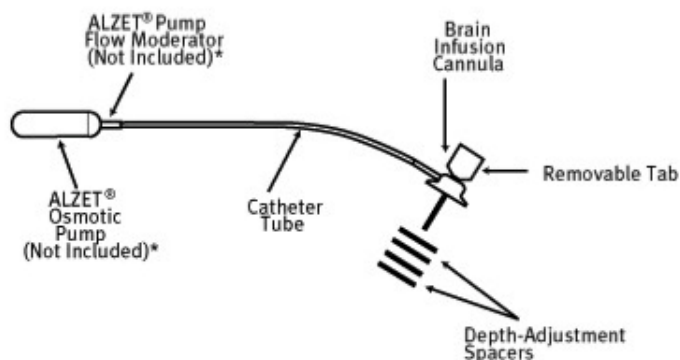
A vareniclina (Sigma) foi diluída em salina para a preparação das soluções de 0,5 mg/ml e 2 mg/ml usadas na gavagem dos animais dos grupos VAR1 e VAR2, respectivamente. A nicotina (Sigma) também foi diluída em salina (5 mg/ml), solução esta que foi administrada aos animais. Todas as concentrações das soluções foram calculadas para que cada animal recebesse na gavagem o volume em microlitros correspondente ao peso do animal em gramas. Por exemplo, um animal NIC que pesasse 50 mg seria tratado via gavagem com 50 µl de solução 5 mg/ml de nicotina. Todos os animais foram gavados durante o período de tratamento. Os grupos que receberam vareniclina ou nicotina foram gavados com suas respectivas soluções e os grupos que foram tratados apenas com salina durante o período de tratamento foram gavados com 100 µl de solução de salina. Todas as gavagens foram feitas no período da manhã, entre 9 e 10 h.

3.2.3 Cirurgia

Em PN90, após um período de 15 dias de tratamento, todos os animais, excetuando-se os alocados para o grupo controle não cirúrgico, foram submetidos à cirurgia para o implante da minibomba osmótica (Brain Kit 3, Alzet, Cupertino, CA, EUA) (Figura 8), seguindo método descrito anteriormente (Frautschy et al., 1998), para a infusão do peptídeo β -amilóide ou para a criação do grupo controle cirúrgico (Figura 7, Linha do Tempo). Os animais foram anestesiados com Avertin (70 mg/kg) e, após a tricotomia e assepsia da parte superior da cabeça, foi feita uma incisão longitudinal da região entre os olhos até a região entre as orelhas. A pele foi afastada e o crânio exposto. O animal foi devidamente imobilizado com o uso de um equipamento estereotáxico (Insight Equipamentos, SP, Brasil) (Figura 9) e, em seguida, uma cânula guia inicialmente posicionada sobre o bregma era deslocada de acordo com as coordenadas estereotáxicas em direção ao ventrículo lateral (0,34 mm posterior ao bregma, 1 mm lateral à linha média e 1 mm de profundidade em relação à superfície do

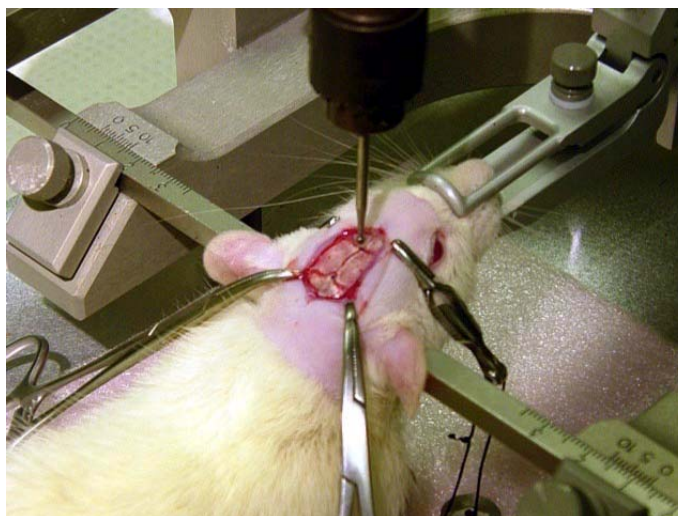
crânio) (Franklin e Paxinos, 1997). Nesta posição, realizou-se a perfuração do crânio e implantação de uma cânula de aço inoxidável de 2 mm de comprimento e 0,31 mm de diâmetro. A outra extremidade da cânula estava ligada por um cateter de polivinilcloro (DE = 1,14 mm, DI = 0,69 mm) a uma minibomba osmótica. Esta foi implantada subcutaneamente no dorso do animal através da mesma incisão longitudinal feita anteriormente. Ao fim da implantação da minibomba, os animais foram suturados. No momento da cirurgia foi administrado um antibiótico (Enrofloxacino 2,5 mg/Kg) em dose única e um antiinflamatório (Flunixinina 2,5 mg/Kg), que foi administrado novamente na manhã seguinte ao procedimento cirúrgico.

Figura 8: Minibomba osmótica e componentes do Kit de Infusão no cérebro ALZET montado antes da implantação.



Fonte: Alzet osmotic pumps.

Figura 9: Animal anestesiado imobilizado no aparelho estereotáxico com crânio exposto para colocação da mini bomba osmótica.



Fonte: A.J.Kirby, London,CA.

3.2.3.1 *Indução do modelo de doença de Alzheimer*

Os animais do grupo controle cirúrgico tiveram suas minibombas previamente preenchidas com solução veículo (HEPES 4 mM pH 8.0 + 0,22 nmol E-64), enquanto que os animais do grupo cirúrgico A β receberam infusão do peptídeo β -amilóide (A β , Gen Script, 0,46 nmol A β + 0,22 nmol E-64) (Frautschy et al., 1998; Viel et al., 2008). O E-64 (trans-epoxi succinil-L-leucinoamino-(4-guanidino-butano), Sigma) utilizado, extraído da *Aspergillus japonicus*, é um inibidor de cisteíno-proteases irreversível, potente e altamente seletivo. As cisteíno-proteases estão envolvidas em vários processos de regulação e de degradação em células animais e vegetais (Grovrin e Levine, 1999). A solução A β usada na minibomba foi diluída em tampão hepes 4 mM, pH 9,0, a uma concentração de 0,5 mg/ml. O conteúdo das minibombas osmóticas foi liberado em um fluxo de 0,11 μ l/h durante 28 dias.

3.2.4 Grupos experimentais

Tendo em vista os diferentes procedimentos adotados para o período de tratamento e cirurgia, os seguintes grupos experimentais foram formados:

- a) VEH-CNT - animais que foram tratados exclusivamente com salina (NaCl 0,9%, v.o.) e não submetidos à cirurgia; n = 15;
- b) VEH-HEP - animais que foram tratados com salina (NaCl 0,9%) e submetidos à cirurgia com infusão de solução controle (HEPES 4 mM + 0,22 nmol E-64); n = 14;
- c) VEH-A β - animais que foram tratados com salina (NaCl 0,9%, v.o.) e submetidos à cirurgia com infusão do peptídeo β -amilóide (0,46 nmol A β + 0,22 nmol E-64); n = 13;
- d) VAR1-A β - animais que foram tratados com vareniclina na dose de 0,5 mg/kg/dia (v.o.) e submetidos à cirurgia com infusão do peptídeo β -amilóide (0,46 nmol A β + 0,22 nmol E-64); n = 13;
- e) VAR2-A β - animais que foram tratados com vareniclina na dose de 2 mg/kg/dia v.o. e submetidos à cirurgia com infusão do peptídeo β -amilóide (0,46 nmol A β + 0,22 nmol E-64); n = 15;
- f) NIC-A β - animais que foram tratados com nicotina free base na dose de 5 mg/kg/dia (v.o.) e submetidos à cirurgia com infusão do peptídeo β -amilóide (0,46 nmol A β + 0,22 nmol E-64); n = 11.

É relevante frisar que o tratamento (com salina, vareniclina ou nicotina) foi iniciado em PN76, 15 dias antes da cirurgia, e que era mantido por mais 37 dias após o procedimento de implantação das minibombas.

3.3 Testes comportamentais

Foram realizados cinco testes comportamentais para avaliação do desempenho cognitivo dos animais: Esquiva Passiva, Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos, Suspensão pela Cauda e Labirinto em Cruz Elevado Modificado. Os testes comportamentais tiveram início ao final do período esperado de infusão do peptídeo A β . Como a minibomba osmótica (Brain Kit 3, ALZET) tem um tempo de infusão de 28 dias (segundo informações do fabricante) e como os animais foram implantados com a minibomba em P90, os testes comportamentais com os animais previamente selecionados em PN76 tiveram início em PN118.

3.3.1 Teste de Esquiva Passiva (EP, Figura 6)

O teste de Esquiva Passiva, que foi empregado inicialmente neste estudo para a seleção dos animais no início do experimento, foi o primeiro a ser utilizado, em P118, após a indução do modelo de Doença de Alzheimer. Como mencionado anteriormente, este teste é classicamente utilizado para a avaliação do desempenho de memória e aprendizado em murinos (Izquierdo, 1999; Cammarota et al., 2004). O protocolo utilizado nesta 2ª sessão de testes foi o mesmo empregado na 1ª sessão (de seleção do animais para o estudo). Tal como na 1ª sessão, a variável medida foi a latência (em segundos) para a descida da plataforma.

3.3.2 Teste do Campo Aberto (CA, Figura 10)

Para a realização deste teste de avaliação da atividade locomotora/exploratória utiliza-se muito frequentemente o equipamento denominado “Campo Aberto” (Walsh & Cummins, 1976). O teste foi desenvolvido por Hall em 1934 e é realizado em uma arena quadrada (45 cm × 45 cm) cercada por paredes (45 cm de altura) de forma que o animal não possa fugir. O piso da arena é marcado com pequenos quadrados (12 periféricos e 4 centrais) que são utilizados na quantificação da atividade locomotora do animal. Pode-se também utilizar a locomoção do, e tempo despendido pelo, animal no centro do CA como medidas de ansiedade. Os animais foram testados no CA em PN119, quatro horas após o último teste (T24) de Esquiva Passiva. O animal foi colocado no centro da arena e foi-lhe permitido explorar o ambiente por 5 min. O teste foi filmado a fim de que os parâmetros comportamentais relacionados a locomoção, ansiedade e comportamentos etológicos como autolimpeza (Espejo, 1997) e alongamentos (Blanchard, Griebel & Blanchard, 2001) fossem avaliados posteriormente. As variáveis medidas foram o número de quadrados percorridos na periferia e no centro do equipamento, bem como o tempo (em segundos) despendido nestas duas áreas do Campo Aberto. A atividade locomotora total correspondeu a soma do número de quadrados percorridos na periferia a do número dos percorridos no centro.

Figura 10: Arena do Teste do Campo Aberto visto de cima.



Fonte: A autora, 2016.

3.3.3 Teste de Reconhecimento de Objetos (RO, Figura 11)

O teste de Reconhecimento de Objetos é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores e baseia-se na tendência natural do animal em explorar, em um ambiente previamente conhecido (habitado), mais um objeto novo em detrimento a um familiar (Ennaceur & Delacour, 1988). O RO e o CA foram realizados com o uso da mesma arena de teste. Assim, o teste de CA, realizado em PN119, constituiu-se no período de habituação dos animais para a realização do teste de RO. No dia seguinte, em PN120, os animais foram submetidos ao RO com os objetos colocados na arena conforme descrição a seguir. O teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Rosa e colaboradores em 2003. Foram utilizados 4 objetos para a realização do RO: A1, A2, B e C. Os objetos A1 e A2 eram idênticos e apresentavam a forma de um cone, o objeto B apresentava uma forma circular e o objeto C apresentava uma forma triangular. Todos os objetos eram feitos de material plástico com tamanho similar e com um padrão de cor distinto. Vinte horas após a habituação, a primeira etapa do teste (Treino) foi iniciada permitindo que o animal explorasse a arena por 5 min na presença de 2 objetos idênticos (A1 e A2) posicionados em duas bordas adjacentes, afastados 10 cm das paredes. O teste para avaliação da memória de curto prazo (T1) foi realizado 1,5 horas depois do Treino e teve duração de 5

min. O T1 foi realizado com a presença de um objeto familiar (A1) e de um novo (B). O teste para avaliação da memória de longa duração (T2) foi realizado 24 h após a sessão Treino (em PN121). Neste teste, o animal foi apresentado a um objeto familiar (A1) e um segundo novo objeto (C) e pôde explorá-los por 5 min. A variável medida foi o tempo de interação com cada um dos objetos. A interação com o objeto correspondia aos momentos em que o animal cheirava ou tocava o objeto com o focinho ou com as patas dianteiras.

Figura 11: Teste de Reconhecimento de Objetos.



Legenda: Na sequência: objetos dispostos em Treino, T1 e T2.

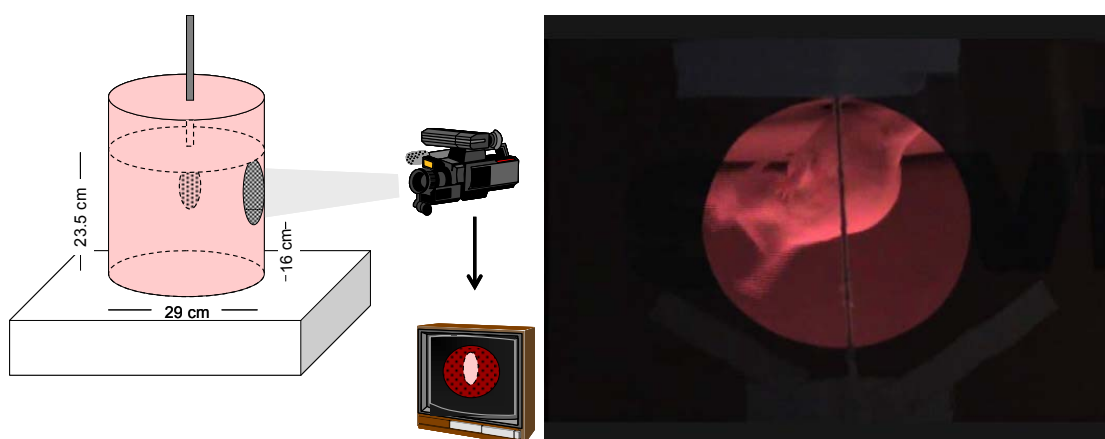
Fonte: A autora, 2016.

3.3.4 Teste de Suspensão pela Cauda (SC, Figura 12)

O teste de Suspensão pela Cauda é um teste comportamental utilizado tanto na avaliação de comportamentos associados à depressão (Steru et al., 1985), como também com a ontogenia da habituação, que é uma forma elementar de memória caracterizada pela diminuição da atividade motora e/ou exploratória ao longo da repetição de múltiplas sessões de teste (Manhães et al., 2012). Os animais são suspensos por suas caudas em uma posição tal que não possa fugir ou agarrar a superfícies próximas. Durante este teste, os comportamentos de fuga (imobilidade e contrações) são quantificados. No presente estudo, os animais foram submetidos ao teste da suspensão pela cauda de PN122 a 125. Os camundongos foram gentilmente afixados por fita adesiva cirúrgica a um eixo de metal. Este eixo foi então parcialmente inserido através de um orifício localizado no centro da tampa superior de um cilindro metálico com 32 cm de altura e 28 cm de diâmetro. O cilindro, que não contava com uma tampa inferior, foi posicionado em cima de um negatoscópio coberto com um filtro

vermelho, de forma que o interior do cilindro era iluminado com luz vermelha. O cilindro apresentava uma abertura na lateral de 7 cm de diâmetro. O eixo metálico era erguido através do orifício da tampa superior do cilindro até que o animal estivesse posicionado no mesmo nível da abertura lateral, o que permitia a filmagem dos movimentos do animal. Foram realizados 4 testes por dia durante quatro dias consecutivos, com a duração de 6 min cada. Os movimentos de contração de tronco para os lados do corpo foram quantificados como medida de atividade locomotora. O tempo (medido em segundos) que os camundongos permaneciam com as patas e tronco imóveis representou a medida de imobilidade.

Figura 12: Teste de Suspensão pela Cauda.



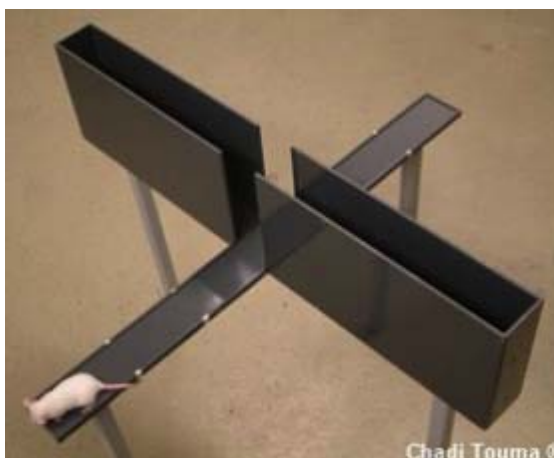
Légenda: À esquerda: esquema da aparelhagem. À direita: animal em movimento realizando uma contração.
Fonte: A autora, 2016.

3.3.5 Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM, Figura 13)

A resposta associada à memória foi analisada pelo teste LCE modificado (Biala, Kruk, 2008 e 2009; Bushnell, 1987). O labirinto em cruz elevado é construído em acrílico cinza e é constituído por 4 braços: 2 abertos (sem paredes - BA - medindo 28,5 cm × 5 cm) e 2 fechados (com paredes - BF - medindo 28,5 × cm 5 cm × 14 cm), dispostos perpendicularmente entre si (em forma de cruz) e elevados 50 cm acima do chão. O teste é baseado no fato de que roedores apresentam comportamento aversivo a ambientes aberto e altos e conta com um componente espacial. Esses animais preferem as áreas mais fechadas e protegidas do labirinto, e tendem a se lembrar da configuração dos braços abertos e fechados.

Os animais foram testados no LCEM em PN126, sendo inicialmente colocados na extremidade do braço aberto do equipamento, que, como mencionado, é um ambiente aversivo ao camundongo. Foi permitido que os animais explorassem o labirinto por 90 s ou até que eles encontrassem e se colocassem dentro do braço fechado, que corresponde a um ambiente menos aversivo para o camundongo. Caso o animal não encontrasse o braço fechado em 90 s, ele era cuidadosamente direcionado ao braço fechado e lhe permitido explorar o labirinto por mais 60 s. Nesse caso o tempo anotado foi de 90 s. No dia seguinte, em PN127, o animal foi reexposto (teste de retenção) ao equipamento e lhe permitido que explorasse o equipamento novamente por 90 s ou até que ele encontrasse o braço fechado e se posicionasse dentro dele. Os tempos (em segundos) para encontrar o braço fechado foram medidos no teste de treino e no de retenção, e o percentual de diminuição do tempo para completar a tarefa foi utilizado como índice de memória e aprendizado.

Figura 13: Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado. Note que o animal inicia o teste na extremidade do braço aberto.



Fonte: Fathima Institute of Pharmacy.

3.3.6 Observações

Após o término de cada um dos testes comportamentais, o equipamento de teste foi limpo com um pano umedecido com uma solução de etanol 50% para a eliminação das excretas e minimização de odores que pudessem interferir nos testes dos demais animais. Os testes foram realizados na fase clara do biotério, numa sala com proteção acústica. A câmera

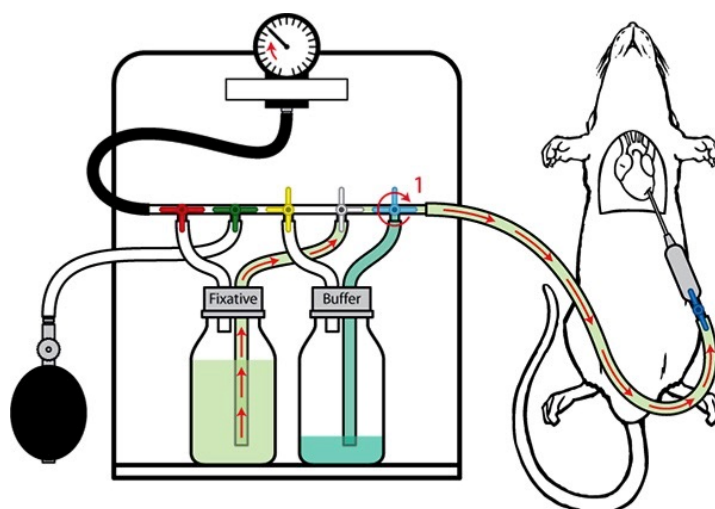
digital utilizada para gravar os testes realizados no Campo Aberto, no Reconhecimento de Objetos e na Suspensão pela Cauda foi posicionada a um metro dos equipamentos.

3.4 Histologia

3.4.1 Perfusão (Figura 14)

Para que a imunohistoquímica dos cérebros pudesse ser realizada, os animais foram perfundidos no mesmo horário no dia seguinte ao último teste comportamental, em PN128, entre 10 e 12 h. Para a perfusão, os camundongos foram previamente anestesiados com Avertin (70 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram perfundidos por via intracardíaca com: 1) solução salina 0,9%; seguido de 2) paraformaldeído 4%; terminando com 3) paraformaldeído mais sacarose a 10%. Após um período de pós-fixação mínimo de 24 h, os cérebros foram retirados dos crânios e armazenados.

Figura 14: Esquema do animal sendo perfundido para preservação do tecido.



Fonte: Retirado de Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. 2012.

3.4.2 Coloração

A análise histológica dos tecidos foi feita em colaboração com o Serviço de Anatomia Patológica da UERJ. Parte dos cérebros fixados foram cortados em micrótomo com espessura de 5 micrômetros e corados com hematoxilina & eosina e vermelho Congo para a detecção de depósitos de peptídeo A β . A análise histológica e aquisição das imagens foram feitas em microscópio Olympus CX31 conectado a um sistema de aquisição de imagem digital.

3.4.3 Imunohistoquímica

Parte dos cérebros retirados ao final da perfusão foram armazenados em solução de sacarose 20%. Processada a crioproteção, foi feita a inclusão em OCT (meio de inclusão de tecidos congelados) para a criotomia: o congelamento rápido do bloco foi obtido por imersão em nitrogênio líquido. Os cortes, com espessura de 30 μ m, em plano coronal, foram obtidos em criostato e montados em lâminas. As regiões de interesse foram coletadas segundo as coordenadas obtidas de um atlas estereotáxico (Franklin e Paxinos, 1997). As lâminas foram lavadas com PBS (Tampão fosfato-salino) 6 vezes, e com PBS + Triton 0,3%. Para a marcação da micrógliia, foi feita a reativação antigênica com tampão citrato pH 6.0 por 30 min em banho-maria a 60°C. Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS a 5% por 1 h em temperatura ambiente para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS-BSA 1% por 2 h em temperatura ambiente durante a noite a 4°C. Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS e então foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado diluído em PBS-BSA 1% por 2 h em temperatura ambiente e mantidas no escuro. Seguiu-se com lavagens com PBS e após, com água destilada. As lâminas foram montadas em meio de montagem Pro-long Gold Antifade, que já possui o marcador de núcleo DAPI (Molecular Probes, Invitrogen).

3.4.3.1 *Anticorpos*

Anticorpo primário:

- Anti-Iba1 (marcador de microglia) - policlonal de cabra (Abcam, 1:100).

Anticorpo secundário:

- Anti-IgG de coelho produzido em burro, conjugado com ALEXA FLUOR 555 (Molecular Probes, Invitrogen, 1:400).

3.4.3.2 *Análise e aquisição de imagens*

As seguintes regiões do hipocampo foram analisadas: DG (giro denteado) e CA1 (Corno de amon 1). Foram observados quatro cortes de 30 μm de cada animal (Grupos Hapes e A β n = 8). As imagens foram obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX40, acoplado a câmera de vídeo digital (Olympus DP71).

3.5 **Análise quantitativa**

3.5.1 Aspectos preliminares

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para uma amostra. As avaliações de normalidade foram feitas para cada grupo experimental separadamente. Todas as distribuições desse estudo foram paramétricas (valores de $P \geq 0,05$; bicaudal) e as análises posteriores foram realizadas considerando-se esta característica. Os dados serão apresentados como médias \pm erros padrão das médias.

3.5.2 Análise dos parâmetros comportamentais

A análise dos comportamentos apresentados na EP iniciou-se com uma ANOVA unifatorial (GRUPO) com medidas repetidas onde o fator de repetição foi o DIA (T0, T3 e T24) nas sessões 1 e 2. As seguintes variáveis foram analisadas: % de Latência do animal na plataforma em T0, T3 e T24 nas duas sessões experimentais (S1 e S2) e as diferenças entre S2T0-S1T0 e S2T0-S1T24. A análise dos comportamentos apresentados no RO iniciou-se com uma ANOVA unifatorial (GRUPO) com medidas repetidas onde o fator de repetição foi o DIA (Treino, T1 e T2). As variáveis analisadas foram: % de tempo de exploração do objeto novo em cada dia de teste e as diferenças dos percentuais de tempo entre Treino e T1 e entre Treino e T2. A análise dos comportamentos apresentados no LCEM iniciou-se com uma ANOVA unifatorial (GRUPO) com medidas repetidas onde o fator de repetição foi o DIA (Treino, Teste). As variáveis analisadas foram: % de tempo para entrar no braço fechado. A análise dos comportamentos apresentados no TS iniciou-se com uma ANOVA unifatorial (GRUPO) com medidas repetidas onde o fator de repetição foi o DIA (T1, T2, T3 e T4). As variáveis analisadas foram: o número de contrações e o tempo de imobilidade. A análise dos comportamentos apresentados no CA iniciou-se com uma ANOVA unifatorial (GRUPO). As variáveis analisadas foram: 1) Total de entradas (quadrados percorridos); 2) Total de entradas no centro; 3) % de entradas no centro; 4) % de entradas no centro; 5) % de tempo no centro. Os seguintes comportamentos de base etológica foram analisados: Total de autolimpezas, Total de alongamentos e Total de elevações.

3.5.3 Aspectos complementares

Para a realização das ANOVAs de repetição, inicialmente era testada a hipótese de que a matriz de covariância das variáveis dependentes eram similares entre grupos pelo teste de Box. Em seguida, testou-se a hipótese de que as variâncias de erro das variáveis dependentes eram similares entre grupos pelo teste de Levene. Finalmente, a hipótese de esfericidade era testada pelo teste de Mauchly. A esfericidade assume igualdade de variâncias para todos os pares das medidas realizadas com repetição. Cumpre ressaltar que o teste de Mauchly é altamente sensível às violações de normalidade (Keselman e Rogan, 1980). Na situação de

rejeição de esfericidade optou-se por corrigir o número de graus de liberdade da análise de variância através do parâmetro ϵ (Huynh, 1976). Os efeitos de fatores individuais foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (bicaudal). Para interações entre fatores, nos casos em que $P < 0,10$ (bicaudal), os fatores interativos foram separados e as ANOVAs repetidas para verificar se os efeitos eram mantidos (Snedecor e Cochran, 1967). Quando necessário, ANOVAs de menor ordem seguidas do teste LSD para comparações par-a-par foram utilizados post-hoc para as análises paramétricas.

4. RESULTADOS

4.1 Análise comportamental

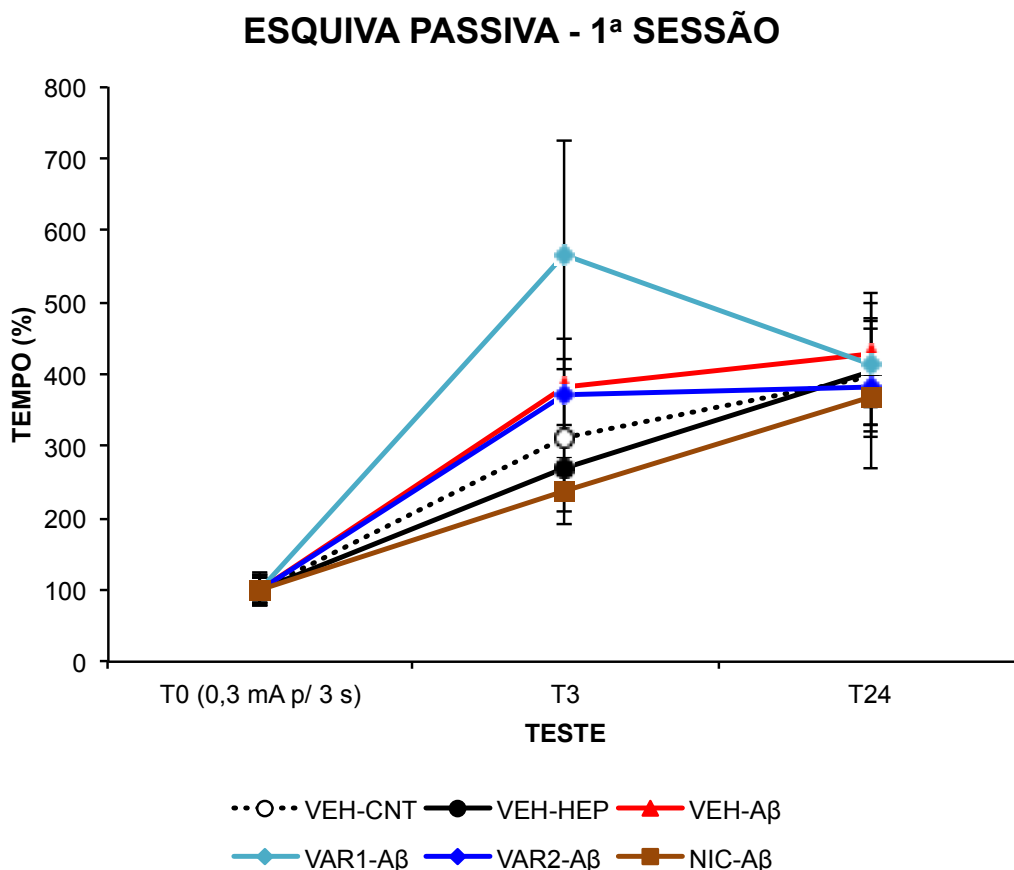
4.1.1 Esquiva Passiva (EP)

O desempenho cognitivo de aprendizado e memória foi avaliado pelo EP em duas sessões experimentais como descrito anteriormente. Na primeira sessão, ocorrida entre PN75 e PN76, o teste tinha por objetivo principal selecionar os animais que eram capazes de demonstrar que aprenderam a tarefa. Os animais com aumento de latência em deixar a plataforma entre T0 (teste com choque) e T3 (teste sem choque) ou entre T0 e T24 (teste sem choque) inferior a 30% foram excluídos do restante do experimento. Na figura 15 observamos o perfil de aprendizado e memória dos animais que foram selecionados. Note-se que, nesta figura, os resultados dos animais já são apresentados separados por grupos, embora em PN75-76 os animais ainda não houvessem sido submetidos a um dos tratamentos nem à cirurgia. A análise dos dados desta sessão também foi feita com os animais separados por grupos e teve o objetivo de demonstrar que não haviam diferenças de desempenho entre estes anteriores aos procedimentos experimentais que pudessem explicar os resultados obtidos posteriormente. De fato, não houve diferença significativa entre os grupos de animais selecionados no perfil de aprendizado e, como esperado, os animais aprenderam a tarefa (efeito de TESTE: $F = 61,9$; g.l. = 2; $P < 0,001$), apresentando aumento das latências de T0 para T3 (FPLSD: $P < 0,001$) e de T0 para T24 (FPLSD: $P < 0,001$).

Na segunda sessão experimental (PN118-119), quando os animais já haviam tido contato antes dos tratamentos e cirurgias, com o teste, foi possível observar que os animais continuaram a apresentar um aumento significativo nas latências entre testes (efeito de TESTE: $F = 29,6$; g.l. = 2; $P < 0,001$), sugestivo de um processo continuado de aprendizado. As comparações par a par indicaram diferenças entre todos os testes T0 e T3 (FPLSD: $P < 0,001$), T0 e T24 (FPLSD: $P < 0,001$) e entre T3 e T24 (FPLSD: $P = 0,015$) (Figura 16). Observe-se também que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, ou seja, os diferentes tratamentos e cirurgias não foram capazes de melhorar ou prejudicar o desempenho na tarefa.

Um dado interessante foi observado quando analisamos a diferença entre as latências dos testes entre a 1ª sessão de seleção (pré-tratamento e cirurgia), e a 2ª sessão de avaliação (pós-tratamento e cirurgia) (Figuras 17 e 18). A diferença observada entre o T0 da 2ª sessão e o T0 da 1ª sessão ($\Delta S2/T0-S1/T0$) indica que, mesmo após 40 dias e dois testes da 1ª sessão em que os choques não foram aplicados (T3 e T24), os animais apresentavam um aumento de latência na plataforma ($\text{mais } 68 \pm 7 \text{ s}$) (Efeito de TESTE: $F = 83,5$; g.l. = 1; $P < 0,001$). Embora menor ($\text{mais } 17 \pm 8 \text{ s}$), ainda foi observada diferença significativa entre as latências do T0 da 2ª sessão e do T24 da 1ª sessão (Efeito de TESTE: $F = 4,9$; g.l. = 1; $P = 0,03$). Cabe mencionar que não foram observadas diferenças entre grupos no padrão de resultados. Esse padrão de resultados sugere que os animais foram capazes de memorizar a tarefa quando esta foi realizada antes dos tratamentos e das cirurgias e que, mesmo após a realização destes procedimentos, eles foram capazes de reter a informação e evoca-la.

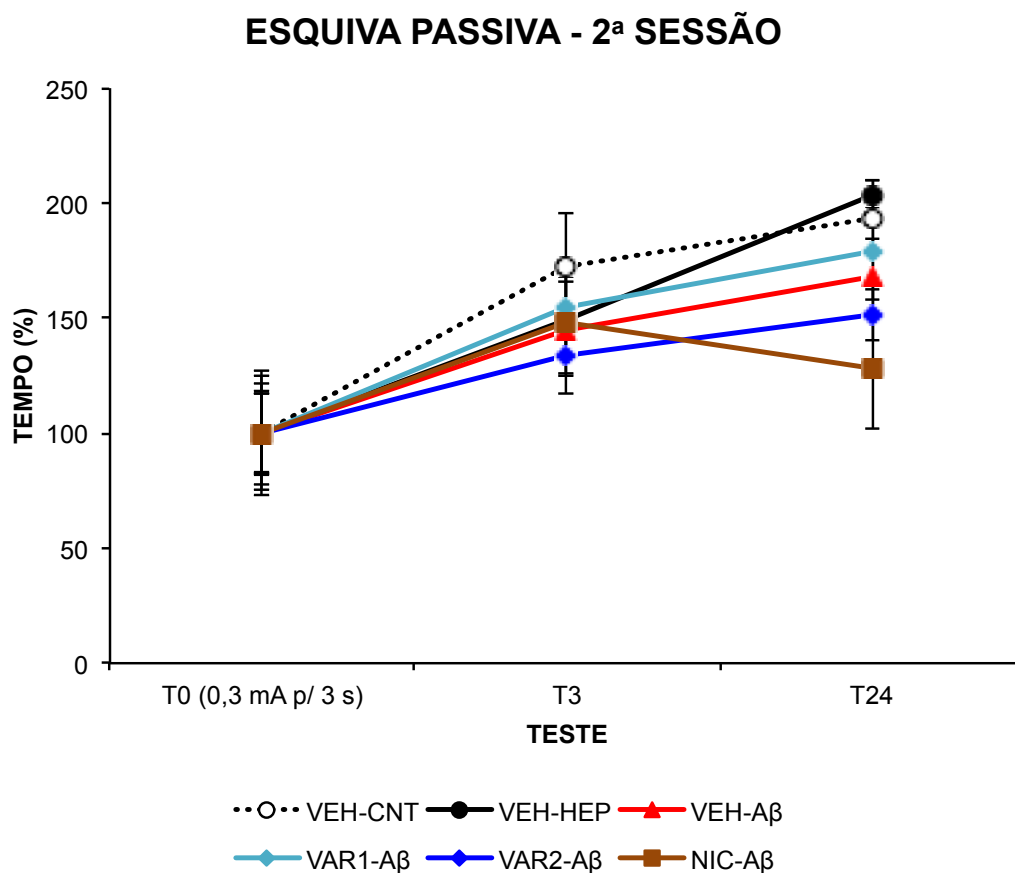
Figura 15: Teste de Esquiva Passiva – Primeira Sessão (Seleção em PN75-76).



Legenda: Dados de percentual de latência na plataforma de teste em T0 (choque 0,3 mA/3 s), T3 (3 h após o T0) e T24 (24 h após o T0) durante a 1ª sessão de testes no equipamento de Esquiva Passiva. A média de latência de cada grupo em T0 foi utilizada como referência para calcular os valores relativos de cada animal tanto em T0 como em T3 e T24. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

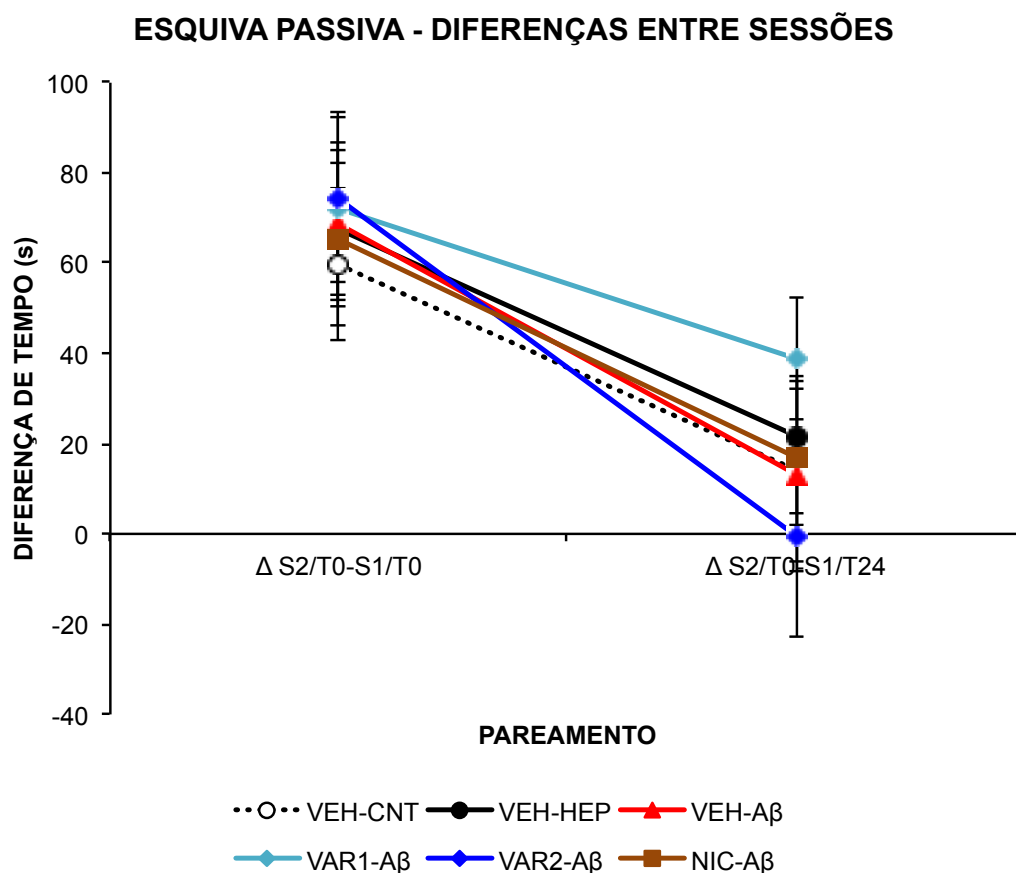
Figura 16: Teste de Esquiva Passiva – Segunda Sessão (PN118-119).



Legenda: Dados de percentual de latência na plataforma de teste em T0 (choque 0,3 mA/3 s), T3 (3 h após o T0) e T24 (24 h após o T0) durante a 2ª sessão de testes no equipamento de Esquiva Passiva. A média de latência de cada grupo em T0 foi utilizada como referência para calcular os valores relativos de cada animal tanto em T0 como em T3 e T24. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

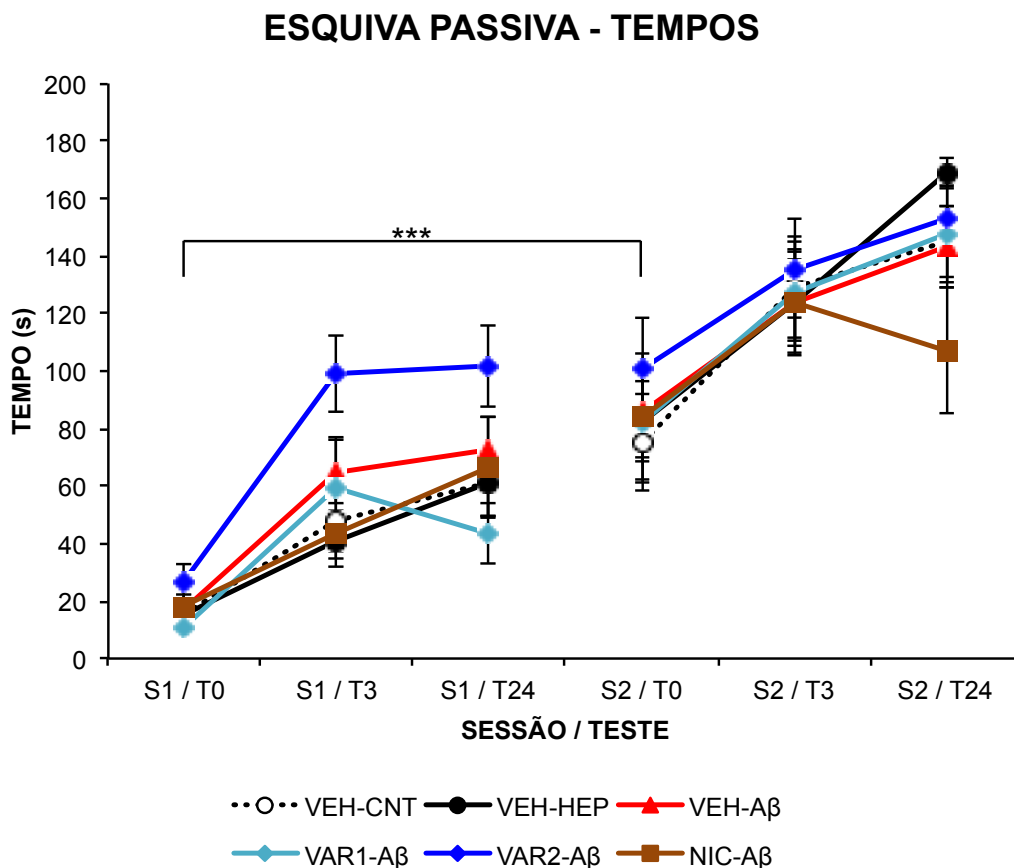
Figura 17: Teste de Esquiva Passiva – Diferença de tempos entre a 1ª e 2ª sessões.



Legenda: Dados de diferença de latência (em segundos) na plataforma entre os testes T0 da 2ª sessão e T0 da 1ª sessão T3 ($\Delta S2/T0-S1/T0$) e entre T0 da 2ª sessão e T24 da 1ª sessão ($\Delta S2/T0-S1/T24$). Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 18: Teste de Esquiva Passiva – Tempos (s) em cada teste das duas sessões.



Legenda: Dados de latência (em segundos) na plataforma de teste em T0 (choque de 0,3 mA/3 s), T3 (3 h após o T0) e T24 (24 h após o T0) na 1a (S1) e na 2a (S2) sessões de testes na Esquiva Passiva. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M. *** = $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.2 Campo Aberto (CA)

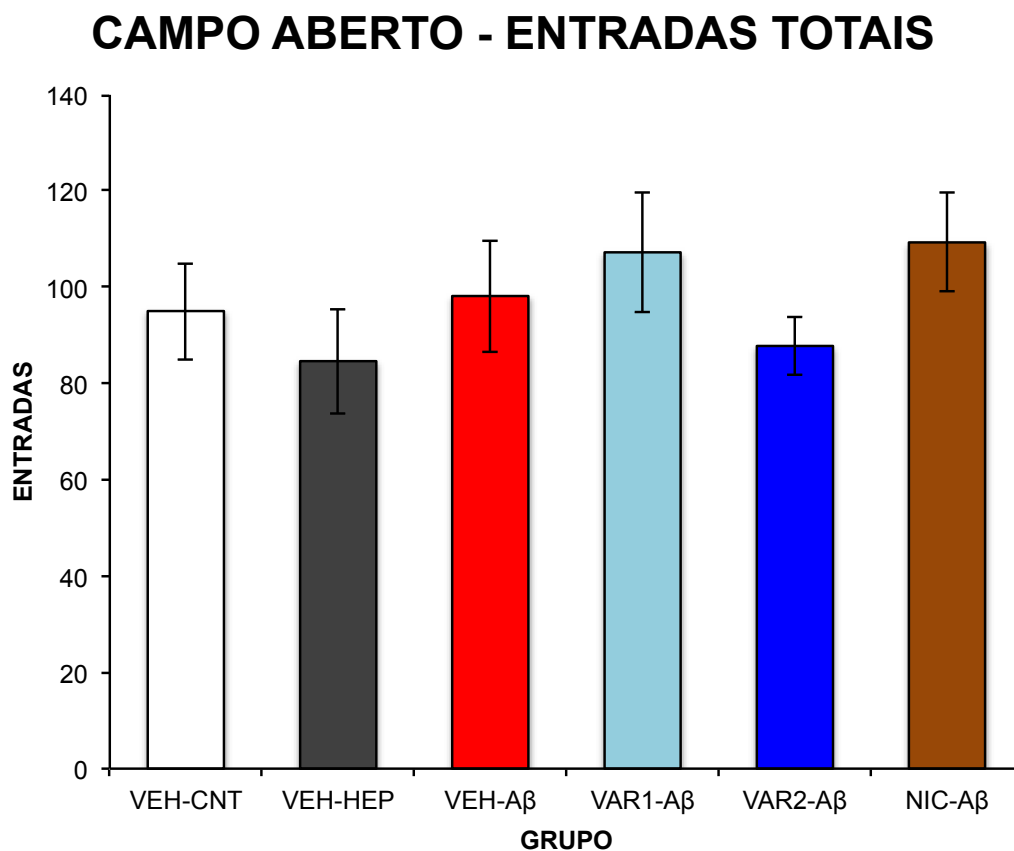
No CA foi possível avaliar: 1) a atividade locomotora, através da variável entradas, que corresponde ao número de quadrados percorridos pelo animal; 2) o nível de comportamentos associados à ansiedade, através das variáveis de percentual de atividade e percentual de tempo no centro da arena; 3) a atividade motora vertical, através do número de elevações; 4) a atividade de tomada de decisão através do número de autolimpezas; 5) a atividade de avaliação de risco através do número de alongamentos.

Foi observado que, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais na ambulação total nem no número de elevações, ou seja, os animais do grupo CNT-AB não sofreram alteração na sua locomoção, e os diferentes tratamentos também não promoveram nenhum efeito na atividade locomotora desses animais (Figura 19).

Em relação à componente ansiedade, na avaliação da variável percentual de entradas no centro, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 20B). Os animais VEH-A β , de uma maneira geral, não percorreram uma quantidade diferente de quadrados no centro do equipamento de teste quando comparados aos animais dos demais grupos. No entanto, ao avaliar a variável percentual de tempo no centro (Figura 20A), foi possível observar que os procedimentos experimentais adotados afetaram o desempenho (efeito do GRUPO: $F = 2,5$; g.l. = 5; $P = 0,041$): animais A β tratados com veículo (VEH-A β), vareniclina em dose baixa (VAR1-A β) ou nicotina (NIC-A β) passaram menos tempo no centro do campo aberto dos que os animais A β tratados com a dose alta de vareniclina (VAR2-A β). Além disso, observou-se que os animais NIC-A β também passaram menos tempo no centro do que os animais tratados com veículo e submetidos à cirurgia controle (VEH-HEP).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no que diz respeito aos comportamentos (etológicos) de elevações, autolimpezas e alongamentos, ou seja, os tratamentos ou as cirurgias não promoveram alterações associadas a um desses comportamentos nesses animais (Figura 21).

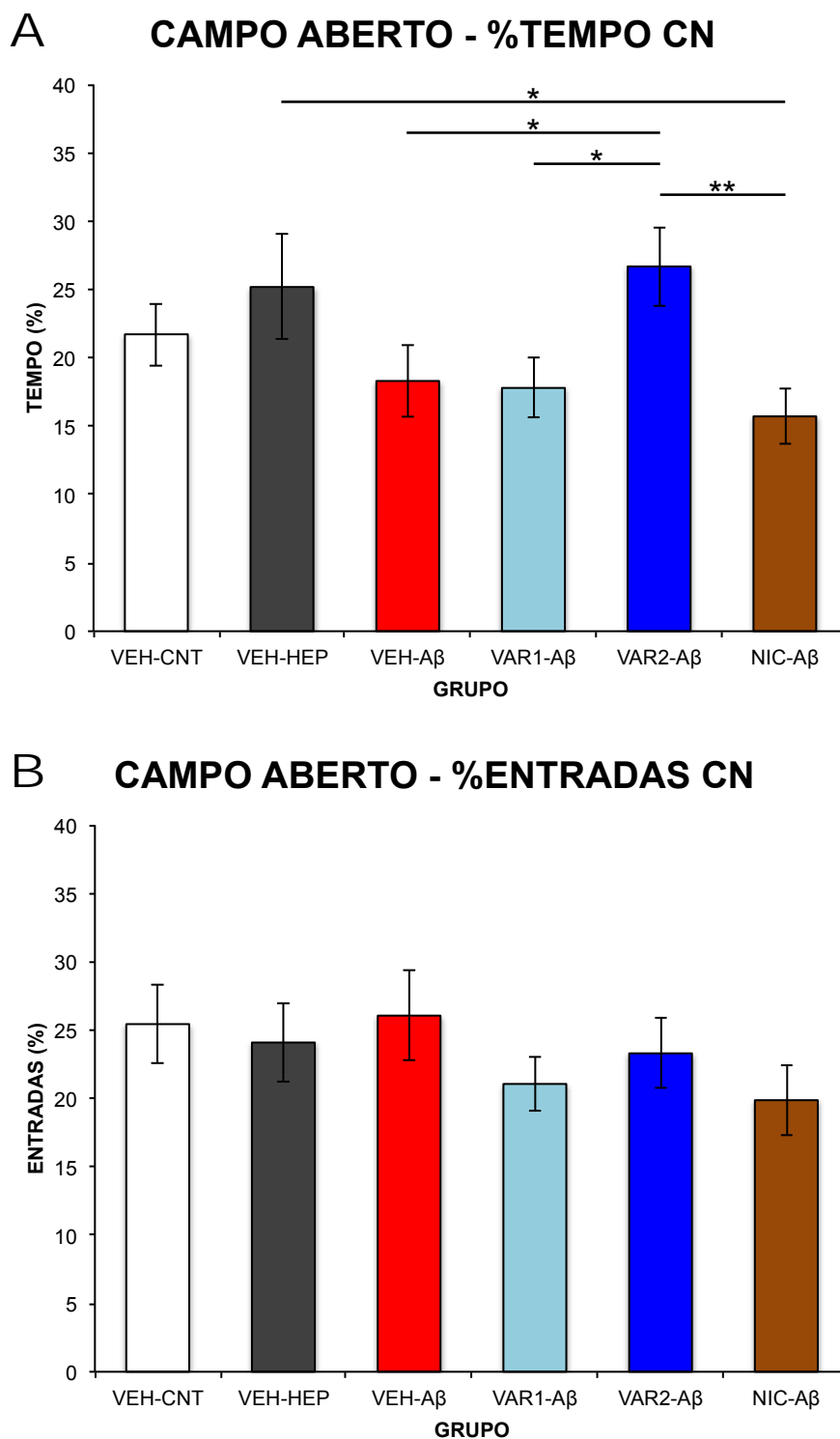
Figura 19: Teste do Campo Aberto – Número de entradas totais



Legenda: Dados de número de entradas totais no teste de Campo Aberto por grupo experimental. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

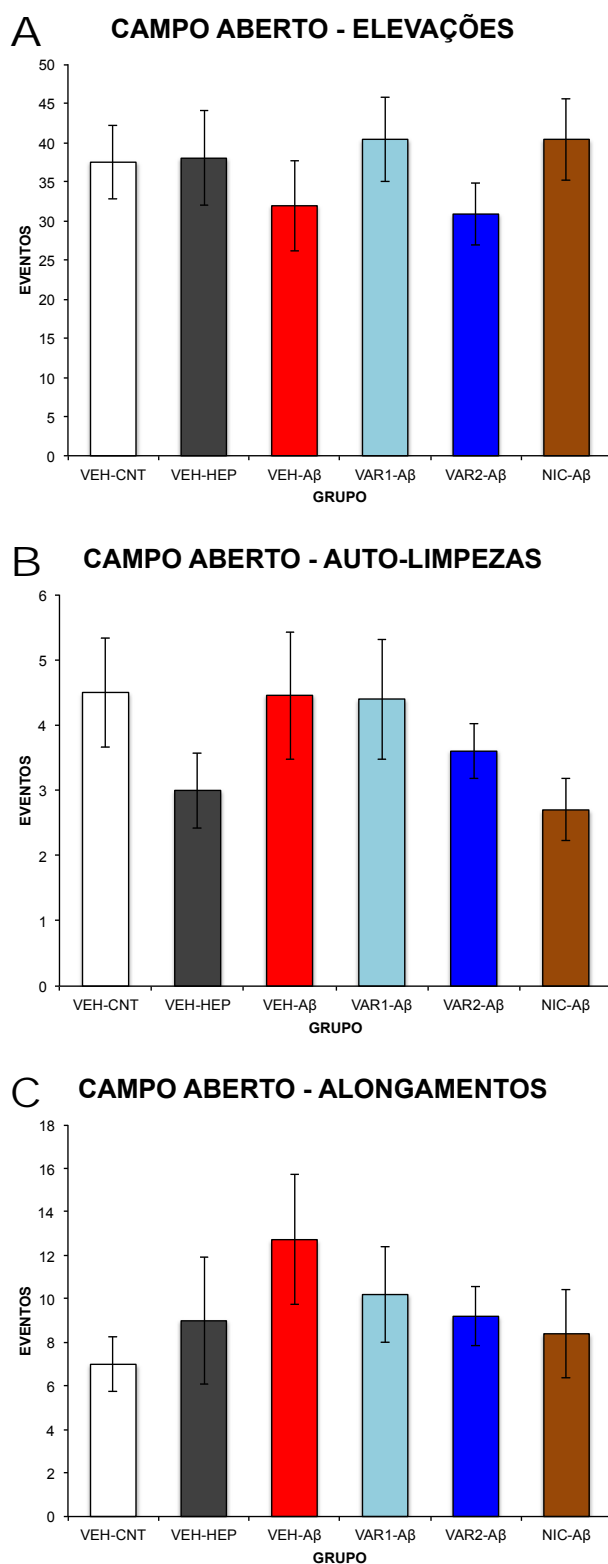
Figura 20: Teste de Campo Aberto – Percentual de tempo e de entradas no centro.



Legenda: Dados de percentual de tempo (A) de entradas (B) no centro do teste de Campo Aberto por grupo experimental. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 21: Teste de Campo Aberto – Dados etológicos: elevações, autolimpezas e alongamentos.



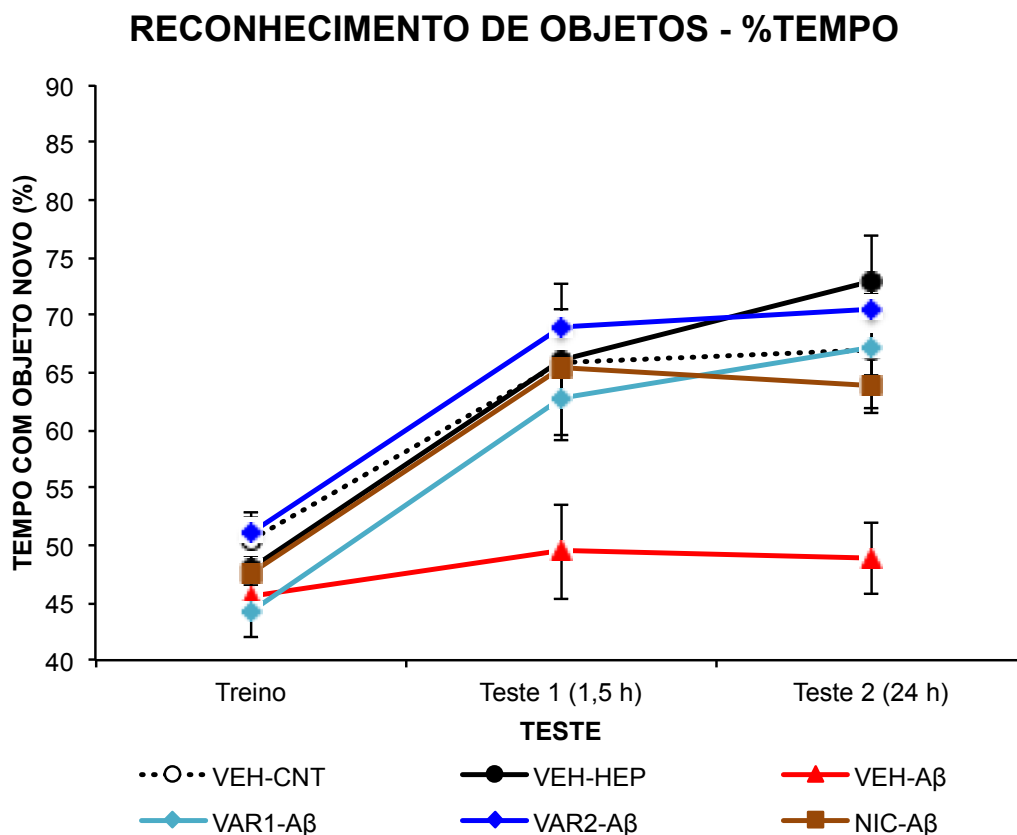
Legenda: Dados etológicos de elevações (A), autolimpezas (B) e alongamentos (C) no teste de Campo Aberto por grupo experimental. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.3 Reconhecimento de Objetos (RO)

O desempenho de memória e aprendizado foi avaliado através da análise do tempo de exploração de objetos familiares e de objetos novos no RO, com um teste de treino e dois testes de avaliação (um 1,5 h e outro 24 h após o treino). Roedores, ao identificarem objetos familiares e novos em seu ambiente, aumentam o tempo de exploração dos novos. Logo, o percentual de tempo com o objeto novo foi avaliado como medida de aprendizado e memória. Nossos resultados demonstraram que, de forma geral, o percentual de tempo explorando os objetos novos era maior (efeito do TESTE: $F = 290$; g.l. = 2; $P < 0,001$). Porém, o padrão de resultados ao longo dos testes foi claramente afetado pelos grupos experimentais (interação GRUPO \times TESTE: $F = 8,1$; g.l. = 10; $P < 0,001$). Todos os grupos, exceto o VEH-A β , apresentaram um aumento no tempo de exploração dos objetos novos entre o teste de treino e os dois de avaliação (Figuras 22 e 23). No Teste 1, que ocorreu 1,5 horas após o treino (no qual havia um objeto novo), foi possível observar que todos os grupos experimentais apresentaram percentual de tempo de exploração do objeto novo aumentados ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo VEH-A β , caracterizando uma deficiência no desempenho de memória de curto prazo neste grupo. No Teste 2 (24 horas após o treino), os animais do grupo VEH-A β continuaram apresentando um percentual de tempo com o objeto novo (diferente do objeto novo do Teste 1) reduzido em relação aos demais grupos ($P < 0,001$), caracterizando uma deficiência de memória de longo prazo. Ou seja, os grupos controles (VEH-CNT e VEH-HEP), a curto e a longo prazo, reconhecem os objetos familiares e exploram mais os objetos novos. Entre os animais em que se infundiu o A β , os que receberam tratamento controle (VEH-A β) tem sua memória prejudicada, explorando os objetos familiares praticamente tanto quanto os novos no Teste 1 e no Teste 2. Em contrapartida, os animais que sofreram a cirurgia com infusão de peptídeo A β e que foram tratados antes e depois da cirurgia (VAR1-A β , VAR2-A β e NIC-A β) tiveram suas memórias de curto e longo prazo preservadas, uma vez que apresentaram significativo aumento no percentual de tempo com o objeto novo quando comparados ao grupo VEH-A β e ausência de diferenças quando comparados aos dois grupos controle (VEH-CNT e VEH-HEP). Portanto, a avaliação feita no teste de RO mostrou que a infusão de peptídeo A β prejudica as memórias de curto e longo prazo, mas que os tratamentos com VAR1, VAR2 e NIC previnem esse prejuízo.

Figura 22: Teste de Reconhecimento de Objetos – Percentual de tempo de exploração do objeto novo.

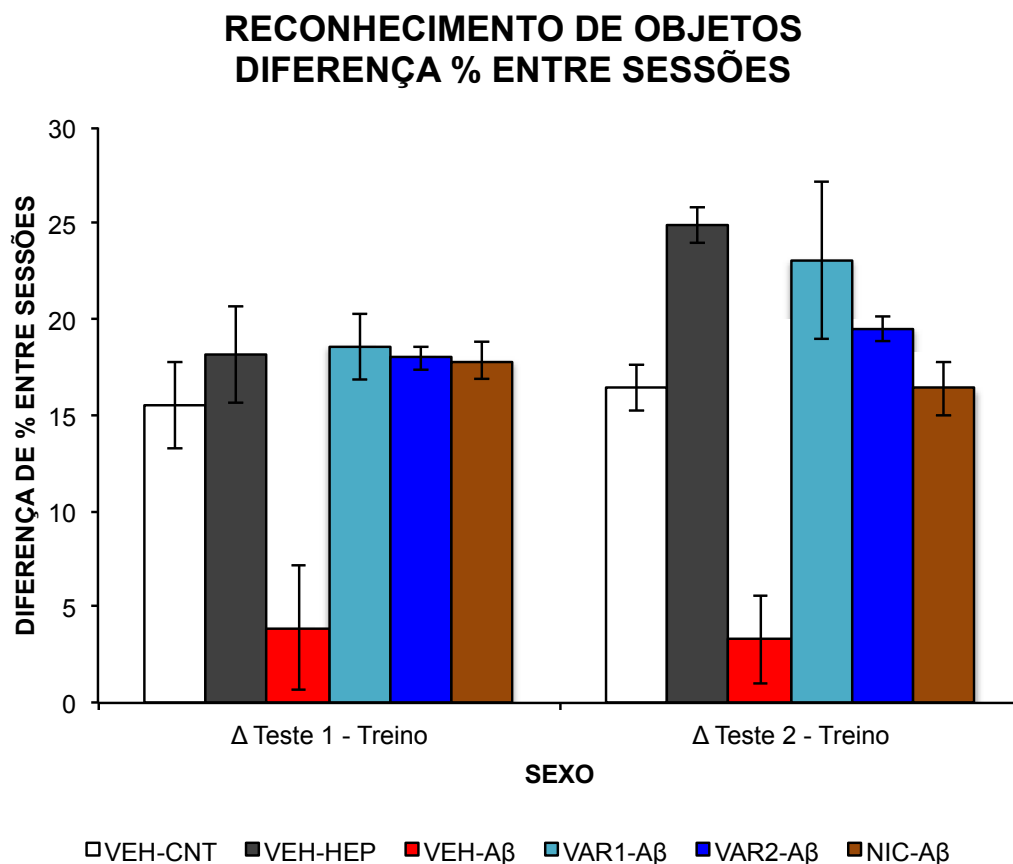


GRUPO	Pares de comparação		
	Treino vs. Teste 1	Treino vs. Teste 2	Teste 1 vs. Teste 2
VEH-CNT	★★★	★★★	=
VEH-HEP	★★★	★★★	=
VEH-Aβ	=	=	=
VAR1-Aβ	★★★	★★★	=
VAR2-Aβ	★★★	★★★	★★
NIC-Aβ	★★★	★★★	=

Legenda: Dados de tempos com o objeto novo no Treino (objetos iguais), no Teste 1 (1,5 h após o treino) e Teste 2 (24 h após o treino) no teste de Reconhecimento de Objetos. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M.★★ = P < 0,01; ★★★ = P < 0,001; para = não há diferença significativa.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 23: Teste de Reconhecimento de Objetos – Percentual de tempo entre as sessões.



Comparações par a par

	NIC-Aβ	VAR2-Aβ	VAR1-Aβ	VEH-Aβ	VEH-HEP
VEH-CNT	=	=	★	★★★	★★
VEH-HEP	★★	★	=	★★★	
VEH-Aβ	★★★	★★★	★★★		
VAR1-Aβ	★	=			
VAR2-Aβ	=				

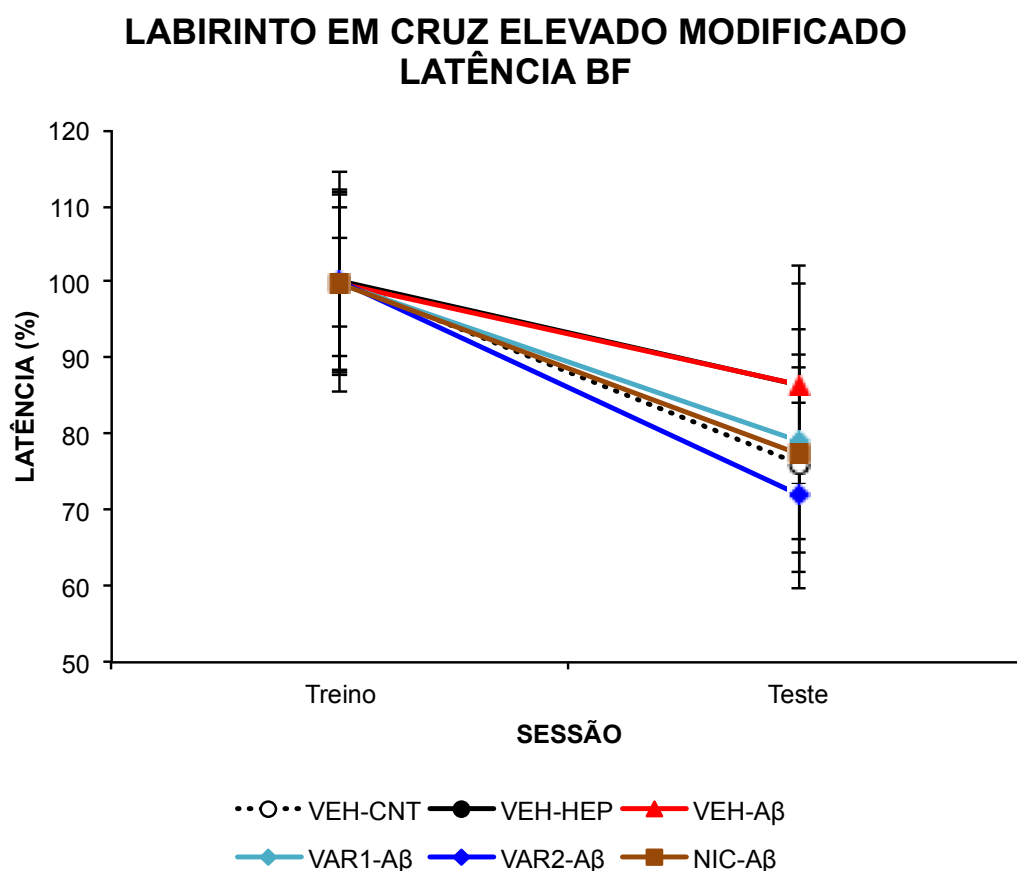
Legenda: Dados de diferença do % de tempo com o objeto novo entre testes no Reconhecimento de Objetos.: ΔT1-Treino (Diferença do % de tempo entre o Treino e o Teste 1) e ΔT2-Treino (Diferença do % de tempo entre o Treino e o Teste 2). Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = varenciclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; Aβ = implantado com minibomba contendo peptídeo β-amilóide. Valores são média ± E.P.M. ★ = P < 0,05; ★★ = P < 0,01; ★★★ = P < 0,001; para = não há diferença significativa.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.4 Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM)

Na avaliação da memória no LCEM foi possível observar que houve uma diminuição (Efeito do DIA: $F = 14,5$; g.l. = 1; $P < 0,001$) da latência no teste (2º dia no equipamento) quando comparado a observada no treino (Figura 24). Esse padrão de resultados indica que os animais: 1) percebiam o caráter aversivo do braço aberto, 2) verificavam que era possível o deslocamento para o braço fechado através da exploração do labirinto, 3) eram capazes de aprender a tarefa e apresentar uma redução significativa no tempo de entrada no braço fechado quando da reexposição ao equipamento. Cabe frisar que, devido a ausência de efeito do GRUPO ou de interação GRUPO \times DIA, a redução no tempo de deslocamento para o braço fechado não foi afetada pelos diferentes procedimentos a que os animais foram submetidos.

Figura 24: Teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado – Percentual de latência para entrada no braço fechado.



Legenda: Dados de % de latência para entrada no braço fechado no treino e no teste (24 h após o treino) no Labirinto em Cruz Elevado Modificado. A média de latência de cada grupo no treino foi utilizada como referência para calcular os valores relativos de cada animal tanto no treino como no teste. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.5 Teste de Suspensão pela Cauda (TS)

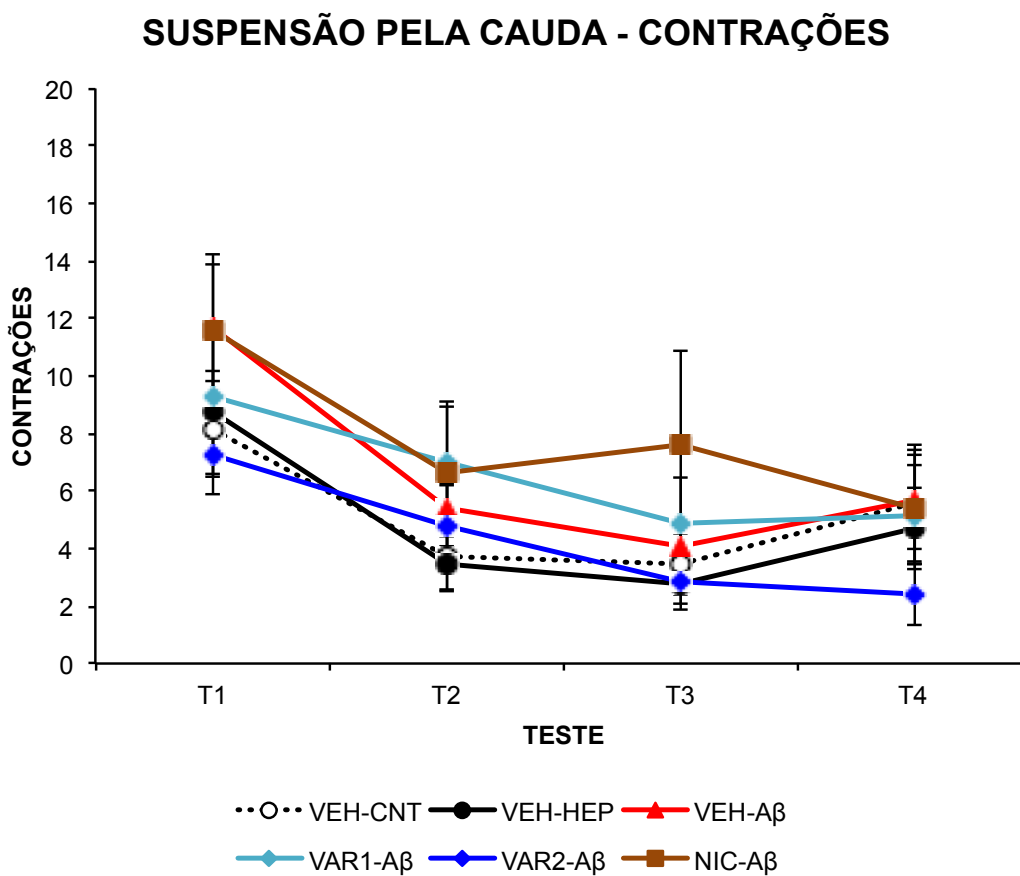
Na avaliação do comportamento motor no TS, foi possível observar que houve um declínio significativo no número total de contrações ao longo dos quatro dias de teste (Efeito do DIA: $F = 15,5$; $g.l. = 3$; $P < 0,001$) (Figura 25). A análise *post hoc* indicou que o 1º dia de teste apresentou valores maiores de contrações (média em: $T1 = 9,3 \pm 0,8$) do que os outros 3 dias subsequentes ($T2 = 5,1 \pm 0,6$; $T3 = 4,2 \pm 0,6$; $T4 = 4,8 \pm 0,7$) ($P < 0,05$ em todas as comparações par a par), não havendo diferenças significativas entre estes últimos. Devido a

ausência de efeito do GRUPO ou de interação GRUPO \times DIA, a redução o número de contrações não foi afetado pelos diferentes procedimentos a que os animais foram submetidos.

Na avaliação do comportamento associado à depressão, o tempo de imobilidade no 1º dia de teste no TS não foi afetado pelos tratamentos ou pelas cirurgias realizadas com os animais (Efeito do GRUPO: $F = 0,8$; g.l. = 5; $P > 0,1$) (Figura 26).

Quanto aos comportamentos associados à habituação no TS, foi possível observar que houve um aumento significativo no tempo de imobilidade do animal ao longo dos quatro dias de teste ($F = 25,6$; g.l. = 3; $P < 0,001$) (Figura 26). A análise *post hoc* indicou que o 1º dia de teste apresentou os menores valores enquanto que o 4º dia apresentou os maiores (médias em segundos: $T1 = 112,7 \pm 5,4$; $T2 = 138,8 \pm 7,0$; $T3 = 159,0 \pm 5,7$; $T4 = 165,9 \pm 5,8$), sendo que somente não foi observada diferença significativa entre os tempos do 3º e 4º dias ($P < 0,05$ nas comparações par a par significativas). Mais uma vez, devido a ausência de efeito do GRUPO ou de interação GRUPO \times DIA, o aumento no tempo de imobilidade não foi afetado pelos diferentes procedimentos experimentais a que os animais foram submetidos.

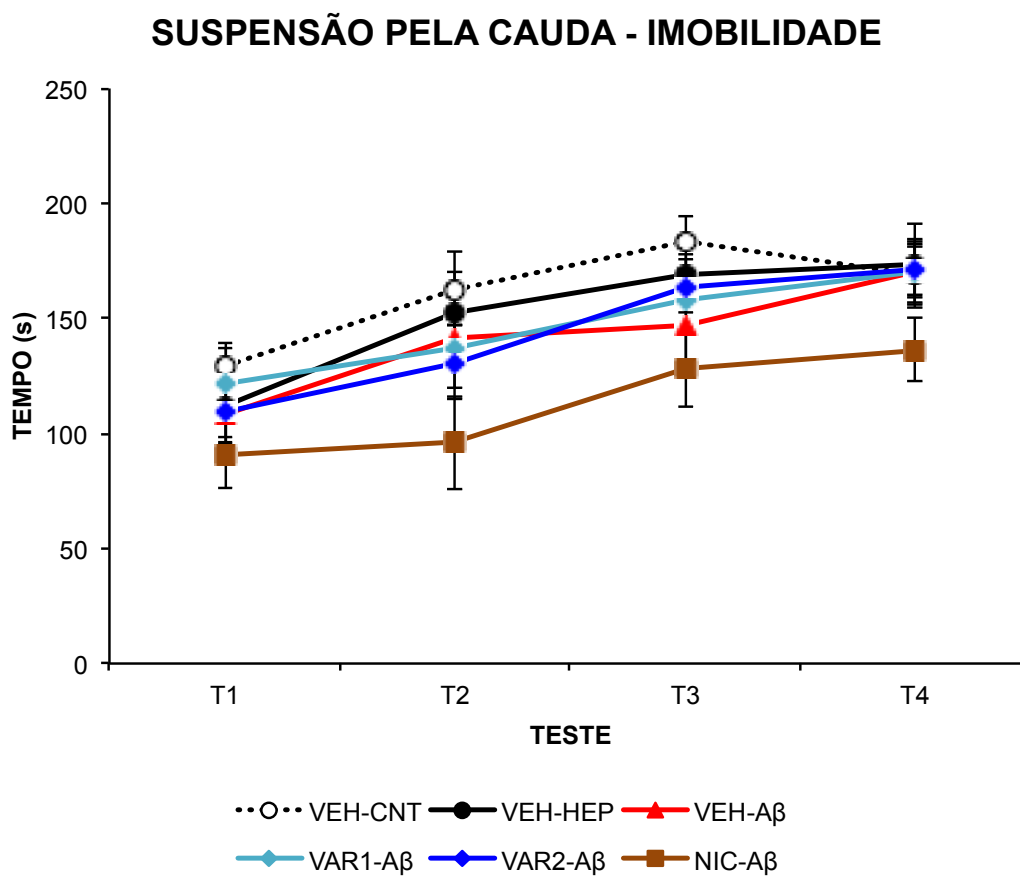
Figura 25: Teste de Suspensão pela Cauda – Número de contrações.



Legenda: Dados do número de contrações nos testes T1, T2, T3 e T4) por grupo experimental no teste de Suspensão pela Cauda. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = vareniclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 26: Teste de Suspensão pela Cauda – Tempo de imobilidade.



Legenda: Dados de tempo de imobilidade (em segundos) nos testes T1, T2, T3 e T4 por grupo experimental no teste de Suspensão pela Cauda. Tratamentos: VEH = veículo (salina); VAR1 = varenciclina 0,5 mg/kg/dia v.o.; VAR2 = 2 mg/kg/dia v.o.; NIC = Nicotina free base 5 mg/kg/dia v.o. Cirurgias: CNT = controle não-operado; HEP = implantado com minibomba contendo HEPES; A β = implantado com minibomba contendo peptídeo β -amilóide. Valores são média \pm E.P.M.

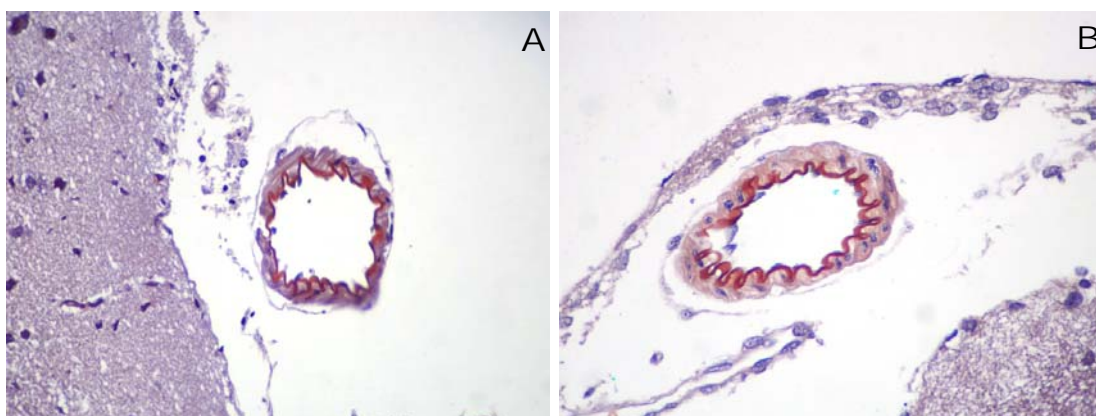
Fonte: A autora, 2016.

4.2 Análise histológica

4.2.1 Coloração

Observamos, nos cortes histológicos corados com vermelho congo, depósitos de peptídeo A β na parede de artérias leptomeníngicas nos animais do grupo VEH-A β , caracterizando uma angiopatia amilóide (Figura 27). Além disso, identificamos a presença de infiltrado inflamatório linfocítico perivascular na região do córtex (Figura 28).

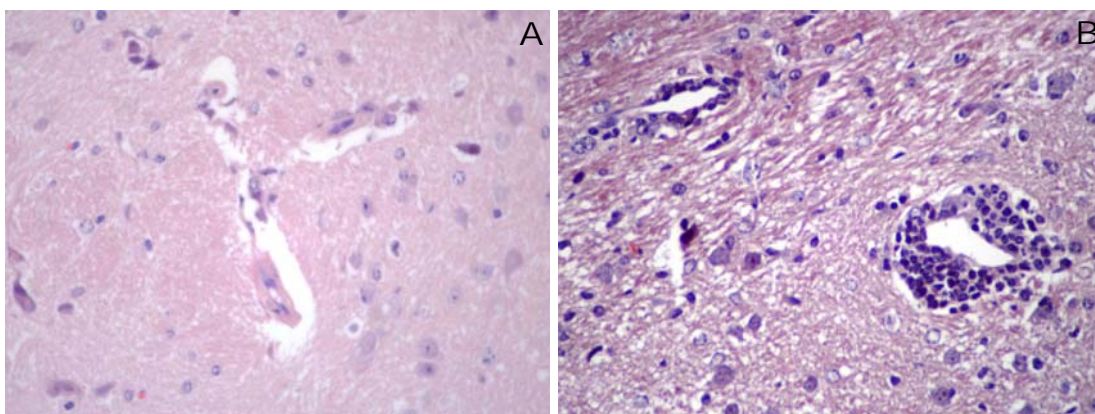
Figura 27: Fotomicrografia do tecido cerebral – Vermelho Congo (40 \times).



Legenda: (A) VEH-HEP – parede do vaso apresenta túnica média normal (cor arroxeadada). B) VEH-A β – parede do vaso apresenta túnica média com deposição amilóide (cor alaranjada).

Fonte: A autora, 2016.

Figura 28: Fotomicrografia do tecido cerebral – Hematoxilina e Eosina (40×).



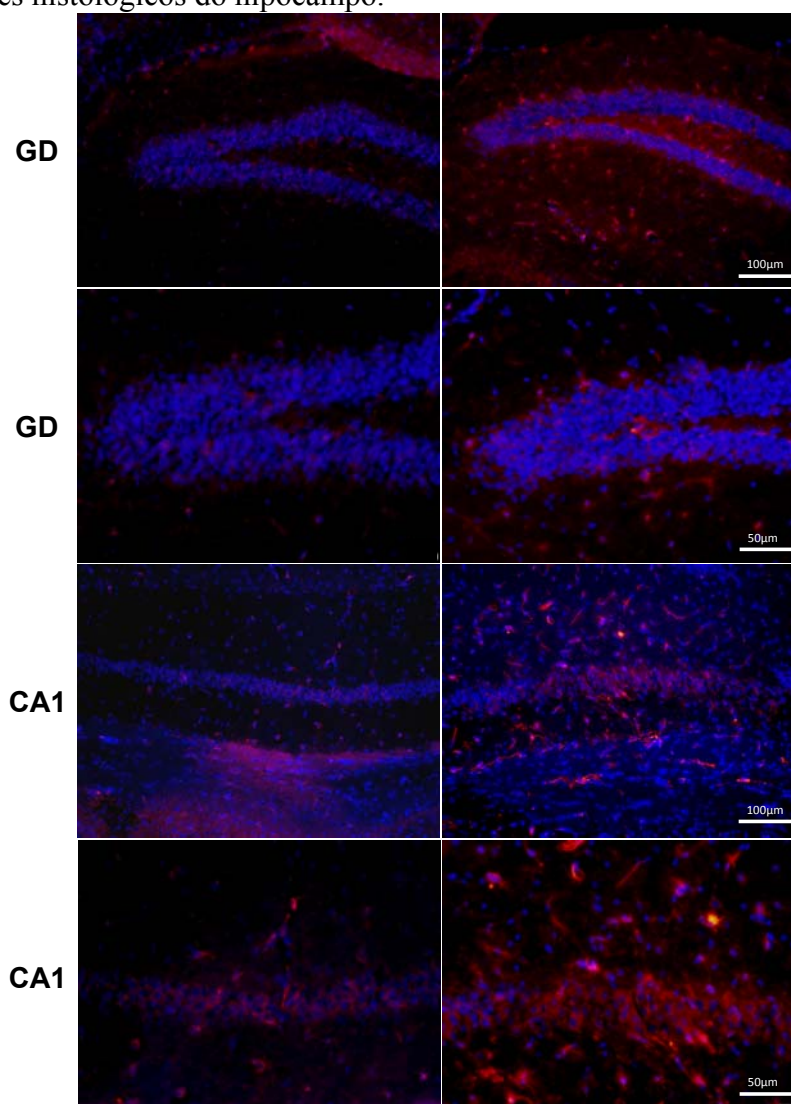
Legenda: (A) VEH-HEP – ausência de características inflamatórias. (B) VEH-A β – presença de infiltrado inflamatório linfocítico perivascular.

Fonte: A autora, 2016.

4.2.2 Imunohistoquímica

Observamos nas regiões do giro denteado (GD) e CA1 que no grupo CONT-HEP, a micróglia possui morfologia mais ramificada, com processos mais finos, enquanto que no grupo CONT-A β verificamos uma marcação mais intensa e a micróglia apresenta uma morfologia mais arredondada, característica de micróglia ativada.

Figura 29: Marcação imunohistoquímica com fluorescência das células da micróglia em cortes histológicos do hipocampo.



Legenda: Dados qualitativos da micróglia hipocampal imunomarcada por Iba-1 no GD e região do CA1. Imunohistoquímica para Iba-1 (em vermelho) e contracoloração para DAPI (em azul). Coluna esquerda: Grupo VEH-HEP. Coluna direita: Grupo VEH-A β . Observar que no grupo VEH-HEP, a micróglia possui morfologia mais ramificada, com processos mais finos, enquanto que no grupo VEH-A β verificamos uma marcação mais intensa e a micróglia apresenta uma morfologia mais arredondada, característica de micróglia ativada.

Fonte: A autora, 2016.

5. DISCUSSÃO

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva considerada como a principal causa de demência na população idosa e que acomete aproximadamente 26,6 milhões de pessoas em todo mundo (Lautenschlager et al., 2012). É uma doença que provoca perda gradual da memória, das funções executivas e da estabilidade emocional (Ballard et al., 2011). Os muitos avanços observados ao longo do último século na medicina vêm fazendo com que haja um aumento contínuo na expectativa de vida, o que pode gerar forte demanda sobre o sistema de saúde dos países devido ao aumento da incidência de diversas doenças, muitas crônicas, que acompanham o envelhecimento. Especificamente, estudos mostram que o risco de desenvolver a doença de Alzheimer aumenta consideravelmente com o avanço da idade (Larson, 2008). Especula-se que, em 2050, a doença atingirá 106,8 milhões de pessoas em todo o mundo (Lautenschlager et al., 2012).

As alterações morfológicas nos cérebros de pacientes com DA são bem características da doença e consequentes de uma gama de eventos patológicos relacionados. Dentre elas temos a presença das placas amilóides, que são fibrilas formadas a partir do acúmulo do peptídeo β -amilóide, e os emaranhados neurofibrilares, que resultam da hiperfosforilação anormal da proteína Tau (Nelson et al., 2009). A partir desses eventos ocorre uma extensa perda neuronal e sináptica, e a ativação de processos inflamatórios. Além disso, o sistema colinérgico é um dos principais sistemas neuroquímicos que são prejudicados na DA. O importante papel desse sistema nos processos de cognição, memória e aprendizagem é bem conhecido e pode explicar o prejuízo cognitivo que os pacientes com doença de Alzheimer apresentam. Portanto, o sistema colinérgico tem sido reconhecido como um dos principais alvos nas intervenções terapêuticas com o intuito de tentar restaurar o déficit colinérgico presente na doença. Diante dos efeitos neuroprotetores da nicotina e da sua relação com os receptores nicotínicos e destes com o peptídeo β -amilóide, anteriormente descritos nessa tese, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento com vareniclina, como agonista parcial dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ e total dos nAChRs $\alpha 7$, em um modelo experimental de neurodegeneração que mimetiza algumas características moleculares e comportamentais da doença de Alzheimer.

O receptor $\alpha 7$ vem sendo associado à atividade hipocampal (Mielke & Mealing, 2009), reconsolidação de memória (Boccia et al., 2010) e atenção sustentada (Hoyle et al., 2006; Rezvani et al., 2009; Young et al., 2007). Portanto, o objetivo foi observar os efeitos de um agonista total desses receptores sobre a memória de camundongos submetidos a um modelo

de degeneração com infusão de peptídeo β -amilóide no ventrículo lateral (Frautschy et al., 1998), em testes de avaliação de memória tais como os de esQUIVA passiva, de reconhecimento de objetos e o labirinto em cruz elevado modificado. Além disso, avaliamos a atividade locomotora, os comportamentos tipo-depressivos e os associados à ansiedade nos testes de campo aberto e de suspensão pela cauda.

Já foi demonstrado que, no nosso modelo experimental, os cérebros isolados dos animais que receberam a infusão com peptídeo β -amilóide apresentam uma evidente neurodegeneração (Iores-Marças et al., 2006) caracterizada pela perda de corpos neuronais nas áreas corticais e hipocámpais, as mesmas onde ocorreu o depósito de $A\beta$. Essas áreas estão profundamente envolvidas com os processos cognitivos. O córtex cerebral está diretamente envolvido com a consolidação do aprendizado e memória e controle motor (Armstrong et al., 1983; Fibiger, 1982). A administração central do peptídeo sintético $A\beta$ 1-40 em animais de laboratório vem mostrando ser um modelo bastante útil para o estudo da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta$ e intervenções neuroprotetoras (Takeda et al., 2009). Foi demonstrado que este modelo pode mimetizar vários sinais da DA, com resultados similares aos encontrados em camundongos transgênicos para DA (Prediger et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) de peptídeo $A\beta$ 1-40 pode mimetizar alguns sinais da DA em roedores, induzindo estresse oxidativo, neuroinflamação e prejuízos cognitivos (Prediger et al., 2007; Passos et al., 2010; Piermartini et al., 2010; Santos et al., 2012).

5.1 EsQUIVA Passiva

O desempenho no teste de esQUIVA passiva foi inicialmente utilizado como critério de seleção dos animais. De acordo com trabalhos de outros grupos, nem todos os animais submetidos ao teste, antes de qualquer intervenção farmacológica, são capazes de aprender a tarefa (Amaral et al., 2010; Viel et al., 2008, 2012). Assim, para uma mais eficiente avaliação da memória pós-tratamento, os animais foram selecionados conforme sua capacidade de aprender e memorizar a tarefa avaliada pelo EP. Os animais que apresentassem um aumento na latência acima de 30% foram considerados aptos para o experimento. Como mencionado anteriormente, aproximadamente 37% dos animais foram excluídos do protocolo experimental neste ponto.

Após o tratamento e a cirurgia, na segunda sessão de testes no EP em PN118, os animais demonstraram uma manutenção da memória, independentemente da infusão do A β ou não, ou do tratamento recebido. No que diz respeito aos déficits de memória comuns na DA, verifica-se, já nas fases iniciais da doença, o comprometimento da memória episódica de longo prazo e da memória de curto prazo, estando a intensidade de tais déficits relacionados à gravidade do quadro (Abreu et al., 2005). Na perspectiva de Conway (2005), os aspectos diferenciadores entre a memória autobiográfica e a memória episódica são a autorreferência, a interpretação subjetiva do acontecimento recordado e a verificabilidade. Já na perspectiva de Thompson e colaboradores (1996) a determinação acerca dos eventos a serem recordados pelos sujeitos enquanto ocorrência autobiográfica é influenciada pela avaliação emocional dos mesmos. Nesse sentido, identifica-se a primazia na evocação dos acontecimentos avaliados como extremos. Embora toda experiência seja constituída de eventos, apenas alguns fragmentos da experiência são lembrados pelo sujeito como ocorrências únicas, contextualizadas no tempo e espaço (Tulving, 1983). Entre esses eventos específicos, alguns são julgados pelo sujeito como mais importantes que outros. Do ponto de vista adaptativo, alguns autores afirmam que, lembrar-se de eventos altamente emocionais, positivos ou negativos, pode ajudar-nos a prevenir situações ruins e a tomar a direção certa (Damásio, 2003; McGauch, 2003). No presente trabalho demonstramos que os animais apresentaram a capacidade de evocar um tipo de memória que poderia ser comparada a autobiográfica, uma vez que o aprendizado associado ao insulto recebido (choque) ocorreu antes que se instalasse o quadro neurodegenerativo. Além disso, observamos que os animais na segunda sessão de teste continuaram apresentando um aumento da latência na plataforma, sugerindo um possível reforço no aprendizado e dando suporte a ideia de que memórias formadas a partir de estímulos intensos podem estar preservadas mesmo em modelos experimentais de DA, dependendo do grau de evolução da degeneração.

5.2 Campo Aberto

A doença de Alzheimer é uma doença cerebral irreversível, progressiva, que lentamente destrói além da memória e habilidades de pensamento, a capacidade de realizar as tarefas mais simples. Nas fases mais avançadas da doença há tendência de prejuízo motor, que interfere na capacidade de locomoção, sendo necessário auxílio para caminhar. No presente

estudo, utilizamos o fato de que os animais precisam ser habituados à arena onde ocorre o teste de reconhecimento de objetos 24 h antes de iniciarem o treino com os objetos, para avaliar os efeitos da cirurgia para a infusão do peptídeo A β e dos tratamentos na atividade locomotora e nos comportamentos associados à ansiedade dos animais utilizados no projeto. No CA, a locomoção e o levantar sobre as patas traseiras possuem características exploratórias e motoras, horizontal e vertical, respectivamente (Iravani et al., 2002). Não observamos diferenças significativas entre os grupos na atividade locomotora. A infusão do peptídeo A β não afetou a atividade locomotora no CA, em acordo com os nossos resultados no teste de suspensão pela cauda. Ao que parece, no período de avaliação dos comportamentos relacionados à atividade locomotora dos animais, estes ainda não apresentavam déficit motor, o que corrobora a hipótese de que os resultados descritos no teste de reconhecimento de objetos não foram afetados pela atividade locomotora dos animais.

Como mencionado acima, o CA também tem sido utilizado no estudo de comportamentos associados à ansiedade (Choleris et al., 2001), que são avaliados pelo número de entradas na área central da arena e pelo tempo de permanência nesta área. De forma geral, os nossos resultados não demonstraram diferenças significativas no comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto entre os dois grupos controle (VEH-A β e VEH-HEP) e os demais. Somente os animais que foram infundidos com o A β e tratados com nicotina (NIC-A β) apresentaram um nível maior de ansiedade quando comparado ao grupo VEH-HEP, tal como indicado pela redução do percentual de tempo dispendido no centro da arena.

Os nossos resultados no CA corroboram dados anteriores da literatura: já foi demonstrado nos testes de controle comportamental que a cirurgia estereotáxica com administração intra-hipocampal bilateral de uma única dose de peptídeo A β não promove déficits de locomoção e ansiedade (Garcia et al., 2015). Um outro estudo observou que a infusão intracerebroventricular de peptídeo A β não alterou o desempenho dos animais no CA (dos Santos et al., 2013). O padrão de resultados observados no CA indica que as alterações de memória observadas com a infusão do A β e que foram revertidas com o uso da vareniclina ou da nicotina não podem ser explicadas por eventuais alterações locomotoras nem por variações dos níveis de ansiedade na arena em que foi realizado o teste de reconhecimento de objetos.

5.3 Reconhecimento de objetos

A memória de reconhecimento pode ser testada em roedores usando-se o teste de reconhecimento de objetos, que é baseado na tendência espontânea que os roedores têm de explorar objetos novos mais do que objetos aos quais eles foram previamente expostos. As vantagens desse tipo de teste incluem o fato de que eles não são baseados em reforços positivos (como a utilização de alimentos) ou negativos (como a utilização de choques elétricos) (Mumby et al., 2001; Clark et al., 2005). A capacidade de reconhecimento de objetos é comumente acometida em humanos que sofrem de DA (Winters et al., 2008).

No presente estudo, tanto a memória de curto prazo (STM) quanto a memória de longo prazo (LTM) no RO foram prejudicadas nos animais do grupo VEH-A β (em que houve a infusão do peptídeo A β 1-40 sem qualquer tratamento), revelado pelo baixo índice de interação com o objeto novo neste teste quando comparados aos demais grupos. Este nosso resultado está de acordo com estudos recentes que demonstram um significativo declínio na capacidade de reconhecimento de um novo objeto causado pela administração intracerebroventricular do peptídeo A β 1-40 (Santos et al., 2012) e A β 1-42 em roedores (Dodart et al., 2002; Sheng et al., 2012). O acúmulo de A β desencadeia uma série de alterações bioquímicas, incluindo respostas inflamatórias, ativação da micróglia e de astrócitos, além da liberação de citocinas e radicais livres, acarretando prejuízos à memória (Stahl, 2010). A associação desses fatores portanto, estimula a via amiloidogênica, com maior produção de peptídeo A β agravando ainda mais a DA e, conseqüentemente, seus danos cognitivos, principalmente para a memória (Querfurth e LaFerla., 2010).

Diversas evidências vêm demonstrando a importância da participação do sistema colinérgico em processos cognitivos. Foi observado por Carta e colaboradores em 2006, no teste de “rotarod” (cilindro giratório), que a ACh participa do processamento de memórias procedurais no estriato (Carta et al., 2006). Sabe-se também que as projeções colinérgicas para o córtex perirrinal participam do processamento da memória para o reconhecimento de objetos em ratos (Winters e Bussey, 2005). Foi visto que a injeção de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos, compromete a memória episódica no reconhecimento de objetos (Ennaceur e Meliani, 1992; De Bruin e Pouzet, 2006), enquanto a administração de agonistas nicotínicos, por sua vez, é capaz de potencializar essa memória (Puma et al., 1999).

Já foi demonstrado que a nicotina e outros agonistas nicotínicos melhoram as funções cognitiva e psicomotora, enquanto que antagonistas nicotínicos causam deficiência na cognição (Maelicke & Albuquerque, 2000). O seu efeito neuroprotetor está associado ao fato dela intensificar a produção de acetilcolina (Court et al., 1991; Grossberg et al., 1989, London et al., 1989). Segundo demonstrado por Hasselmo, em 2002, altos níveis de acetilcolina parecem modular a aquisição de novas memórias ao potencializar a responsividade do córtex a estímulos sensoriais. Dessa maneira, evidências comportamentais da melhora da memória por agonistas nicotínicos devem resultar do aumento do *input* de aferências sensoriais para estruturas corticais onde as memórias são codificadas.

O presente estudo demonstrou que os tratamentos com vareniclina (um agonista parcial de receptores $\alpha 4\beta 2$ e um agonista total de receptores $\alpha 7$) ou nicotina previnem o prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo A β 1-40, preservando a STM e a LTM no teste de reconhecimento de objetos. Em 2000, Wang e colaboradores demonstraram uma interação direta entre nAChRs $\alpha 7$ e o peptídeo β -amilóide e, em 2013, foi demonstrado que a vareniclina perturba essa interação (Ruiqing Ni et al., 2013). Recentemente, a vareniclina foi avaliada em um estudo clínico aberto. Embora tenham sido reportados efeitos adversos no humor, a vareniclina promoveu uma significativa melhora na memória verbal sem, entretanto, melhorar a memória espacial. (Smith et al., 2009; Karam et al., 2010). Um estudo de 2011, conduzido por Lilja, sugere que a vareniclina inibe a ligação entre o peptídeo beta-amilóide e o receptor alfa-7 e atenua o aumento de cálcio intracelular provocado por oligômeros β -amilóides.

Nossos resultados sugerem que o tratamento prévio com vareniclina fornece um efeito protetor ao cérebro desses animais, uma vez que ela se liga aos receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, promovendo um aumento dos níveis de acetilcolina sem o efeito da dependência que é provocado pela nicotina. Ao mesmo tempo, sua interação com os receptores $\alpha 7$, ativando-os e/ou dessensibilizando-os, pode prevenir a interação desses receptores com o peptídeo β -amilóide e, conseqüentemente, prevenir toda a cascata de eventos subsequentes que levam a perda cognitiva, fazendo da vareniclina um forte candidato para o tratamento e/ou prevenção da doença de Alzheimer.

5.4 Labirinto em Cruz Elevado Modificado

O modelo do labirinto em cruz elevado modificado, inicialmente proposto por Silva e Frussa-Filho (2000), é um modelo para o estudo do aprendizado e da memória que fornece simultaneamente informações sobre o estado emocional do animal (Silva & Frussa-Filho, 2000). O teste LCEM tem um componente espacial e é baseado na aversão dos roedores a espaços abertos e altos. Os animais preferem áreas fechadas, mais protegidas do labirinto e se lembram da configuração dos braços abertos e fechados. Nesse teste, após uma primeira exposição do animal ao aparato, a reexposição ao mesmo ambiente facilita a evocação da memória tornando possível estudar a reconsolidação da memória, ou por interferência ambiental ou farmacológica (Abel e Lattal, 2001; Schafe et al., 2001). O ambiente conhecido facilita a reativação da memória uma vez que é possível demonstrar que os animais treinados apresentaram um desempenho melhor quando recolocados no mesmo ambiente (Abel e Lattal, 2001).

A literatura vem mostrando uma associação clara entre o sistema colinérgico e a memória espacial (Biala & Kruk, 2008, 2009; Kruk et al., 2011). Em estudo de Marta Kruk-S e colaboradores, revelou que uma injeção aguda de nicotina, um agonista específico dos receptores nicotínicos, melhora significativamente a memória espacial em camundongos no LCEM (Kruk et al., 2012). Muitas investigações têm sugerido que os receptores colinérgicos são importantes para os complexos mecanismos dos processos de cognição, especialmente o aprendizado espacial, porém os mecanismos neurais que são criticamente responsáveis por essa indução das respostas de memória pelos agonistas colinérgicos ainda não estão muito bem esclarecidos (Davis et al., 2007). O mesmo estudo demonstrou também que uma injeção aguda de escopolamina (um antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos) prejudica significativamente os processos de memória e aprendizagem dos camundongos no LCEM. Quando se administrou uma injeção aguda de vareniclina em diferentes doses, o estudo não demonstrou qualquer diferença significativa na análise da memória espacial no LCEM. Por outro lado, quando combinaram a vareniclina com a nicotina foi observada um desempenho diferente. O pré-tratamento com vareniclina preveniu a melhora da memória espacial induzida pela nicotina (Kruk et al., 2012). A vareniclina se liga com grande afinidade ao mesmo receptor $\alpha 4\beta 2$ que a nicotina também se liga. Mas como agonista parcial desses receptores, a vareniclina produz o mesmo efeito de liberação de dopamina, porém com uma menor

eficácia. Assim, a vareniclina compete com a nicotina pelo sítio ativo, se liga com alta afinidade, porém produz um efeito menor.

No presente estudo, as respostas relacionadas à memória foram medidas também no LCEM (Biala & Kruk, 2008, 2009; Itoh et al., 1990; Serafim et al., 2010). Os animais foram observados em dois momentos. O primeiro momento refletiu o comportamento de aquisição/aprendizado e o segundo momento refletiu a retenção da informação ou memória. Nossos resultados demonstraram na reexposição dos animais ao equipamento, uma diminuição no tempo da latência do animal. Todos apresentaram um tempo menor para ir para o braço fechado. No entanto, observamos que não houve diferenças significativas entre os grupos. Podemos inferir que os resultados nesse teste podem ter sido influenciados pela sequência experimental do teste: os animais, ao participarem da tarefa no LCEM, já haviam sido testados dois dias seguidos na esquiva passiva, mais dois dias seguidos no reconhecimento de objetos e mais quatro dias seguidos no teste de suspensão pela cauda (que será descrito mais adiante). Portanto, vale ressaltar que esses animais já apresentavam um nível de estresse considerável e que pelo fato do teste no LCEM ser associado também ao estado emocional dos animais (Sanson e Carobrez, 1999), estes podem ter tido seu desempenho comprometido.

5.5 Suspensão pela Cauda

A depressão é a comorbidade neuropsiquiátrica mais prevalente associada à doença de Alzheimer (DA), ocorrendo em cerca de 50% dos indivíduos (Engedal et al., 2011). A depressão está relacionada, ao menos em parte, à diminuição nos níveis sinápticos de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) ou ineficiência nos seus receptores. Pacientes com DA não apresentam toda a sintomatologia clássica da depressão, como tristeza, insônia e perda de apetite. Portanto, o diagnóstico de depressão nesses indivíduos é bem complexo (Olin et al., 2002).

O modelo de suspensão pela cauda é consagrado por seu valor preditivo de atividade antidepressiva em humanos. O SC foi inicialmente utilizado em 1985 para estudar a eficácia de drogas antidepressivas (Steru et al., 1985; Cryan; Mombereau; Vassout, 2005) e o seu uso vem crescendo substancialmente a fim de avaliar, em roedores, parâmetros comportamentais relacionados ao estado emocional tipo-depressivo. O SC é um teste comportamental que

fornece um forte fator motivacional para a tentativa de fuga, pois o animal fica pendurado de cabeça para baixo suspenso pela cauda, uma posição muito desconfortável. O teste baseia-se no fato de que os animais submetidos a esse tipo de estresse lutam inicialmente com movimentos orientados para a fuga, seguidos de períodos de postura imóvel (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). Baseado na premissa de que o comportamento depressivo nos camundongos está associado com resignação e impotência (Porsolt, 2000), nós utilizamos o SC para a avaliação do comportamento tipo-depressivo dos animais do presente estudo.

O modelo de administração do peptídeo A β 1-40 é classicamente utilizado para estudar novos compostos que auxiliem no tratamento da DA, uma vez que mimetiza sintomas da doença (Takeda et al., 2009). Porém, recentemente, foi observado nesse modelo que sintomas tipo-depressivos antecedem os sintomas de déficit cognitivos e de memória (Pamplona et al., 2010). Assim, esse modelo parece constituir-se em uma possível ferramenta experimental para auxiliar no melhor entendimento da depressão associada a DA.

Foi visto que a administração do A β 1-40 em camundongos produz comportamentos tipo-depressivos em diferentes testes comportamentais, como o SC e o teste do nado forçado (Pamplona et al., 2010; Dos Santos et al., 2013). No entanto, os nossos resultados demonstraram que grupo VEH-A β não apresentou aumento de frequência de ocorrência de comportamentos tipo-depressivos no SC durante o primeiro dia de teste.

O SC também tem sido utilizado para avaliar comportamentos associados à atividade motora, às assimetrias cerebrais e ao aprendizado e memória, principalmente no contexto da habituação, quando o teste é repetido ao longo de múltiplos dias (Manhães et al., 2014). Para a análise da atividade motora no teste de suspensão pela cauda, utiliza-se o número total de contrações de tronco durante o teste como parâmetro comportamental. Espera-se que haja uma relação inversa entre o número de contrações e o tempo de imobilidade no SC. A expectativa é de que, com a repetição das sessões experimentais, ocorra um aumento do tempo de imobilidade e redução do número total de contrações, refletindo um fenômeno de habituação. Essa hipótese foi corroborada por nossos dados. Os nossos resultados demonstraram que ao longo das quatro sessões experimentais, os animais apresentaram uma variação destes parâmetros compatível com o fenômeno de habituação. Não houve, porém, diferenças significativas entre os grupos. Ou seja, nem a cirurgia com administração do peptídeo A β nem os tratamentos afetaram a atividade dos animais no SC, o que pode ser explicado pelo fato de que o fenômeno de habituação é considerado uma forma relativamente primitiva de memória e que é controlado por circuitos menos complexos do que os utilizados para a memória visuo-espacial (Manhães et al., 2014). Cabe mencionar também que o

estímulo no SC é muito aversivo, o que pode facilitar a consolidação da memória mesmo em animais infundidos com o A β que apresentem deficiências no teste de reconhecimento de objetos.

5.6 Histologia

O processo inflamatório pode ser definido como um conjunto de interações complexas entre fatores solúveis e células, que ocorre nos tecidos em resposta a danos traumáticos, infecciosos, pós-isquêmicos ou tóxicos (Nathan, 2002). Num estado não patológico, a ativação da inflamação apresenta um papel benéfico para os indivíduos. Já num estado patológico de doença de Alzheimer, por exemplo, a resposta inflamatória torna-se crônica e pode causar graves efeitos ao organismo. O processo inflamatório é caracterizado por três eventos principais, que incluem o aumento substancial do suprimento de sangue para o local afetado, o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Sharma e Buchanan, 1994; Levy, 1996). No entanto, a resposta inflamatória que ocorre no sistema nervoso central parece ser diferente em alguns aspectos daquela que ocorre em tecidos periféricos. Pelo fato do cérebro não apresentar fibras nociceptivas, torna-se difícil o reconhecimento do início do processo inflamatório, sendo que os sinais clássicos da inflamação (rubor, tumor, calor e dor) não são observados no SNC. Além disso, a presença da barreira hematoencefálica é capaz de reduzir substancialmente a entrada de células inflamatórias, patógenos e de algumas macromoléculas no espaço subaracnoídeo, fazendo com que o processo inflamatório no cérebro transcorra de maneira bastante peculiar (Tuppo e Arias, 2005). As células da glia representam o principal tipo celular responsável pelo sistema de defesa no sistema nervoso central e parecem desempenhar um papel central no processo inflamatório associado à DA. Essas células se dividem em três grupos: os astrócitos, os oligodendrócitos e as células da micróglia. Em resposta ao dano neuronal, ocorre ativação de uma complexa resposta celular imune, envolvendo astrócitos e microglia (Liberto et al., 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que, além das características típicas da doença, como a presença das placas amilóides, o cérebro de indivíduos acometidos pela DA apresenta sinais evidentes da ativação do processo inflamatório e da resposta imune (Akiyama et al., 2000; Wyss-Coray e Mucke, 2002). Contudo, o papel da inflamação no desenvolvimento e

progressão da DA ainda não está bem esclarecido. Foi demonstrado recentemente que a relação entre o processo inflamatório e a progressão da DA parece não ser tão simples quanto inicialmente se especulou. Wyss-Coray e colaboradores (2001) evidenciaram que alguns aspectos da resposta imunológica parecem ser importantes para a fagocitose dos fragmentos amilóides depositados no cérebro. Neste estudo, realizado em camundongos que expressam a APP humana, observou-se o aumento da atividade fagocítica da microglia, reduzindo significativamente a formação de placas amilóides e de emaranhados neurofibrilares nas regiões hipocampal e cortical do cérebro.

Tendo em vista a presença das placas amilóides como importante marcador da doença de Alzheimer e o processo inflamatório que transcorre da doença, avaliamos através da análise histológica e imunohistoquímica, regiões do hipocampo dos cérebros dos animais tratados no presente estudo. Para confirmar a presença de depósitos amilóides, analisamos cortes histológicos de cérebro corados com vermelho Congo. A presença de depósitos amilóides foi evidente na parede das artérias leptomeníngicas. Observamos que o peptídeo β -amilóide foi depositado na túnica média, parte mais externa do vaso. No animal VEH-A β , esta túnica está mais alaranjada enquanto que no animal VEH-HEP, nosso controle experimental, esta apresenta-se mais arroxeadada. Esse resultado corrobora dados anteriores da literatura (Iores-Marçal et al., 2006; Viel et al., 2008) e confirma que o nosso processo cirúrgico teve sucesso. Além disso, observamos, nas lâminas coradas com H&E, a presença de infiltrados inflamatórios linfocíticos perivasculares no córtex cerebral, evidenciando um processo inflamatório nos animais que receberam infusão com peptídeo β -amilóide. Por outro lado, o grupo VEH-HEP, também cirúrgico, porém sem infusão do peptídeo β -amilóide, não apresentou características de inflamação.

Para investigar mudanças proliferativas e morfológicas relacionadas às células gliais, realizamos uma análise imunohistoquímica qualitativa no hipocampo utilizando o marcador DAPI de núcleo celular, e avaliamos as micróglia utilizando marcador Iba-1. O presente estudo focou na região hipocampal (giro dentado e CA1), que é uma das primeiras regiões a desenvolver os sinais neuropatológicos da DA, e que, em casos mais avançados, é a região mais profundamente acometida (Braak, 1991; Ball Mar, 1988). Observamos que no grupo VEH-HEP, a micróglia apresenta morfologia mais ramificada, com processos mais finos. Já o grupo VEH-A β evidenciou uma marcação mais intensa. Além do mais, estas apresentaram uma morfologia mais arredondada pela hipertrofia que caracteriza a micróglia ativada. A gliose reativa pode ser definida como o crescimento anormal, por hipertrofia e/ou hiperplasia, da micróglia que ataca as placas senis, de astrócitos que circundam o complexo de placas

como um empacotamento de proteção, e de uma maneira mais limitada e talvez qualitativamente diferente, de oligodendrócitos (Giulian, 1999; Polito, Reynolds 2005). Por fim, observamos que ocorre uma gliose reacional no grupo VEH-A β , como provável mecanismo funcional ou de adaptação do cérebro, que normalmente ocorre em pacientes com DA. Estas observações parecem carecer de dados quantitativos comprobatórios, que podem ser feitos através de estudo morfométrico das células gliais quanto ao tamanho e espessura. Não foi possível a observação histológica dos demais grupos experimentais por diversas intercorrências com as técnicas adotadas. No entanto, comprovamos que o nosso modelo experimental cirúrgico de infusão de peptídeo A β promoveu um depósito amilóide nas paredes dos vasos e um decorrente processo inflamatório evidenciado pela presença de infiltrados inflamatórios no córtex e gliose reacional no hipocampo que não é associado ao processo cirúrgico por si só.

5.7 Perspectivas

Os resultados apresentados nessa tese foram um pontapé inicial que nos conduz a uma investigação mais profunda de todo o mecanismo envolvido nos efeitos da vareniclina e da nicotina sobre a memória na doença de Alzheimer. Como perspectivas, temos o objetivo de demonstrar através de outros testes comportamentais o desempenho da memória dos animais injetados com o peptídeo A β e tratados com vareniclina. Acreditamos que o teste de suspensão pela cauda foi útil para avaliar os comportamentos tipo-depressivos e locomotores dos animais, entretanto, sua inclusão no protocolo provavelmente afetou o teste no labirinto em cruz elevado modificado que parece ser um importante teste para a avaliação da memória espacial. Acreditamos que, em uma nova avaliação, com algumas adaptações para melhorar as condições do teste, o LCEM poderá se mostrar uma potente ferramenta para o estudo. O labirinto radial de 8 braços (Olton & Papas, 1979) e o labirinto aquático de Morris (Morris et al., 1982) também são possíveis candidatos para essa próxima etapa do projeto.

Uma importante meta agora será a avaliação histológica de todos os grupos experimentais, procurando verificar se os tratamentos afetaram a deposição amilóide e os processos inflamatórios envolvidos, com análise das demais regiões do hipocampo e córtex. Investigaremos também os astrócitos, já que desempenham um importante papel nesse processo inflamatório. A avaliação da sinaptofisina, um marcador de disfunção sináptica,

também será uma importante ferramenta de análise uma vez que já foi demonstrado que a administração de peptídeo A β 1-40 diminui os seus níveis.

Tendo em vista o complexo mecanismo de ação da vareniclina e nicotina que envolve ativação e dessensibilização de receptores nicotínicos, também temos por objetivo estudar a expressão de receptores $\alpha 7$ através de imunodeteção. A fim de avaliarmos a densidade de receptores nicotínicos $\alpha 7$ cerebrais e, também, identificarmos as áreas cerebrais nas quais esses receptores estão distribuídos, processaremos o experimento de autoradiografia nos cortes histológicos dos animais tratados. Finalmente, o sistema colinérgico deverá ser avaliado mais diretamente, seja através do uso do HPLC (para os neurotransmissores e seus metabólitos) ou da avaliação das proteínas (receptores, transportadores, enzimas de degradação, etc) que constituem o sistema.

CONCLUSÕES

- a) Observamos no presente estudo que os animais demonstraram a capacidade de evocar a memória associada ao choque recebido no primeiro dia de teste ocorrido antes que se instalasse o quadro neurodegenerativo. Além disso, observamos que os animais na segunda sessão de teste continuaram apresentando um aumento da latência na plataforma, sugerindo um possível reforço no aprendizado e reforçando a ideia de que memórias formadas a partir de estímulos intensos podem estar preservadas mesmo em modelos experimentais de DA.
- b) Demonstramos que os tratamentos com vareniclina ou nicotina previnem o prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo A β 1-40, preservando a STM e a LTM no teste de reconhecimento de objetos. Nossos resultados sugerem que o tratamento prévio com vareniclina fornece um efeito protetor ao cérebro desses animais se ligando aos receptores nicotínicos e, conseqüentemente, prevenindo toda a cascata de eventos subsequentes que levam a perda cognitiva.
- c) Observamos que na reexposição dos animais ao LCEM uma diminuição no tempo da latência do animal no equipamento. Todos apresentaram um tempo menor para ir para o braço fechado. No entanto, observamos que não houve diferenças significativas entres os grupos;
- d) Em relação aos comportamentos associados à depressão no SC não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais na frequência de ocorrência de comportamentos tipo-depressivos entre o primeiro e o segundo dia de teste, sugerindo que o nosso modelo experimental não produz um estado depressivo nos animais;
- e) Na avaliação da atividade locomotora nos teste do CA, não observamos diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que a infusão de A β e/ou tratamentos não promove déficits de locomoção ou ansiedade. Já na avaliação da atividade locomotora nos teste do SC demonstramos que os animais apresentaram ao longo das quatro sessões experimentais, uma variação de parâmetros relacionados à locomoção compatível com o fenômeno de habituação não havendo, porém diferenças significativas entre os grupos. Ou seja, nem a cirurgia com administração do peptídeo A β nem os tratamentos afetaram a atividade dos animais no SC.
- f) Na análise histológica observamos a evidente presença de depósitos amilóides na túnica media da parede das artérias leptomeníngias. Além disso, foi possível observar

a presença de infiltrados inflamatórios linfocíticos perivasculares no córtex cerebral, evidenciando um processo inflamatório nos animais que receberam infusão com peptídeo β -amilóide.

- g) Através da imunohistoquímica, observamos que a infusão com peptídeo β -amilóide promoveu microgliose no hipocampo que não está associado ao processo cirúrgico por si só, evidenciando novamente um processo inflamatório nos animais que receberam infusão com peptídeo β -amilóide.

REFERÊNCIAS

- Abel, T.; Lattal, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 180-187, 2001.
- Abreu, I. D.; Forlenza, O.V.; Barros, H. L. Demência De Alzheimer: correlação entre memória e autonomia. *Rev Psiquiátr. Clin.*, v. 32, n. 3, p. 131-6, 2005.
- Abreu, I.D.; Forlenza, O.V.; Barros, H.L. Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia Alzheimer Disease: correlation between memory and autonomy. *Rev. Psiquiátr. Clin.* 32 (3); 131-136, 2005.
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K (2000) *Cell*
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 2009;89(1):73-120.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schroder H, et al. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann NY Acad Sci.* 1995;757:48-72
- Almeida, O.P. (1997). *Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel?* *Rev Ass Med Brasil*; 43(1): 77-81.
- Almeida, O.P. Nitrini, R. - *Demência*. São Paulo: Fundação Byk, 1998.
- Alves L, Correia AS, Miguel R, Alegria P, Bugalho P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. *Front Neurol.* 2012;3:63.
- Armstrong, S. L., Gleitman, L. R., and Gleitman, H. (1983). What some concepts might not be. *Cognition* 13: 263-308
- Azevedo, Dionísio et al. Espectroscopia de Prótons na Doença de Alzheimer e no Comprometimento Cognitivo sem Demência: estudo de uma amostra comunitária. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 1021-1027, 2005.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. Epub 2011 Mar 1.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.(2011). Alzheimer's disease. *Lancet.* 377:1019-1031.
- Beatty WW, Butters N, Janowsky DS. Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypothesis of dementia. *Behav Neurol Biol*, 45:196- 211,1986.
- Benadiba, M. et al. Novos alvos moleculares para tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) em doenças

neurodegenerativas. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, v. 34, suppl.2, p.125-148, out. 2012.

Bencherif M, Lippiello PM. Alpha7 neuronal nicotinic receptors: the missing link to understanding Alzheimer's etiopathology? *Med Hypotheses* 2010; 74: 281-5.

Berman K e Brodaty H. Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* 2004;18:807-825.

Bero AW, Yan P, Roh JH, Cirrito JR, Stewart FR, Raichle ME, Lee JM, Holtzman DM. Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nature neuroscience*.2011;14:750-756.

Bertram L, Tanzi R. Genetics of Alzheimer's disease. In: Dickson (ed) *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: International Society of Neuropathology Press 2003. p. 40-6.

Biala G, Kruk M: Cannabinoid receptor ligands suppress memory-related effects of nicotine in the elevated plus maze test in mice. *Behav Brain Res*, 2008, 192, 198–202.

Biala G, Kruk M: Influence of bupropion and calcium channel antagonists on the nicotine-induced memoryrelated response of mice in the elevated plus maze. *Pharmacol*

Biala G, Kruk M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological*, v. 32, n. 1, p. 54-61, 2008.

Biala, G.; Kruk, M. Influence of bupropion and calcium channel antagonists on the nicotine-induced memory-related response of mice in the elevated plus maze. *Pharmacol Rep*. 2009 Mar-Apr;61(2):236-244.

Biochem Cell Biol 37:289-305.

Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. 2001. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 205-218.

Blass JP, Poirier J. Pathophysiology of the Alzheimer syndrome. In: Gauthier S (ed.). *Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease*. London: Martin Dunitz, 1996. p. 17-31.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM (2004) Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice. Effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* 124(4):735–741

Boccia MM1, Blake MG, Krawczyk MC, Baratti CM. Hippocampal $\alpha 7$ nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience*. 2010 Dec 1;171(2):531-43. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.027. Epub 2010 Sep 9.

Bottino, C. M. C.; Carvalho, I. A. M.; Alvarez, A. M. M. A.; et al. Reabilitação cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 60, n. 1, p. 70-9, 2002.

Braak E, Braak H. Alzheimer's disease: transiently developing dendritic changes in pyramidal cells of sector CA1 of the Ammon's horn. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997;93(4):323-5.

Braak H, Braak E (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 53:127–140.

Breteler, M. B., Claus, J. J., Duijn, C. M. et al. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev.* 1992. 14:59.

Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate and mitochondria. *Mol Neurobiol.* 2003;27(3):325-55.

Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB (2009) Nicotinic acetylcholine receptor signalling: Roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* 61, 39-61.

Burghaus L, Schutz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J, Schroder H (2000) Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res* 76:385-388.

Burns, A. Iliffe S. *Dementia.* BMJ, 2009; 338, b75.

Burstein,AH, Fullerton,T, Clark,DJ, e Faessel,HM. Pharmacokinetics, safety, and tolerability after single and multiple oral doses of varenicline in elderly smokers. *J.Clin.Pharmacol.* 2006; 46: 1234-1240.

Bushnell PJ: Effects of scopolamine on locomotor activity and metabolic rate in mice. *Pharmacol Biochem Behav,* 1987, 26, 195–198.

Bustamante, E.; Bottino, C.; Lopes, M. et al. - Instrumentos combinados na avaliação de demência em idosos: resultados preliminares. *Arq Neuropsiquiatria* 2003;61(3-A):601-6.

C o rey-Bloom J, Anand R, Veach J. A ramdomized trial evaluating the e fficacy and safety of ENA 713 (Rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer disease for the ENA 713 B352 Study Group. *Int J Geriatric Psychopharmacol* 1998;1:55-65.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH and Izquierdo I. 2004. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11: 572-578.

Cannon CE, Puri V, Vivian JA, et al. The nicotinic 7 receptor agonist GTS-21 improves cognitive performance in ketamine impaired rhesus monkeys. *Neuropharmacol* 2013; 64: 191-6.

Caramelli P, Chaves MLF, Engelhardt E, et al. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimer's disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GAL-BRA-01). *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62:379-384.

Caramelli, P.; Teixeira, A. L.; Buchpiguel, C. A. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. Exames complementares. *Dement Neuropsychol*, 2011b; v.5, Suppl 1, p. 11-20.

Cardona-Gómez, G.P., Mendez, P., Doncarlos, L.L., Azcoitia, I. And Garcia-Segura, L.M. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res. Reviews* v.37, p. 320- 334, 2001.

Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, Fadda F. Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience*. 2006;139:1163–1172.

Cataldo JK, Prochaska JJ, Glantz SA. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):465-80.

Charchat, H.; Nitrini, R.; Caramelli, R.; Sameshima, K. Investigação de marcadores clínicos dos estágios iniciais da doença de Alzheimer com testes neuropsicológicos computadorizados. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 14, n. 2, p. 305-16, 2001.

Check, E. - Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature* 2002;415 (6871): 462.

Choleris, E.; Thomas, A.W.; Kavaliers, M.; Prato, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 235-260.

Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 2012 Jun;18(3):228-37.

Coe,JW, Brooks,PR, Vetelino,MG, Wirtz,MC, Arnold,EP, Huang,J, Sands,SB, Davis,TI, Lebel,LA, Fox,CB, Shrikhande,A, Heym,JH, Schaeffer,E, Rollema,H, Lu,Y, Mansbach,RS, Chambers,LK, Rovetti,CC, Schulz,DW, Tingley,FD, III, e O'Neill,BT. Varenicline: an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J.Med.Chem*. 2005; 48: 3474-3477.

Conway, A.R.A., Kane, M.J., Bunting, M.F. et al. *Psychonomic Bulletin & Review* (2005) 12: 769. doi:10.3758/BF03196772

Corey-Bloom, J.; Thal, L.; Galasko, D.; Folstein, M.; Drachman, D.; Raskind, M.; Lanska, D.J. - Diagnosis and evaluation of dementia. *Neurology* 1995;45:211-8.

Court, J. A., Perry, E. K. Dementia. The neurochemical bases putative transmitter orientated therapy. *Pharmacol Ther*. 1991. 52:423.

Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 15;19(R1):R12-20.

Cryan, J. F.; Mombereau, C.; Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

Damasio, A.R. (2003). *Looking for Spinoza: Joy, sorrow, and the feeling brain*. New York: Harcourt.

Dartigues JF, et al. Vasodilators and nootropics as predictors of dementia and mortality in the PAQUID cohort. *J Am Geriatr Soc* 2007 mar; 55(3): 395-9.

Davies P. Neurotransmitter-related enzymes in senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Res*, 171:319-327, 1997.

Davinelli S, Intrieri M, Russo C, Di Costanzo A, Zella D, Bosco P, et al. The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers. *Immun Ageing*. 2011;8:7.

Davis JA, Kenney JW, Gould TJ: Hippocampal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor involvement in the enhancing effect of acute nicotine on contextual fear conditioning. *J Neurosci*, 2007, 27, 10870–10877.

De Bruin, N. e B. Pouzet. Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol Biochem Behav*, v.85, n.1, Sep, p.253-60. 2006.

Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 4125-4133.

Dodart, J. C.; Bales, K. R.; Gannon, K. S.; Greene, S. J.; Demattos, R. B.; Mathis, C.; Paul, S. M. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nature neuroscience*, v. 5, n. 5, p. 452-457, 2002.

dos Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues AL, Farina M, De Lima TC, Prediger RD. *Behav Brain Res*. 2013 May 1;244:107-15. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.039. Epub 2013 Feb 5. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β (1-40)) administration in mice. *Behav Brain Res*. 2013 May 1;244:107-15. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.039. Epub 2013 Feb 5.

Dourado, M.; Laks, J.; Rocha, M.; Soares, C.; Leibing, A.; Engelhardt, E. Consciência da doença na demência: resultados preliminares em pacientes com Doença de Alzheimer leve e moderada. *Arq Neuropsiquiatr*, v.63, n.1, p. 114-118, Mar. 2005.

Duijn, C. M., Hofman, A. Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *Brit Med J*. 1997. 302:491.

Duyckaerts C, Dickson DW. Neuropathology of Alzheimer's disease. In: Dickson DW (ed.). *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: International Society of Neuropathology Press, 2003. p. 47-65.

Eistein, G.O.; McDaniel, M.A. - Normal ageing and prospective memory. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory and cognition*. 1990;16,717-26. In: Leibing, A.; Scheinkman, L. - *The diversity of Alzheimer Disease: Different approaches and contexts*. IBUP, 2002a.

Engedal K1, Barca ML, Laks J, Selbaek G. Depression in Alzheimer's disease: specificity of depressive symptoms using three different clinical criteria. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011 Sep;26(9):944-51. doi: 10.1002/gps.2631. Epub 2010 Dec 7.

Engelhardt, E. et al. - Quantas demências degenerativas? Doença de Alzheimer e outras demências: considerações diagnósticas. *Inform Psiquiatr* 17(1):10-20, 1998.

Engelhardt, E.; Pereira, E.R.F.; Santos, M.D.; Cavalcanti, J.L.S.; TEMPONI, G.M.; ALBUQUERQUE, E. - Galantamina no tratamento da DA: da pesquisa ao paciente. *Revista brasileira de Neurologia* 2001;37(2):6-16.

Engelhardt, Elias et al. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, Dec. 2005.

Engstrom I., Ronquist G., Pettersson L., Waldenstrom A. (1995) Alzheimer amyloid beta-peptides exhibit ionophore-like properties in human erythrocytes. *Eur J Clin Invest*. 25, 471-6.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31:47-59.

Ennaceur, A. e K. Meliani. Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology (Berl)*, v.109, n.3, p.321-30. 1992.

Espejo, E. F. 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research*, 87, 233-238.

Evans, R.M.; Hui, S.; Perkins, A. et al. - Cholesterol and APOE genotype interact to influence Alzheimer disease progression. *Neurology* 2004;62(10):1869-71.

Faessel, H.M., Smith, B.J., Gibbs, M.A., Gobey, J.S., Clark, D.J., e Burstein, A.H. Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. *J. Clin. Pharmacol.* 2006a; 46: 991-998.

Ferreira, L. K.; Busatto, G. F. Neuroimaging in Alzheimer's disease: current role in clinical practice and potential future applications. *Revista do Hospital das Clínicas, São Paulo*, v. 66, p. 19-24, mar. 2011.

Fibiger HC (1982) The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res* 257:327-388.

Finefrock, A.E.; Bush, A.I.; Doraiswamy, P.M. - Current status of metals as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 2003;51(8):1143-8.

Finkel SI, Costa e Silva J, Cohen G, Miller S, Sartorius N. Behavioural and psychological signs and symptoms of dementia: a consensus statement on current knowledge and implications for research and treatment. *Int Psychogeriatr* 1996;8(Suppl 3):497-500 for antidepressants. *Arch. Int. Pharm. Ther.*, v. 229, p. 327-336, 1977.

Forlenza, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. Rev Psiquiátr Clin, v. 32, n. 3, p. 137-48, 2005.

Forlenza, O.V.; Caramelli, P. - Neuropsiquiatria Geriátrica. São Paulo: Atheneu, 2000.

Frank B, Gupta S. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. Ann Clin Psychiatry 2005 dec; 17(4): 269-86.

Franklin JL, Johnson EM Jr. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. Trends Neurosci. 1992; 15: 501-8.

Franklin KBJ, Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press; 1997.10.1111/j.1469-7580.2004.00264.x.

Fratiglioni L, Amaducci L. An epidemiological survey of Alzheimer disease. In: Battistin, L.; Gesterbrand, F. (Eds.). Aging brain and dementia. New York: Wiley-Liss, 1990, pp.16-29.

Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, et al. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurology 2000; 54(11 Suppl 5):S10-5.

Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. Am J Pathol 152: 307-317.

Fridman, Cíntia et al. Alterações Genéticas na Doença de Alzheimer. Revista de Psiquiatria Clínica, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 19-25, 2004.

Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. Brain Res Brain Res Rev. 2004;47(1-3):275-89.

Gabryelewicz T, Barcikowska M, Jarczewska DL. Alzheimer's disease therapy - theory and practice. Wiad Lek. 2005; 58(9-10): 528-35.

Garcia A, Helen L Schimidt, Mariza P Lima, Alexandre Martins, Pamela M B Carpes 2015. Potencial neuroprotetor da Camellia Sinensis na memória em um modelo de doença de Alzheimer. (Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa

Gareri P, Cotroneo A, Lacava R, Seminara G, Marigliano N, Loiacono A, et al. Comparison of the efficacy of new and conventional antipsychotic drugs in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). Arch Gerontol Geriatr Suppl 2004;9:207-15.

Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR, Bottino CM. Platelet phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. J Neural Transm. 2004;111(5):591-601.

Geerts, H. - NC-531 (Neurochem). Curr Opin Investig Drugs 2004;5(1):95-100.

GENTRY CL AND LUKAS RJ Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurology Disorders* 1:359-385. 2002.

Gillum, L. A., Gouveia, C., Dorsey, E. R., Pletcher, M., Mathers, C. D., McCulloch, C. E., & Johnston, S. C. NIH disease funding levels and burden of disease. *PLoS One*, 2011; 6(2), e16837.

Carmo Filho, Aureo do; Fakoury, Max Kopti; Ferry, Fernando Raphael de Almeida. Ginkgo biloba e memória - revisão sistemática *REV. BRAS. GERIATR. GERONTOL.*, RIO DE JANEIRO, 2010; 13(1):145-152

Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 65:13–18.

Gong Y, Chang L, Viola KL et al. Alzheimer's disease- affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10417-22.

Gonzales,D, Rennard,SI, Nides,M, Oncken,C, Azoulay,S, Billing,CB, Watsky,EJ, Gong,J, Williams,KE, e Reeves,KR. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296: 47-55.

Gorenstein, C.; Andrade, L.H.S.G.; Zuardi, A.W. - Instrumentos para avaliação de pacientes com Demência. (Ed.1) *Escalas de Avaliação Clínica em Psiquiatria e Psicofarmacologia*. São Paulo: Lemos, 2000, pp. 331-43.

Gottfries CG, Karlsson I, Nyth AI. Treatment of depression in elderly patients with and without dementia disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 1992;6(Suppl 5):55-64.

Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr The Res.* 2003;64(4):216-35.

Grossberg, G. T., Nakra, R., Woodward, V. et al. Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease. *J Am Geriat Soc.* 1989. 37:819.

Grossman, M.; Mickanin, J.; Onishi, K.; Robinson, K.; D'esposito, M.B. Lexical Acquisition in Probable Alzheimer's Disease. *Brain and Language* 1997;60:443-63.

Grovrin, E., Levine, A. Purification of active cysteine proteases by affinity chromatography with attaches E-64 inhibitor. *Protein. Expr. Purif.*, v.15, n. 3, p.247-250, 1999.

Halliwell RF (2007) A short history of the rise of the molecular pharmacology of ionotropic drug receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:214-219.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6.

- Hartmann T., Bieger S.C., Bruhl B., Tienari P.J., Ida N., Allsop D., Roberts G.W., Masters C.L., Dotti C.G., Unsicker K., Beyreuther K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med.* 3, 1016-20.
- Hasselmo, M.E., Bodelon, C. and Wyble, B.P. (2002) A proposed function for hippocampal theta rhythm: Separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Computation*, 14(4): 793-817.
- Henderson VW, Benke KS, Green RC, et al. Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer's disease risk: interaction with age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:103-105.
- Hernandez CM, Kaye R, Zheng H, Sweatt JD, Dineley KT (2010) Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances betaamyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30, 2442-2453.
- Hindmarch, I.; Lefffeld, H.; Pena-Casanova, J. et al. - The Bayer - Activities of daily living scale (B-ADL). *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998;9(Suppl. 2):20-6.
- Ho L, Pieroni C, Winger D, Purohit DP, Aisen PS, Pasinetti GM. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 1999;57 (3):295-303.
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011 Apr 6;3(77):77sr1.
- Hooper C, Lovestone S, Sainz-Fuertes R. Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers. *Biomark Insights.* 2008 May 27;3:317-323.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Eikelenboom P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets.* 2003;4(6):461-8.
- Hoyle E, Genn RF, Fernandes C, Stolerman IP (2006) Impaired performance of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology (Berl)* 189:211–223
- Huang, T.H.; Yang, D.S.; Fraser, P.E.; Chakrabarty, A. - Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem* 2000;275(46):36436-40.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Beyreuther K, Masters CL. A4 amyloid protein immunoreactivity is present in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett.* 1989 Jul 3;101(3):352-5.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira (2012) Rio de Janeiro.
- Iores-Marçal, L.M., Viel, T.A., Buck H.S., Nunes, V.A., Gozzo, A.J., Cruz Silva, I., Miranda, A., Shimamoto, K., Ura, N., Araujo, M.S., 2006. Brain prolyl oligopeptidase inactivates bradykinin in a model of Alzheimer's disease. *Peptides* 27 (12), 3363–3369.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006;9:219-42.

Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*. 2002;110(1):49-58.

Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T: Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol*, 1991, 194, 71–76.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 1999;103:1–11.

Izquierdo, I. - Memória. Capítulo 2. São Paulo: Artmed, 2002.

Janus, C.; Pearson, J.; McLaurin, J. et al. - A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408(6815):979-82.

Jarvis B, Figgitt DP. Memantine. *Drugs Aging* 2003;20:465-476. 33. Berman K e Brodaty H. Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* 2004;18:807-825.

Jones, G. M. M., Sahakian, B., Levy, R. et al. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information, processing and short term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacol.* 1992. 108:485. *Journal of Medicine*, v. 362, n. 19, p. 1844-1845, 2010.

Kapogiannis D, Mattson MP. Perturbed Energy Metabolism and Neuronal Circuit Dysfunction in Cognitive Impairment. *Lancet Neurol.* 2011 February ; 10(2): 187-198.

Karam-Hage M, Shah KR, Cincirpini PM. Addition of bupropion SR to varenicline alleviated depression and suicidal ideation: A case report. *Prim Care Companion to J Clin Psychiatry.* 2010; 12(2): PCC09100800.

Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M. & Tohyama, M. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nature Cell Biol.* 1, 479-485.

Katzman, R. Alzheimer's disease. *New England Journal Medicine*, London, v.314, p. 964-973, dec. 1986.

Kihara T, et al Stimulation of $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors inhibits β -amyloid toxicity. *Brain Research* 792:331-334. 1998.

Kirischuk S, Voitenko N, Kostyuk P, Verkhratsky A. (1996). Age-associated changes of cytoplasmic calcium homeostasis in cerebellar granule neurons in situ: investigation on thin cerebellar slices. *Exp Gerontol.* 1996 Jul-Aug;31(4):475-87.

Kitagawa H, Takenouchi T, Azuma R, et al. Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. *Neuropsychopharmacol* 2003; 28: 542-51.

Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba. *Lancet* 1992 nov; 340(8828): 1136-9.

Kovacs D.M., Fausett H.J., Page K.J., Kim T.W., Moir R.D., Merriam D.E., Hollister R.D., Hallmark O.G., Mancini R., Felsenstein K.M., Hyman B.T., Tanzi R.E., Wasco W. (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med.* 2, 224-9.

KrukM, Tendera K, Biala G:Memory-related effects of cholinergic receptor ligands in mice as measured by the elevated plus maze test. *Pharmacol Rep*, 2011, 63, 1372–1382.

Laks, J. *Revista Brasileira de Neurologia* 1997;33(4):201-6.

Larson, EB.(2008). Physical activity for older adults at risk for alzheimer disease. *JAMA* 300:1077-1079.

Lautenschlager NT, Cox K, Cyarto EV (2012) The influence of exercise on brain aging and dementia. *Biochim Biophys Ata* 1822:474-481.

Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol.* 2010 Jun;223(2):267-81. 23. Hooper C, Lovestone S, Sainz-Fuertes R. Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers. *Biomark Insights.* 2008 May 27;3:317-323.

Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.

Lee, P.N. - Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence. *Neuroepidemiology* 13:131-44, 1994.

Leibing, A. - Antropologia de uma doença orgânica: doença de Alzheimer e fatores culturais. In: *Cadernos IPUB, Instituto de Psiquiatria da UFRJ (Ed.): Envelhecimento e Saúde Mental - Uma Aproximação Multidisciplinar*, 1997;10:157-74.

Levin ED, Rezvani AH. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol.* 2000;393(1-3):141-6.

Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 1998;138:217-230.

Levy JH (1996) The human inflammatory response. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:S31-S37.

Li G, Higdon R, Kukull WA, et al. Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology* 2004;63:1624-1628.

Liberto CM et al (2004) Pro-regenerative properties of citocyne-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.

Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British journal of pharmacology*. 141:746-754. 2004.

London, E. D., Bal, M., Waller, B. Nicotine binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer dementia. *Neurochem Res*. 1989. 14:745.

Luo Y, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb 761. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 sep; 99(19): 12197-202.

Luzardo, Adriana Remião; Gorini, Maria Isabel Pinto Coelho; Silva, Ana Paula Scheffer da. Características de idosos com doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um serviço de neurogeriatria. *Texto & Contexto Enfermagem*, Florianópolis, v. 15, n. 04, p. 587-94, out./dez. 2006.

Mackinnon, A.; Mulligan, R. - Combining cognitive testing and informant report to increase accuracy in screening for dementia. *Am J Psychiatry* 1998;155:1529-35.

Maelicke A, Albuquerque EX. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 2000;393(1-3):165-70.

Maelicke, A.; Samochocki, M.; Jostock, R.; Fehrenbacher, A.; Ludwig, J.; Albuquerque, E. X.; Zerlin, M.; *Biol. Psych*. 2001, 49, 279.

Maelicke, A.; Schrattenholz, A.; Samochocki, M.; Radina, M.; Albuquerque, E. X.; *Behavioural Brain Res*. 2000, 113, 199.

Malysz J, Anderson DJ, Gronlien JH, Ji J, et al. In vitro pharmacological characterization of a novel selective alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-107. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (SFN); October 17-21, 2009; Chicago, Ill.

Manhães AC1, Paes-Branco D, Caparelli-Dáquer EM, Nunes F, Krahe TE, Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC. (2014) Ontogenetic analysis of behavior in the tail suspension test: temporal differences in the emergence of within- and between-session habituation in Swiss mice. *Dev Psychobiol*. 2014 May;56(4):850-6. doi: 10.1002/dev.21158. Epub 2013 Sep 4.

Maria de Fátima Oliveira, Marlene Ribeiro, Raquel Borges & Sónia Luginger. *Doença de Alzheimer - Perfil neuropsicológico e tratamento*. 2005.

Marinho, V.; Laks, J.; Engelhardt, E. - Aspectos neuropsiquiátricos das demências degenerativas não-Alzheimer. *Revista Brasileira de Neuropsicologia* 1997;33(1):31-7.

Marta Kruk-Slomka, Barbara Budzyńska, Grazyna Biala; Involvement of cholinergic receptors in the different stages of memory measured in the modified elevated plus maze test in mice. *Pharmacological Reports* 2012, 64, 1066.1080

- Martin Se, De Fiebre Ne, And De Fiebre Cm The 7 nicotinic acetylcholine receptor-selective antagonist, methyllycaconitine, partially protects against -amyloid1-42 toxicity in primary neuron-enriched cultures. *Brain Research* 1022:254-256. 2004.
- Martin Citron. (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 387-398.
- McGauch, J. L. (2003). *Memory and emotion: The making lasting memories*. London: Weidenfeld & Nicolson.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI and Masters CL (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46(6): 860-866.
- mediators of inflammation in the Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14:S47-53.
- Mesulam MM, Asuncion Moran M. Cholinesterases within neurofibrillary tangles related to age and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1987 Aug;22(2):223-8.
- Mesulam MM. Aging, Alzheimer's disease, and dementia. In: Mesulam MM (ed.). *Principles of behavioral and cognitive neurology*. New York: Oxford University Press, 2000. p. 439-522.
- Mielke J. G. and Mealing G. a. R. (2009) Cellular distribution of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in rat hippocampus. *Neurosci. Res.* 65, 296–306.
- Misztal, M.; Frankiewicz, T.; Parsons, C.G. et al. - Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid-protection by MK-801 and memantine. *Eur J Pharmacol* 1996;296(1):1-8.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol.* 1965; 12: 88-118.
- Morgan, D.; Diamond, D.M.; Gottschall, P.E.; et al. - A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408(6815):982-5.
- Morris MC, Evans DA, Bienas JL. Consumption of fish and 3-n fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:940-6.
- Morris R. G., Garrud P., Rawlins J. N., O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study*. *JAMA* 2000;283:1007-1015.
- Mumby DG. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res.* 2001 Dec 14;127(1-2):159-81.

Murray MD, Lane KA, Gao S, Evans RM, Unverzagt FW, Hall KS, et al. Preservation of cognitive function with antihypertensive medications. A longitudinal analysis of a communitybased sample of African Americans. *Arch Intern Med* 2002;162:2090-6.

Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY (2002) Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110, 199-211.

Nai Q, McIntosh JM, Margiotta JF (2003) Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Mol Pharmacol* 63:311-324.

Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.

Nelson PT, Head E, Schmitt FA, Davis PR, Neltner JH, Jicha GA, et al. Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol.* 2011 May;121(5):571-87.

Nelson, C.; Wengreen, H.J.; Munger, R.G.; Corcoran, C.D. Dietary folate, vitamin B-12, vitamin B-6 and incident Alzheimer's disease: The Cache County memory, health and aging study. *J Nutr Health Aging*, v. 13, p. 899-905, 2009.

Newhouse, P., Sunderland, T., Tariot, P. et al. Intravenous nicotine in Alzheimer's disease: a pilot study. *Psychopharmacol.* 1988. 95:171.

Newhouse, P.A. Alzheimer's disease and the cholinergic system: an introduction to clinical pharmacological research. Washington D.C.: American Psychiatry Press, 1997.

Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)-[11C]-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:21-27.

Nordberg A. Molecular imaging in Alzheimer's disease: new perspectives on biomarkers for early diagnosis and drug development. *Alzheimers Res Ther.* 2011 Dec 2;3(6):34.

Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry.* 2001;49:200-210.

Nordberg, A. - New targets for Alzheimer therapy. In: Iqbal K, Winblad B. (ed.) *Alzheimer's Disease and Related Disorders: Research Advances*. Bucharest, Romania: Ana Aslan International Academy of Aging 2003, pp.499-512.

Nordberg, A. et al. Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, Oslo, v.85, p.54-58, June 1992.

Nyth AL, Gottfries CG. The clinical efficacy of citalopram in treatment of emotional disturbance in dementia disorders. A nordic multicentre study. *Br J Psychiatry* 1990;157:894-901.

Obach,RS, Reed-Hagen,AE, Krueger,SS, Obach,BJ, O'Connell,TN, Zandi,KS, Miller,S, e Coe,JW. Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2006a; 34: 121-130.

Obach,RS, Reed-Hagen,AE, Krueger,SS, Obach,BJ, O'Connell,TN, Zandi,KS, Miller,S, e Coe,JW. Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2006b; 34: 121-130.

Olin, J.T.; Schneider, L.S.; Kats, I.R.; Meyers, B.S.; Alexopoulos, G.S.; et al. - Provisional Diagnostic Criteria for Depression in Alzheimer's Disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry* 10: 125-8, 2002.

Olton, D. S., & Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17, 669-682.

Orestes V. Forlenza. Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease. *Rev. Psiqu. Clín.* 32 (3); 137-148, 2005.

Ott A, Slooter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Witteman JC, van Broeckhoven C, et al. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* 1998;351:1840-3.

Pabreza,LA, Dhawan,S, e Kellar,KJ. [3H]cytisine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain. *Mol.Pharmacol.* 1991; 39: 9-12.

Pamplona FA, Pandolfo P, Duarte FS, Takahashi RN, Prediger RD. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid beta (A β 1-40) peptide-treated mice. *Behav Brain Res.* 2010 Sep 1;212(1):96-102. doi: 10.1016/j.bbr.2010.03.052. Epub 2010 Apr 2.

Papaléo Netto, M.; Brito, F. C. Urgências em geriatria: epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e controle terapêutico. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.23-24.

Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci.* 2004;11(5):456-67.

Parsons, C.G.; Gruner, R.; Rozental, J. et al. - Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology* 1993;32(12):1337-50.

Paschen W. (2001) Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium* 29, 1-11.

Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RDS, Silva KABS, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB (2010) Involvement of phosphoinositide 3-kinase c in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by b-amyloid 1–40 peptide in mice. *Brain Behav Immun* 24:493-501.

Patrizia Russo, Alessandra Del Bufalo, Alessandra Frustaci, Massimo Fini and Alfredo Cesario. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors for Treating Alzheimer's Disease: a7-nAChR Agonists in Human Clinical Trials. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20, 000-000.

Patterson F, Jepson C, Strasser AA, Loughead J, Perkins KA, Gur RC, Frey JM, Siegel S, Lerman C: Varenicline improves mood and cognition during smoking abstinence. *Biol Psychiatry* 2009;65:144-149.

Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(9):3033-6.

Petersen, R. C.; Doody, R.; Kurz, A.; et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, v. 58, n. 12, p.1985-92, 2001.

Pettit DL, Shao Z, Yakel JL (2001) beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 21, RC120.

Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, De Bem AF, Prediger RDS, Tasca CI (2010) Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp neurol* 226:274-284.

Polito A, Reynolds R(2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207:707-716.

Pollard H.B., Arispe N., Rojas E. (1995) Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol.* 15, 513-26.

Porsolt, R. D. Animal models of depression: utility for transgenic

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test

Prediger RDS, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo, CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL. Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res* 2007; 177:205-213.

Puma, C., O. Deschaux, et al. Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, v.9, n.4, Jun, p.323-7. 1999.

Qizilbash N, Whitehead A, Higgins J, et al. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. *JAMA*1998;- 280:1777-1782.

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362(4):329-44.

Querfurth HW1, Selkoe DJ. Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry.* 1994 Apr 19;33(15):4550-61.

Raybuck JD, Portugal GS, Lerman C, Gould TJ. Varenicline ameliorates nicotine withdrawal-induced learning deficits in C57BL/6 mice. *Behav Neurosci.* 2008;122:1166-1171.

Reifler BV, Teri L, Raskind M, Veith R, Barnes R, White E, et al. Double-blind trial of imipramine in Alzheimer's disease patients with and without depression. *Am J Psychiatry*. 1989;146(1):45-9.

Reisberg B, Doody R, Stöffler A, et al. A randomized, placebo-controlled study of memantine, an uncompetitive NMDA antagonist, in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003; 348:1333-1341.

Relatório ADI/Bupa, Demência nas Américas: Custo atual e futuro e prevalência da doença de Alzheimer e outras demências', outubro de 2013". Rep, 2009, 61, 236-244. research. *Reviews in the Neurosciences*, v.11, n.1, p.53-8, 2000.

Rezvani AH, Kholdebarin E, Brucato FH, Callahan PM, Lowe DA and Levin ED (2009) Effect of R3487/MEM3454, a novel nicotinic alpha7 receptor partial agonist and 5-HT3 antagonist on sustained attention in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:269-275.

RIGGS, J.E. - Smoking and Alzheimer's disease: protective effect or differential survival bias? *Lancet* 342:793-4, 1995.

Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, et al. Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 2006;6:246-54.

Roger SI, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT, the Donepezil Study Group. A 24-week, double-blind, placebo controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, v.50, p.136-144, 1998.

Rogers SL, Friedhoff LT. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Donepezil Study Group. *Dementia* 1996;7:293-303.

Rollema H, Hajós M, Seymour PA, Kozak R, Majchrzak MJ, Guanowsky V, Horner WE, Chapin DS, Hoffmann WE, Johnson DE, McLean S, Freeman J, Williams KE: Preclinical pharmacology of the alpha4beta2 nAChR partial agonist varenicline related to effects on reward, mood and cognition. *Biochem Pharmacol* 2009;78:813-824.

Rollema, H, Chambers, LK, Coe, JW, Glowa, J, Hurst, RS, Lebel, LA, Lu, Y, Mansbach, RS, Mather, RJ, Rovetti, CC, Sands, SB, Schaeffer, E, Schulz, DW, Tingley, FD, III, E Williams, KE. Pharmacological profile of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. *Neuropharmacology* 2007c; 52: 985-994.

Rozenthal, M.; Engelhardt, E.; Laks, J. - Memória: aspectos funcionais. *Rev Bras Neurol* 1995;31(3):157-60.

Ruiqing Ni, Amelia Marutle and Agneta Nordberga. Modulation of 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Fibrillar Amyloid-Interactions in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of Alzheimer's Disease* 33 (2013) 841-851.

Rusted Jm, Newhouse Pa, And Levin Ed Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behavior Brain Research*. 113:121-129. 2000.

Sahkian, B., Jones, G., Levy, R. et al. The effects of nicotine on attention, information processing and short memory in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brit J Psychiatry*. 1989. 154:797.

Sanson, L.T.; Carobrez, A.P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 101: 59-64, 1999.

Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp Neurol* 233:767–775.

Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp Neurol* 233:767–775.

Sarah Dubrava, Janice Jacobsen. Phase II Crossover Trial of Varenicline in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2014;37:232-245

Schafe, G.E.; Nader, K.; Blair, H.T.; Le Doux, J.E. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci*. 24(9): 540-546, 2001.

Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W. et al. - Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP. *Nature* 1999;400(6740):173-7.

Seni, L. - Genética molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Psiq Biol* 4(1):35-50, 1996.

Seong Yoon Kim, Seong Hye Choi, Hans Rollema, Elias M. Schwam, Tom McRae, Serafim KR, Kishi M, Canto-de-Souza A, Mattioli R: L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43, 100–106.

Sereniki, A.; Vital, M. A. B. F. A Doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Revista de Psiquiatria, RS*, v. 30, n.1 Supl, 2008.

Sharma JN, Buchanan WW (1994) Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol* 46:421- 433.

Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 2009 30: 673-80.

Sheng, M.; Sabatini, B. L.; Sudhof, T. C. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 5, p. a005777, 2012.

Shröder, H.; Wevers, A. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Review*, London, v.3, p. 20-27, oct. 1998.

Silva, R. H.; Frussa-Filho, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *J Journal of Neuroscience Methods*, v. 102, n. 2, p. 117-125. 2000.

Smith RC, Lindenmayer JP, Davis JM, Cornwell J, Noth K, Gupta S, et al. Cognitive and antismoking effects of varenicline in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Schizophr Res*. 2009;110(1-3):149-155.

Snedecor GW e Cochran WG, 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ams, Iowa.

Sparks DL, Beach TG, Lukas RJ (1998) Immunohistochemical localization of nicotinic beta2 and alpha4 receptor subunits in normal human brain and individuals with Lewy body and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurosci Lett* 256:151-154.

Stahl, S. M. Guanabara Koogan. *Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro, 2010. WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Aβ oligomers—a decade of discovery. *Journal of neurochemistry*, v. 101, n. 5, p. 1172-1184, 2007.

Steru L., Chermat R., Thierry B. and Simon P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85,367-370.

Steru, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, Berlim, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Kano M, Morishita R (2009) Validation of Aβ₁₋₄₀ administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. *Brain Res*. 1280:137-147.

Taly A, Charon S. 7 nicotinic acetylcholine receptors: a therapeutic target in the structure era. *Curr Drug Targets* 2012; 13 :695-706.

Tariot PN, Schneider L, Katz IR, Mintzer JE, Street J, Copenhaver M, et al. Quetiapine treatment of psychosis associated with dementia: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 2006;14:767-76.

Tariot, P.N.; Farlow, M.R.; Grossberg, G.T. et al. - Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291(3):317-24.

Terry RD. An honorable compromise regarding amyloid in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001;49:684.

Thomas P, Fenech M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007 Jan;22(1):15-33.

Thompson, C. P., Skowronski, J. J., Larsen, S., & Betz, A. (1996). *Autobiographical memory: Remembering what and remembering when*. New York: Erlbaum.

Thomsen MS, Mikkelsen JD. The 7 nicotinic acetylcholine receptor complex: one, two or multiple drug targets? *Curr Drug Targets* 2012, 13: 707-20.

Toyohara J, Hashimoto K. alpha7 Nicotinic Receptor Agonists: Potential Therapeutic Drugs for Treatment of Cognitive Impairments in Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *The Open Med Chem Journ* 2010; 4: 37-56.

Truzzi, A.; Laks, J. Doença de Alzheimer esporádica de início precoce. *Rev. Psiquiatr. Clín.*, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2005.

Tulving, E. (2002). Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53, 1-25.

Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):289-305.

Uteshev VV, Meyer EM, Papke RL. Activation and inhibition of native neuronal alfabungarotoxin-sensitive nicotinic ACh receptors. *Brain Research* 2002; 948: 33-46

Uteshev VV. 7 nicotinic ACh receptors as a ligand-gated source of Ca(2+) ions: the search for a Ca(2+) optimum. *Adv Exp Med Biol* 2012; 740: 603-38.

VanDujin, C.M.; Clayton, D.G.; Chandra, V.; Fratiglioni, L.; Graves, A.B.; Heyman, A. -Interaction between genetic and environmental risk factors for Alzheimer 's disease: a reanalysis of case-control studies. *Genetics Epidemiology*11:539-51, 1994

Vanessa V. dos Santos a, Danúbia B. Santos b, Gilliard Lachc, Ana Lúcia S. Rodrigues a,b, Marcelo Farinaa,b, Thereza C.M. De Limac, Rui Daniel Prediger a,c Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- (A1-40) administration in mice. *Behavioural Brain Research* 244 (2013) 107-115

Veras, R. P., Caldas, C. P., Dantas, S. B., Sancho, L. G., Sicsú, B., da Motta, L. B., & Cardinale, C. Avaliação dos gastos com o cuidado do idoso com síndrome demencial atendido no ambulatório da UNATI/UERJ, 2007.

Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S., Furlan, M., et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*, 2004, 27, 655.

Viel TA, Caetano AL, Albuquerque MS, Araujo MS, Buck HS, et al. (2012) Chronic infusion of amyloid-β peptide and sustained attention altered alpha7 nicotinic receptor density in the rat brain. *Curr Alzheimer Res* 9: 1210-1220.

Viel TA, Lima Caetano A, Nasello AG, Lancelotti CL, Nunes VA, Araujo MS, Buck HS. *Neurobiol Aging*. 2008 Dec;29(12):1805-14. Epub 2007 Jun 14.

Viel, TA et al. Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats. *Neurobiol. Aging.*, v. 29, n. 12, p. 1805-1814, 2008.

Walsh, R. N., Cummins, R. A. 1976. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83, 482-504.

Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000) Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75:1155-1161.

Wang HY, Lee DHS, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000) beta-amyloid(1-42) binds to alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity - Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275, 5626- 5632.

Wei H., Wei W., Bredesen D.E., Perry D.C. (1998) Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. *J Neurochem.* 70, 2305-14.

Wenk, G.L.; Quack, G.; Moebius, H.J. et al. - No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. *Life Sci* 2000;66(12):1079-83.

Whitehouse, P.J. et al. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, London, v.215, p.1237-1239, june 1982.

Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 2005;64:277-81.

Wilson RS, Bennett DA, Bienias JL, Aggarwal NT, Mendes De Leon CF, morris mc, et al. Cognitive activity and incident AD in a population-based sample of older persons. *Neurology* 2002;59:1910-14.

Winblad B, Engedal K, Soininen H, et al. A1- year, randomized, placebo controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD. *Neurology* 2001;57:489-495.

Winters BD1, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008 Jul;32(5):1055-70. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.04.004. Epub 2008 Apr 24.

Winters, B. D. e T. J. Bussey. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci*, v.21, n.8, Apr, p.2263-70. 2005.

World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.

Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, Masliah E, Mucke L (2002) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 7:612-8.

Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 2006 Sep;12(9):1005-15.

Young KM, Merson TD, Sotthibundhu A, Coulson EJ and Bartlett PF (2007) p75 Neurotrophin Receptor Expression Defines a Population of BDNF-Responsive Neurogenic Precursor Cells. *J Neurosci* 27: 5146-5155.

Zamrini E, McGwin G, Roseman JM. Association between statin use and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 2004;23:94-98.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011 Jan 7;4:3.