



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Daniel Rial

Papel da proteína prion celular (PrP^C) em alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento em camundongos.

Florianópolis – SC

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Daniel Rial

Papel da proteína prion celular (PrP^C) em alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento em camundongos.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Florianópolis – SC

2009

“A alma não tem segredo que o comportamento não revele”

(Lao-Tsé)

Dedico este trabalho ao meu pai, que nos deixou na metade da realização deste trabalho, e que foi e é meu grande inspirador intelectual e pessoal, definição da palavra pai, que sonhava e se realizava nas conquistas dos filhos, nunca desistiu, nunca parou de lutar, e em sua batalha nunca perdeu a dignidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademar (*in memoriam*) e Marlisa, por me concederem à vida, e todo amor, carinho, apoio incondicional e ensinamentos exemplares que nunca me faltaram;

A minha amada Elisabete que além de me agüentar, me trata sempre com muito amor e carinho, passou e segurou uma barra pesadíssima comigo no último ano, por quem sou eternamente grato e apaixonado;

Aos meus irmãos (Gustavo, Juliana e Larissa) e sobrinhos (Gabi, Matias, Lú e Julinha), dos quais muito me orgulho, e muito me ensinaram (e ensinam) desde coisas simples do convívio diário a paciência necessária para se lidar com crianças (ainda não levo jeito).

A Tia Nita, fã número um de qualquer conquista pessoal minha, mas crítica e questionadora, além de líder nata, em quem muito me espelho;

A Josi que teve a audácia e a coragem de me presentear com um afilhado maravilhoso. Também agradeço ao Guga por adicionar importantes integrantes a nossa família;

A família da Bete (Luiz, Inês e Ana) que tem se portado também como minha família me dando apoio inquestionável e me ajudando a superar todos os desafios;

Ao Professor Rui, que além de me aceitar em seu laboratório, me ensinou muito além da ciência neste período, sendo um exemplo de ser humano, orientador, colega e tenista.

Aos Professores Leandro Bertoglio e Roger Walz, pela ajuda e paciência para sanar as dúvidas e amenizar as insanidades deste aluno;

Ao Professor Reinaldo por me aceitar como aluno de seu laboratório, com quem muito aprendi e pela contribuição dada ao presente trabalho, assim como em outros trabalhos paralelos a este.

A Professora Gina pelos ensinamentos e indicações de como se deve escrever um manuscrito.

Aos demais Professores do Departamento de Farmacologia que me ensinam a cada encontro algo novo e para mim previamente inimaginável;

A Professora Vilma R. Martins (Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, SP), por gentilmente ceder os animais, os peptídeos, mas acima de tudo pela valorosa contribuição crítica ao trabalho;

Ao Professor Alcir L. Dafré (Depto. Ciências Fisiológicas, UFSC) e sua aluna Ariana, pela ajuda e prontidão nas dosagens de acetilcolinesterase.

Ao Professor José Eduardo da Silva Santos por ter me iniciado ao pensamento questionador científico e pelo apoio incondicional as minhas intenções acadêmicas.

Aos colegas e amigos dos laboratórios Aderbal, Sandro, Eduardo, Adalba, Marcelão, Mariana, Nelsão, Xikota, Pablo, Rafael Mariano, Pamplona, Assini, Cris, Rafael Crespo, Cris

Stern e Carol pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e troca de informações;

Ao colega do Departamento Filipe S. Duarte pelas várias ajudas nas administrações i.c.v. além das aulas de humildade e paciência;

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL.....	1
1.2 NEUROFISIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO.....	2
1.3 MODULAÇÃO DOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSÃO PELO ENVELHECIMENTO	4
1.4 FATORES GENÉTICOS NO CONTROLE DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO	5
1.5 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP ^C)	9
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL GERAL.....	19
3.2 MODELO ANIMAL.....	19
3.2.1 Animais geneticamente modificados	20
3.2.2 Tratamento Farmacológico	21
3.3 MODELOS COMPORTAMENTAIS	21
3.3.1 Teste do campo aberto	21
3.3.2 Teste da caixa de atividade	22
3.3.3 Teste do labirinto em cruz elevado	22
3.3.4 Teste de reconhecimento social	23
3.3.5 Teste de sensibilidade ao choque	24
3.3.6 Teste de esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	24
3.4 OBTENÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO.....	25
3.5 ENSAIO PARA DOSAGEM SÉRICA DE ACETILCOLINESTERASE.....	26
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
3.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>Prnp</i> E EXPRESSÃO DE PrP ^C NOS ANIMAIS DO ESTUDO...	28

4. RESULTADOS	28
4.1 OBSERVAÇÃO VISUAL DOS ANIMAIS DE ESTUDO.....	28
4.2 CAMPO ABERTO	29
4.3 CAIXA DE ATIVIDADE	30
4.4 LABIRINTO EM CRUZ-ELEVADO	32
4.5 TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL	34
4.6 SENSIBILIDADE AO CHOQUE	36
4.7 ESQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO <i>STEP-DOWN</i>	36
4.8 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ACHE	37
4.9 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE SINAPTOFISINA.....	38
4.10 MORTE CELULAR APOPTÓTICA (CASPASE-3).	40
5. DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIACOES

AChE	Acetilcolinesterase
APO-E	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amilóide
COX-2	Ciclooxigenase-2
DA	Doença de Alzheimer
DCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ditiobisnitrobenzoato
ECA	Enzima de conversão da angiotensina I
EEB	Encefalite espongiforme bovina
EEF	Encefalite espongiforme felina
EI	Esquiva inibitória
ERO	Espécies reativas de oxigênio
fDCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob familiar
IFF	Insônia familiar fatal
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
iDCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob iatrogênica
KA	Ácido Caínico
kDa	KiloDalton
LN	Laminina
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

mM	Milimolar
Neo	Neomicina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PGE-2	Prostaglandina-E2
PKA	Proteína Cinase dependente de AMP cíclico
<i>PRNP</i>	Gene que codifica a proteína prion celular em humanos
<i>Prnp</i>	Gene que codifica a proteína prion celular em camundongos
PrP^C	Proteína Prion Celular
PrP^{Sc}	Proteína Prion infectante
PSEN	Presenelina
sDCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob esporádica
SORL	Receptor associado à Sortilina
STI1	Proteína induzida pelo estresse 1
TNB	ácido 5-tio-2-nitro-benzoico
TSE	Encefalopatas Espongiformes Transmissíveis
vDCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob variante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipóteses da inter-relação do estresse oxidativo e reparo de DNA no processo de envelhecimento	3
Figura 2 - Comparação do tecido cerebral de um paciente com doença priônica e um indivíduo sadio	9
Figura 3 - Hipótese da conversão da PrP ^C na sua forma infectante.....	10
Figura 4 - Estrutura tridimensional da PrP ^C	12
Figura 5 - Mecanismos de síntese, interação e degradação da PrP ^C	13
Figura 6 - Filtro de expressão gênica para PrP ^C em cortes sagital e coronal do cérebro e do bulbo olfatório de camundongos.....	14
Figura 7 - Esquema com o desenho experimental geral.	19
Figura 8 - Observação visual de animias de 3 e 11 meses de idade das linhagens Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.	29
Figura 9 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a locomoção no campo aberto de 5 minutos em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade.	30
Figura 10 -Efeitos da idade e do genótipo sobre a locomoção na caixa de atividade avaliada em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade.....	31
Figura 11 -Relação da densidade de expressão da PrP ^C pela atividade locomotora horizontal.....	32
Figura 12 -Efeitos da idade e do genótipo sobre as respostas relacionadas à ansiedade em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade	33
Figura 13 -Efeitos da idade e do genótipo sobre o tempo de investigação dos camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20	35
Figura 14- Influência do genótipo sobre a sensibilidade ao choque nas linhagens Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.....	36
Figura 15 -Efeitos da idade e do genótipo sobre a retenção de memória de longo prazo (24 h) na tarefa de esquiiva inibitória do tipo step-down em camundongos de 3 e 11 meses de idade das linhagens Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.	37
Figura 16 -Efeitos da idade e do genótipo sobre a concentração sérica de AChE em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.....	38
Figura 17 -Efeitos da idade e do genótipo sobre a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.....	39

Figura 18 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a ativação da proteína pró-apoptótica caspase-3 em camundongos Prnp ^{+/+} , Prnp ^{0/0} e Tg-20.....	41
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais genes e achados relacionados ao envelhecimento.....	6
Tabela 2 - Principais doenças priônicas, espécies hospedeiras e mecanismos patogênicos característicos.....	11

Resumo

A proteína prion celular (PrP^C) é uma glicoproteína ancorada aos neurônios que tem sido associada a diversas funções no sistema nervoso central (SNC) como: neuroplasticidade, formação de placas senis e controle de mecanismos de estresse oxidativo. O processo de envelhecimento é um estado frequentemente acompanhado por um declínio em diversos aspectos sensorimotores e cognitivos. No presente estudo, investigamos o envolvimento da PrP^C em alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao envelhecimento em camundongos selvagens (wild-type) (Prnp^{+/+}), nocautes para PrP^C (Prnp^{0/0}) e camundongos que apresentam expressão aumentada de PrP^C (Tg-20). Os animais destas linhagens com 3 ou 11 meses de idade foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais incluindo os testes do campo aberto, caixa de atividade, labirinto em cruz elevado, memória social e a esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO *step-down*. Camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} de 11 meses de idade exibiram prejuízos na atividade locomotora e na capacidade de reconhecer um camundongo jovem após um curto período de tempo assim como aumento nas respostas relacionadas à ansiedade. De forma interessante, camundongos Tg-20 não apresentaram os mesmos prejuízos comportamentais relacionados à idade e a infusão intracerebroventricular do peptídeo 230-245 da STI1, que inclui a porção de ligação a PrP^C, reverteu estes distúrbios de memória de curto prazo relacionados a idade em camundongos Prnp^{+/+}. Camundongos Tg-20 também exibiram níveis reduzidos de acetilcolinesterase sérica em comparação com os outros dois genótipos. Análises de imunohistoquímica revelaram expressão aumentada de proteínas hipocâmpais associadas à morte celular apoptótica e de plasticidade neuronal, respectivamente, caspase-3 e sinaptofisina, em camundongos Tg-20. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese da PrP^C apresentar papel neuroprotetor e sugerem o seu envolvimento em algumas alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao

envelhecimento via sistema colinérgico e modulação da sinaptogênese e morte celular apoptótica.

Abstract

The cellular prion protein (PrP^C) is a neuronal anchored glycoprotein that has been associated with distinct functions in the CNS such as neuroplasticity, cognitive processes and senile plaques formation. Aging process is a state often accompanied by a decline in several aspects of sensorimotor and cognitive functions. Here we investigated the involvement of PrP^C in the age-related behavioral and neurochemical alterations in wild-type (Prnp^{+/+}), PrP^C knockout (Prnp^{0/0}) and the PrP^C overexpressing Tg-20 mice. Animals of these mouse strains with 3 or 11 months-old were submitted to a battery of behavioral tasks including the open field, activity cage, elevated plus-maze, social recognition and inhibitory avoidance tasks. The 11 month-old Prnp^{+/+} and Prnp^{0/0} mice exhibited significant impairments in their locomotor activity and in their ability to recognize a juvenile after a short period of time as well as increase in anxiety-related responses. Remarkably, Tg-20 mice did not present these age-related behavioral impairments and the intracerebroventricular infusion of STII peptide 230–245, which includes the PrP^C binding site, improved these age-related short-term social memory deficits in Prnp^{+/+}. Tg-20 mice also exhibited reduced levels of seric acetylcholinesterase levels in comparison with the two other genotypes (regarding the age). Immunohistochemical analysis revealed an increased expression of the hippocampal proteins associated to apoptotic cell death and synaptic changes, respectively, caspase-3 and synaptophysin in Tg-20 mice. The present results support the neuroprotective hypothesis of PrP^C and suggest its pivotal role in age-related behavioral and neurochemical alterations *via* cholinergic system and the modulation of synaptogenesis and apoptotic cell death.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento Populacional

Estudos sobre o envelhecimento populacional apontam para a realidade de que o homem está vivendo mais, e a longevidade sem dúvida é uma das características do nosso tempo. Este fato pode ser comprovado pela observação de que em um século a média de idade aumentou consideravelmente, impondo à sociedade uma profunda mudança, em relação, principalmente, à qualidade de vida desta população (OPAS/OMS, 2002). O envelhecimento populacional é uma realidade atual em diferentes países. A Organização das Nações Unidas (ONU) considera o período entre 1975 a 2025 como a “Era do Envelhecimento”, na qual haverá um crescimento de 54% da população idosa nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento este número alcançará 123% (OPAS/OMS, 2002). Mudanças significativas aconteceram no final do século passado associadas à fecundidade, a melhora nos cuidados de saúde e a mudanças demográficas e epidemiológicas. A população mundial está envelhecendo e este fenômeno também pode ser constatado em nosso país (Chaimowicz, 1997). O Brasil é um país cuja população envelhece rapidamente. Houve um aumento na expectativa de vida, que no início do século 20 era de 33 anos, mas segundo o IBGE, em 2004 a esperança de vida ao nascer (expectativa de vida) dos brasileiros alcançou 71,7 anos. Associada a esta condição, a diminuição da fecundidade entre 1960 e 1980 foi de 30%, o que conduz a um incremento proporcional da população idosa. Com isto a população acima dos 60 anos aumentou em quase 4 milhões de pessoas (IBGE, 2004). Apesar dos avanços, os dados do Brasil no ranking da ONU indicam a 82ª posição na expectativa de vida ao nascer, enquanto o Japão apresenta os maiores índices, com 81,9 anos. No contexto regional neste quesito o Brasil apresenta-se abaixo de países como Costa Rica, Chile, Cuba, Porto Rico, Panamá, Argentina, entre outros. Na região temos com índices

inferiores aos do Brasil países como Paraguai, Jamaica, Peru, Nicarágua, República Dominicana e Bolívia (Kalache e Keller, 2000).

Este ganho na expectativa de vida é atribuído à melhora no acesso da população aos serviços de saúde, campanhas nacionais de vacinação, aumento do nível de escolaridade e investimentos na infra-estrutura de saneamento básico, entre outros. Este contexto relacionado ao processo do envelhecimento nos últimos anos tem provocado um aumento no desenvolvimento de pesquisas focadas nessa temática (Kay, Henderson *et al.*, 1985; Griffiths, Good *et al.*, 1987).

1.2 Neurofisiologia do envelhecimento

Concomitante ao envelhecimento populacional, algumas patologias de maior prevalência nestes indivíduos como as doenças de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) emergem. O envelhecimento por si, mesmo sem as mencionadas patologias, traz perceptíveis deficiências locomotoras e cognitivas em humanos (Andrews-Hanna, Snyder *et al.*, 2007; Mattay, Goldberg *et al.*, 2008). De fato a similaridade molecular e comportamental entre o processo de envelhecimento e as patologias associadas à idade por vezes se confundem, sendo alvo de questionamentos sobre se determinada patologia é parte da senilidade ou vice-versa (Swerdlow, 2007).

Em estudo recente Lynch e colaboradores (2006) identificaram alterações eletrofisiológicas fundamentais em células senescentes, de certa forma justificando as diferenças cognitivas apresentadas nesta fase da vida.

Durante o metabolismo basal das células existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (ERRO) acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de mecanismos antioxidantes, com o intuito de manter a integridade celular. As ERO quando em reação com outras biomoléculas, causam diferentes tipos de danos celulares podendo levar

Além da deficiência no sistema de controle de estresse oxidativo, durante o processo de envelhecimento vários marcadores inflamatórios como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a prostaglandina-E2 (PGE-2) parecem ter sua expressão aumentada (Wu, Mura *et al.*, 1998; Kim, Park *et al.*, 2008), além de alteração dos processos de migração de vários tipos celulares com função imunológica (Stichel e Luebbert, 2007). Além disso, sabe-se que há uma perda de aproximadamente 10 a 15% das junções sinápticas em cérebros de ratos idosos medidos por microdensitometria (Masliah, Crews *et al.*, 2006)

1.3 Modulação dos sistemas de neurotransmissão pelo envelhecimento

Estudos prévios têm demonstrado que o declínio no processo cognitivo e locomotor relacionado ao envelhecimento, verificado em humanos e roedores, está associado, ao menos em parte, a degeneração de neurônios colinérgicos (Bartus, Dean *et al.*, 1982; Altavista, Rossi *et al.*, 1990; Gallagher e Colombo, 1995; Baxter, Frick *et al.*, 1999). Quanto à participação do sistema colinérgico em processos locomotores, um estudo recente demonstrou que este sistema é importante tanto no desenvolvimento dos motoneurônios como para subsequente ativação dos mesmos e de outros neurônios adjacentes (Myers, Lewcock *et al.*, 2005). Pode-se também observar que o sistema colinérgico está diretamente envolvido nos processos elétricos referentes à ativação da placa motora na junção neuromuscular (Kalamida, Poulas *et al.*, 2007). Algumas patologias como, por exemplo, a miastenia gravis, que se caracteriza por uma degeneração muscular progressiva, tem como principal marcador a suprarregulação do sistema colinérgico (Sieb, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos interfere com o armazenamento de novas informações (aprendizado) (Broks, Preston *et al.*, 1988; Hasselmo e Barkai, 1995; Atri, Sherman *et al.*, 2004). Parece que o mecanismo envolvido neste processo se pronuncia pela supressão da atividade neural

excitatória. Experimentos com fatias de cérebro de ratos têm demonstrado que a adição de agonistas colinérgicos facilitam o processo de potenciação de longo prazo (LTP) em um considerável número de vias necessárias para os processos mnemônicos, incluindo as colaterais de Schaffer, região hipocampal CA1 (Huerta e Lisman, 1993) e fibras de conexão do córtex piriforme (Hasselmo e Barkai, 1995).

Neste sentido, um interessante estudo apresentou evidências convincentes de que a acetilcolinesterase (AChE), importante enzima no processo de degradação da acetilcolina, está diretamente envolvida com a formação de placas amilóides na DA e no próprio processo de envelhecimento (Pera, Roman *et al.*, 2006). Confirmando ainda a importância do sistema colinérgico neste processo, um estudo recente demonstra que há diminuição do número de fibras colinérgicas no hipocampo de ratos velhos, sendo esta região de grande importância para a processos cognitivos (Ypsilanti, Girao Da Cruz *et al.*, 2008).

Por outro lado este sistema não é o único sistema de neurotransmissão afetado pelo envelhecimento. Evidências têm também apontado para alterações nos sistemas glutamatérgico (Jacobson, Zhang *et al.*, 2008), serotoninérgico (Lamar, Cutter *et al.*, 2007), dopaminérgico (Dreher, Meyer-Lindenberg *et al.*, 2008; Rollo, 2008) e noradrenérgico (Almaguer-Melian, Cruz-Aguado *et al.*, 2005).

1.4 Fatores genéticos no controle do processo de envelhecimento

Vários genes têm sido apontados como tendo envolvimento na modulação do envelhecimento (Mattay, Goldberg *et al.*, 2008). São genes com várias outras funções associadas, sendo que fazem parte genes com função no controle do estresse oxidativo, processo inflamatório, associados à demência, genes tróficos e ainda associados a processos cognitivos (ver Tabela 1). Porém, notadamente a maioria destes genes alvos carece de profundo estudo e maior caracterização do seu real papel no envelhecimento. Parece ser

unânime entre os pesquisadores da área, a noção que não há um, mas vários genes envolvidos no controle do envelhecimento, visto que cada função (ou perda desta) está diretamente relacionada a um fenótipo ou característica bioquímica em animais e humanos de idade avançada (Mattson, Duan *et al.*, 2002; Soti e Csermely, 2007; Mattay, Goldberg *et al.*, 2008; Muller, 2009). Deve ser destacado que dentre as diferentes classes de genes associados ao envelhecimento, a maior delas está relacionada ao controle do estresse oxidativo, processo exacerbado na idade avançada como abordado no tópico anterior. A Tabela 1 relaciona alguns destes genes e suas funções características neste processo.

Tabela 1 - Principais genes e achados relacionados ao envelhecimento.

Localização Citogenética		Achados
A. Genes relacionados à demência		Alguns genes, em particular aqueles associados à demência senil, têm sido implicados com os déficits cognitivos relacionados à idade.
APOE (Apolipoproteína E)	Cromossomo 19	O alelo E4 é considerado um “gene frágil”, predispondo ao aumento da susceptibilidade a injúrias e traumas (Smith, Andersen <i>et al.</i> , 2002). O alelo é associado a maiores níveis de declínio relacionado à idade além da maior susceptibilidade a desenvolver a DA.
APP (Proteína precursora amilóide). Presenelina 1 e 2 (PSEN 1 e PSEN 2). SORL 1 (Receptor associado à sortilina)	APP (Cromossomo 21) PSEN 1 (Cromossomo 14) PSEN 2 (Cromossomo 1) SORL 1 (Cromossomo 11)	SORL 1 regula o tráfego da APP em mecanismos de reciclagem. Diminuição da expressão desta proteína resulta em direcionamento da APP para formação da β -amilóide. A forma genética variante da SORL 1 é associada como um fator de risco para o desenvolvimento da DA (Rogaeva, Meng <i>et al.</i> , 2007)
B. Genes associados a doenças sistêmicas ou a função cardiovascular.		Sabe-se que doenças sistêmicas e vasculares são capazes de afetar a cognição, assim a busca por associações entre genes relacionados a doenças cardiovasculares e diferenças em funções cognitivas associadas à idade são justificáveis.
Gene para Enzima de Conversão da Angiotensina-1	Cromossomo 17	A ECA é diretamente relacionada ao controle da pressão arterial. Propôs-se que o polimorfismo para este gene é

		fator de risco para a demência vascular, além do aumento substancial do volume de lesões associadas à substância branca (Henskens, Kroon <i>et al.</i> , 2005)
C. Genes relacionados a apoptose e ao estresse oxidativo		O cérebro é vulnerável ao dano oxidativo provocado pelos radicais livres, devido ao seu elevado metabolismo aeróbio. Por esta razão tem-se relacionado estes genes como contribuintes para o envelhecimento cognitivo.
Telomerase	Cromossomo 3 (TERT) e 5 (não-TERT)	A longevidade é progressivamente diminuída em animais deficientes para telomerase (Blasco, 2005). A superexpressão da mesma enzima é suficiente para estender temporalmente a viabilidade de células humanas em cultura (Shitara, Kakeda <i>et al.</i> , 2008). Evidências sugerem que a atividade e a concentração desta enzima são limitantes para o tempo de vida de células de mamíferos e contribuem para a modulação da renovação tecidual (Shawi e Autexier, 2008).
<i>p53</i>	Cromossomo 17	Proteína pró-apoptótica com intenso papel no controle do envelhecimento celular. Animais nocaute para a referida proteína apresentam envelhecimento precoce além de falhas no desenvolvimento do SNC e de outros órgãos (Tyner, Venkatachalam <i>et al.</i> , 2002)
<i>KLOTHO</i>	Cromossomo 13	O gene para a Klotho é altamente expresso no cérebro. Klotho é uma proteína que tem um papel crítico na regulação de desordens relacionadas à mecanismos antioxidantes (Nagai, Yamada <i>et al.</i> , 2003; Masuda, Chikuda <i>et al.</i> , 2005). Versões mutantes deste mesmo gene têm sido implicadas na longevidade ou no prematuro aparecimento da senilidade (Beckman e Ames, 1998)
Gene relacionado à Prion (<i>PRNP</i>)	Cromossomo 20	O gene <i>PRNP</i> tem sido relacionado à atividade antioxidante. O polimorfismo deste gene tem sido relacionado a processos cognitivos (Criado, Sanchez-Alavez <i>et al.</i>, 2005; Xikota, Rial <i>et al.</i>, 2008) e maior

		susceptibilidade ao desenvolvimento da DA.
Fator de Crescimento relacionado à insulina	Cromossomo 15	Atua em vias importantes para o desenvolvimento neural e uma variação genética desta proteína tem sido ligada à longevidade em ratos (Sonntag, Lynch <i>et al.</i> , 1999)
Superóxido dismutase (SOD)	Cromossomo 6	SOD cataliza radicais superóxido e é uma enzima importante para o controle das defesas antioxidantes. Várias formas da SOD têm sido relacionadas a doenças neurodegenerativas, como a DP, DA, Síndrome de Down e Esclerose lateral amiotrófica (Li, Grupe <i>et al.</i> , 2006).
D. Genes que modulam processos inflamatórios		Citocinas pró-inflamatórias têm sido relacionadas à modulação da atividade neural através da atividade apoptótica, processos neurodegenerativos, modulação da neurotransmissão e respostas neuroendócrinas. Em resposta a estes processos, citocinas podem modular processos cognitivos e têm sido relacionadas a alto risco de incidência da DA (Licastro, Porcellini <i>et al.</i> , 2007)
Interleucina-1 β (IL-1 β) Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) Enzima conversora de Interleucina-1 β (ECI)	IL-1 β (Cromossomo 2) TNF- α (Cromossomo 6) ECI (Cromossomo 11)	Polimorfismos destes três fatores têm sido relacionados com a função cognitiva em pessoas idosas (Baune, Ponath <i>et al.</i> , 2008)
E. Genes associados à variabilidade cognitiva individual.		Em humanos, o polimorfismo de genes relacionados a fatores neurotróficos, neurotransmissores e proteínas receptoras têm sido relacionadas a diferenças cognitivas individuais.
Genes catecolaminérgicos Catecol-O-Metil-transferase	Cromossomo 22	Os polimorfismos de genes monoaminérgicos aparentemente modulam a trajetória do envelhecimento cognitivo (Heinz e Smolka, 2006)
Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	Cromossomo 11	Neurotrofinas, incluindo o BDNF, regulam a sobrevivência neuronal, proliferação e crescimento sináptico do cérebro em desenvolvimento. Evidências sugerem sua participação em mecanismos cognitivos como à potenciação de longo-prazo (LTP) no hipocampo, associado diretamente ao

		aprendizado e a memória (Egan, Kojima <i>et al.</i> , 2003).
<i>KIBRA</i>	Cromossomo 5	Proteína cerebral associada com robusto papel na plasticidade sináptica. É abundantemente expressa em regiões cerebrais associadas à memória (Papassotiropoulos, Stephan <i>et al.</i> , 2006)

1.5 Proteína prion celular (PrP^C)

O interesse inicial acerca da proteína priônica aconteceu pela descoberta desta proteína estar associada a algumas doenças que até então possuíam etiologia desconhecida (Bolton, Mckinley *et al.*, 1982; Diener, Mckinley *et al.*, 1982; Prusiner, 1982b; a). Doenças priônicas são patologias relacionadas à conversão da proteína prion celular (PrP^C) em sua forma dita infectante (PrP^{Sc}). Acredita-se que o dobramento incorreto desta proteína dê início a processos de lesão tecidual cerebral. Estas lesões nomeiam-se encefalites espongiformes, justo pelo aspecto de esponja conferido ao tecido (Figura 2).

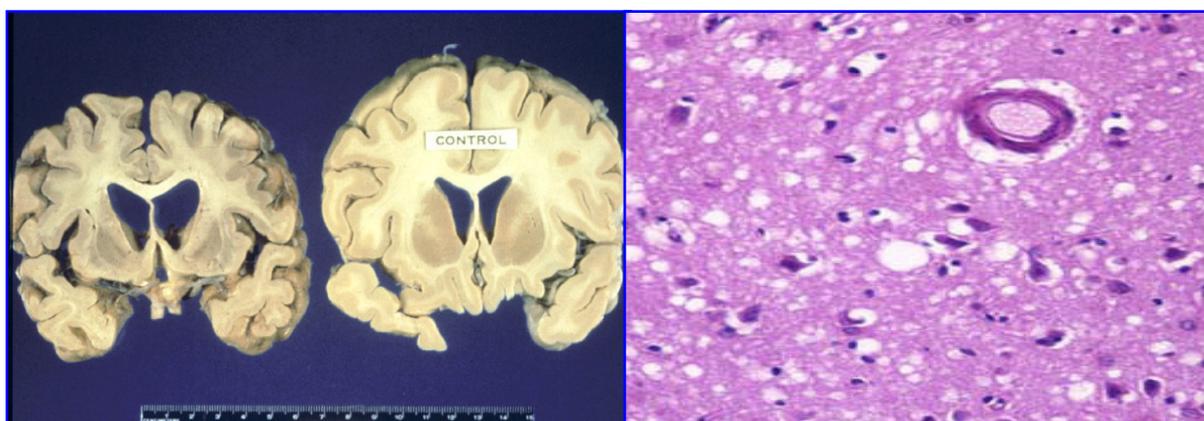


Figura 2 - Comparação do tecido cerebral de um paciente com doença priônica e um indivíduo sadio. Achados histológicos (vacúolos) em tecido cerebral de paciente com doença priônica. Figura extraída de (Paquet, Privat *et al.*, 2008)

Na conversão da PrP^C à PrP^{Sc}, a estrutura passa a exibir suas porções α -hélices transformadas e redobradas em porções β -pregueadas. (Pan, Baldwin *et al.*, 1993). Esta transição estrutural é acompanhada por profundas alterações das propriedades físico-químicas da PrP^C. Uma importante característica alterada nesta conversão é a resistência à proteinase

K, fazendo com que se acumulem unidades de PrP^{Sc} nos tecidos atingidos gerando seu colapso (Bolton, Mckinley *et al.*, 1982). Estudos têm mostrado que a PrP^{Sc} atua na verdade como um molde para outras PrP^Cs remoldando-as em novas sementes da forma infectante (Borchelt, Scott *et al.*, 1990; Caughey, Kocisko *et al.*, 1995) (Figura 3).

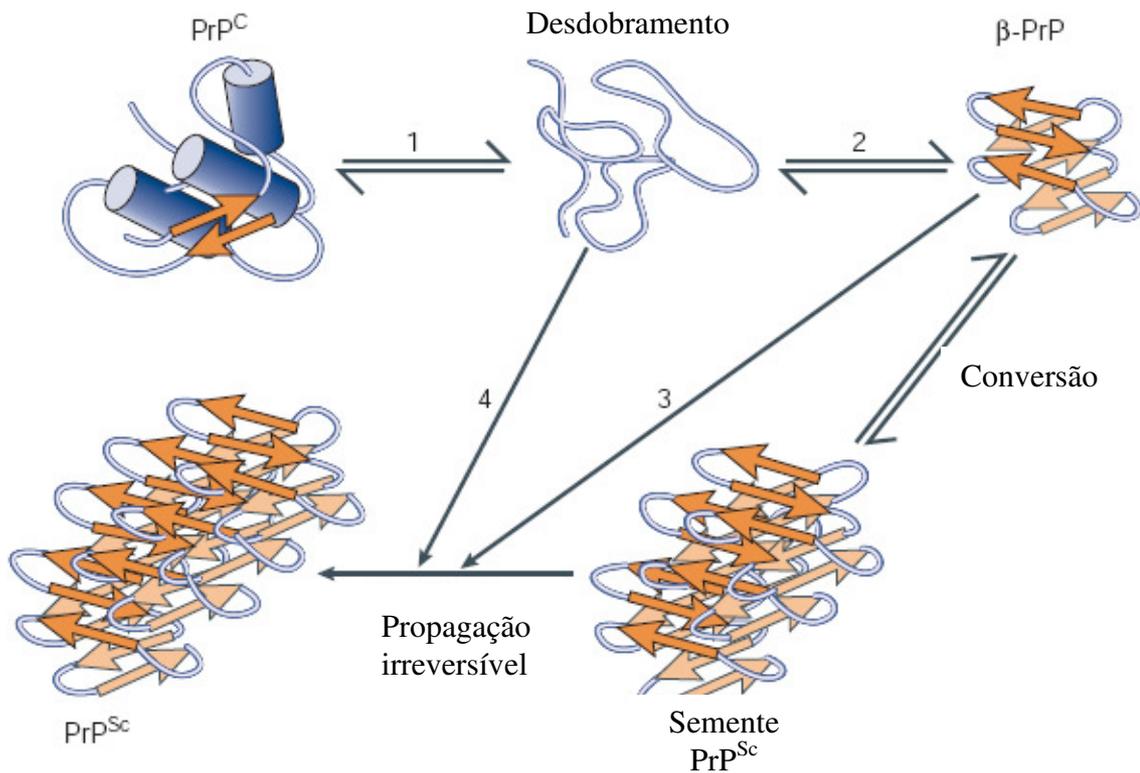


Figura 3 - Hipótese da conversão da PrP^C na sua forma infectante. Modificado de Mallucci (2005).

Os dados decisivos para determinar a participação e a necessidade da PrP^C no processo patológico foi a observação de que animais nocautes para a PrP^C são resistentes a infecção direta pela PrP^{Sc}, mostrando que em determinadas condições (sejam genéticas ou induzidas) seu mal dobramento é essencial à neurotoxicidade (Bueler, Aguzzi *et al.*, 1993). De forma interessante a infecção pela PrP^{Sc} não se mostra inerente a determinada espécie demonstrando estar presente além de em humanos em vários outros animais, como bovinos, caprinos, aves e roedores (Prusiner, Scott *et al.*, 1998).

Diversas doenças priônicas com diferentes etiologias foram previamente caracterizadas como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais doenças priônicas, espécies hospedeiras e mecanismos patogênicos característicos.

Doença	Hospedeiro	Mecanismos patogênicos
Kuru	Humanos	Infecção por rituais canibalísticos
iDCJ	Humanos	Infecção por hormônio do crescimento contaminado
vDCJ	Humanos	Infecção por prions bovinos
fDCJ	Humanos	Mutações do gene para prion relacionadas a germes
GSS	Humanos	Mutações do gene para prion relacionadas a germes
FFI	Humanos	Mutações do gene para prion relacionadas a germes
sDCJ	Humanos	Mutação com conversão espontânea de PrP ^C à PrP ^{Sc}
Scrapie	Cabras	Mutações em animais geneticamente susceptíveis
EEB	Bovinos	Ração contaminada
FSE	Felinos	Alimentos contaminados com PrP ^{Sc}

Após os estudos envolvendo as doenças priônicas, caracterizando sua participação fundamental no processo patogênico, muitos esforços também têm sido empregados para determinação da função fisiológica da PrP^C.

A PrP^C é uma glicoproteína abundantemente encontrada em neurônios e glia, muito conservada entre as espécies sugerindo ter uma função celular importante (Prusiner, 1991). Os genes que codificam a PrP^C do homem, hamster, camundongo, rato, cabra e galinha já foram sequenciados há pelo menos uma década (Basler, Oesch *et al.*, 1986; Kretzschmar, Stowring *et al.*, 1986; Loch, Chesebro *et al.*, 1986; Liao, Tokes *et al.*, 1987; Westaway, Goodman *et al.*, 1987; Harris, Falls *et al.*, 1991) e sua estrutura desvendada e pormenorizada (Kuwata, Nishida *et al.*, 2007) (Figura 4). O gene da PrP^C humano é denominado de *PRNP* e o de camundongo *Prnp*. Todos codificam proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, e 27 kDa com um peptídeo sinalizador de 22 aminoácidos na extremidade amino-terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 aminoácidos na porção carboxi-terminal.



Figura 4 - Estrutura tridimensional da PrP^C (Kuwata, Nishida *et al.*, 2007).

Na membrana plasmática, evidenciou-se que a PrP^C se encontra em microdomínios ricos em colesterol, denominados *rafts* (Keshet, Bar-Peled *et al.*, 2000). Entretanto, a PrP^C pode também ser encontrada em outras organelas celulares como o complexo de Golgi, endossomos de reciclagem (Lee, Magalhaes *et al.*, 2001) ou no compartimento citoplasmático uma vez que esta sofre ubiquitinação e degradação pelo sistema de proteassoma (Ma e Lindquist, 2001) (Figura 5).

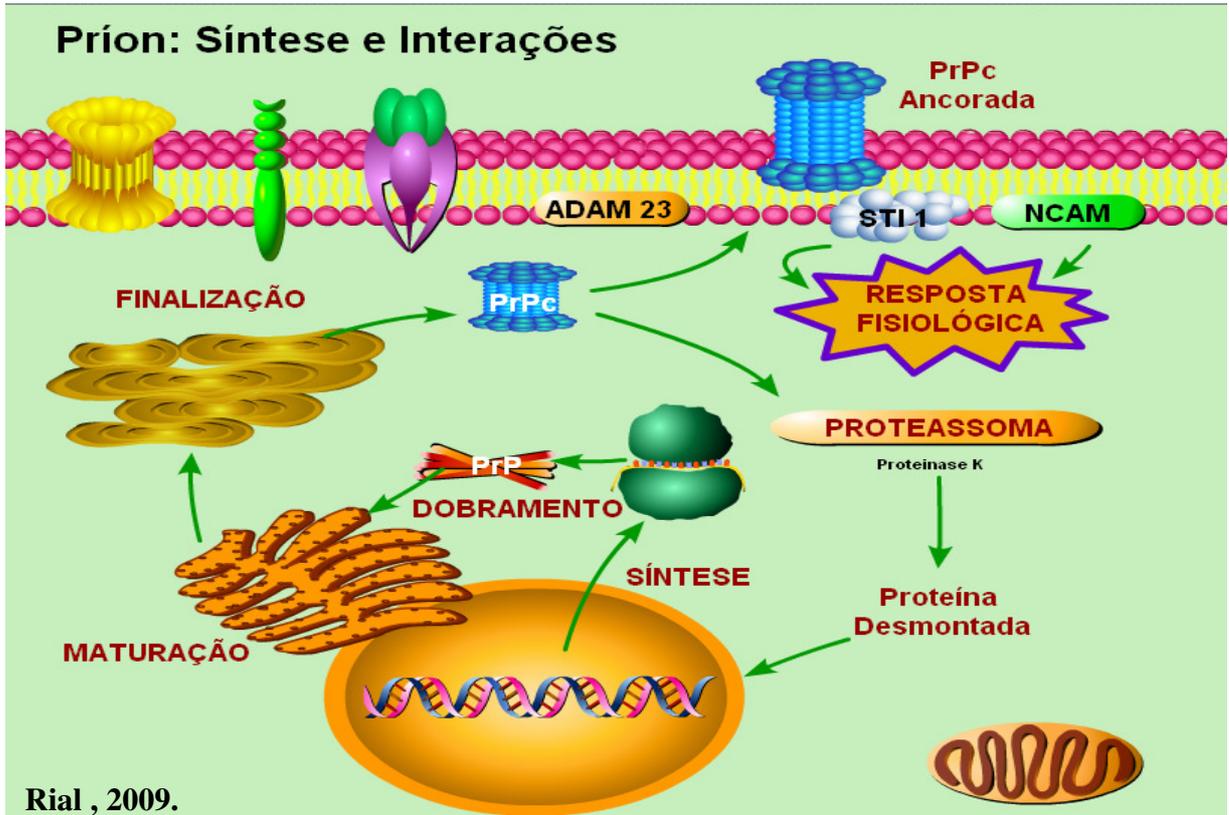


Figura 5 - Mecanismos de síntese, interação e degradação da PrP^C.

A PrP^C tem suposto papel fisiológico em diversos processos celulares que incluem sinalização, adesão e diferenciação. Devido a abundância de PrP^C no SNC em desenvolvimento e maduro (Figura 6), diversos artigos exploram seu papel fisiológico.

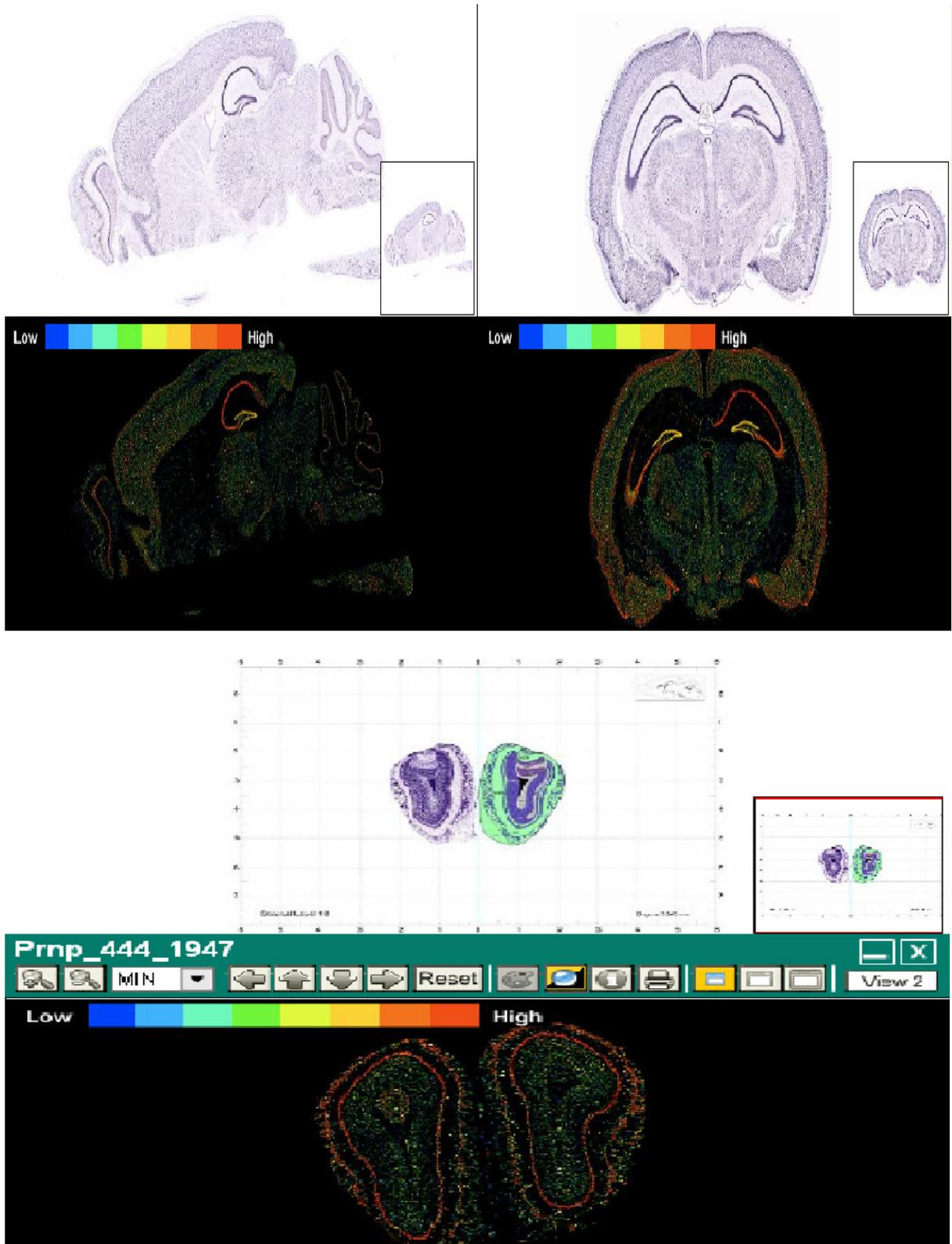


Figura 6 - Filtro de expressão gênica para PrP^C em cortes sagital e coronal do cérebro e do bulbo olfatório de camundongos. Allen Brain Atlas – Allen Institute.

Uma importante propriedade da PrP^C é a sua capacidade de ligar-se a íons Cu²⁺. Animais com o gene que codifica a PrP^C removido, possuem 20 vezes menos cobre no cérebro que animais normais, indicando uma associação fisiológica (Brown, Qin *et al.*, 1997). Além disso, células de cerebelo de animais que não expressam PrP^C são mais sensíveis a radicais livres que células normais (Brown, Schulz-Schaeffer *et al.*, 1997). Uma vez que a ligação ao cobre é importante para a atividade catalítica de muitas enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (Brown, Wong *et al.*, 1999), sugeriu-se que a PrP^C possa atuar como um depósito de íons cobre destinado à ligação a enzimas que previnem o estresse oxidativo (Brown, Qin *et al.*, 1997). Dados da literatura sugerem ainda que a PrP^C possa ser um sensor de estresse celular que desencadearia um processo de sinalização ativando os sistemas antioxidantes e as defesas celulares (Rachidi, Vilette *et al.*, 2003).

A caracterização de ligantes celulares para a PrP^C tem proporcionado um avanço importante na determinação do seu papel biológico. Demonstrou-se previamente que o receptor de laminina de 37/67 KDa interage com a PrP^C e participa de sua internalização (Gauczynski, Peyrin *et al.*, 2001). Além disso, este mesmo receptor é requerido para a propagação da forma infectante da proteína priônica (PrP^{Sc}) em células neuronais infectadas (Leucht, Simoneau *et al.*, 2003).

A PrP^C interage ainda com o plasminogênio (Ellis, Daniels *et al.*, 2002) e com a caseína cinase (Meggio, Negro *et al.*, 2000) modulando suas atividades. Diversas moléculas da matriz extracelular também já foram descritas como ligantes de PrP^C, entre elas os glicosaminoglicanos (Gonzalez-Iglesias, Pajares *et al.*, 2002), os proteoglicanos (Keshet, Bar-Peled *et al.*, 2000), a heparina (Warner, Hundt *et al.*, 2002) e a molécula de adesão celular neural (NCAM) (Schmitt-Ulms, Legname *et al.*, 2001). Foi descrito também o envolvimento de PrP^C no estímulo de vias de sinalização, como as vias fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K),

proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Chen, Mange *et al.*, 2003).

Outros trabalhos demonstram que a PrP^C pode ligar-se a duas outras proteínas: STII (*Stress Inducible Protein 1*) e a Vitronectina. A ligação entre PrP^C e STII é específica e de alta afinidade no sítio que compreende os aminoácidos 113-128 da molécula de PrP^C e nos resíduos 230-245 de STII. A interação entre as duas proteínas desencadeia sinais de proteção dependentes da via de PKA em neurônios retinianos (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Zanata, Lopes *et al.*, 2002), promove crescimento neurítico, além de proteger neurônios hipocâmpais da morte celular induzida pela estaurosporina (Lopes, Hajj *et al.*, 2005).

O sinal induzido por cada um desses ligantes pode ter um papel cooperativo em alguns eventos biológicos. Acredita-se que a PrP^C, pelo grande número de interações, tenha funções pleiotrópicas que dependem sobretudo da sua expressão celular, bem como do amplo contexto onde está inserida.

Apesar da importância das funções da PrP^C descritas nos últimos anos (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Lopes, Hajj *et al.*, 2005; Steele, Emsley *et al.*, 2006), os trabalhos pioneiros utilizando camundongos isentos de PrP^C relataram a ausência de alterações comportamentais evidentes (Bueler, Fischer *et al.*, 1992). Uma explicação para este fenótipo normal é que a ablação de PrP^C poderia ser compensada por proteínas com funções redundantes (Bueler, Fischer *et al.*, 1992). De qualquer forma, estudos recentes têm evidenciado algumas importantes diferenças entre os camundongos nocautes para PrP^C (Prnp^{0/0}) e o grupo controle (Prnp^{+/+}) (Martins, Linden *et al.*, 2002; Spudich, Frigg *et al.*, 2005; Coitinho, Freitas *et al.*, 2006; Weise, Sandau *et al.*, 2006; Lobao-Soares, Walz *et al.*, 2007; Nazor, Seward *et al.*, 2007; Xikota, Rial *et al.*, 2008). Camundongos que não expressam a PrP^C exibem ainda significantes alterações na organização das fibras neurais (Colling, Khana *et al.*, 1997), sono, ritmo circadiano (Tobler, Gaus *et al.*, 1996), aprendizado

especial (Criado, Sanchez-Alavez *et al.*, 2005) além de preservar neurônios retinianos e hipocampais da morte celular programada (apoptose) pela interação com STII (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Zanata, Lopes *et al.*, 2002) e apresentarem modificações eletrofisiológicas (Colling, Collinge *et al.*, 1996).

Coitinho e colaboradores (2003; 2006) demonstraram que os animais nocautes para PrP^C apresentam características relacionadas ao desenvolvimento precoce do envelhecimento em comparação ao seu grupo controle tanto em tarefas cognitivas específicas quanto em tarefas locomotoras. Evidências consistentes mostraram a profunda participação da PrP^C em patologias relacionadas ao envelhecimento como a DA (Ferrer, Blanco *et al.*, 2001; Aguzzi e Haass, 2003; Schwarze-Eicker, Keyvani *et al.*, 2005) e a DP (Wang, Chuang *et al.*, 2008). Aparentemente placas senis A β -positivas em cérebros de pacientes com DA comumente contém depósitos de PrP^C (Schwarze-Eicker, Keyvani *et al.*, 2005), enquanto que as mesmas placas senis A β -positivas também têm sido identificadas em doenças priônicas como na doença de Creutzfeldt–Jakob (DCJ) e na síndrome de Gerstmann– Straüssler–Scheinker (GSS) (Miyazono, Kitamoto *et al.*, 1992; Hainfellner, Wanschitz *et al.*, 1998).

Além disso, existem evidências da inter-relação entre o sistema colinérgico e a PrP^C, sendo observada uma localização da proteína prion celular na junção neuromuscular (Gohel, Grigoriev *et al.*, 1999) e a co-imunoprecipitação com a subunidade β -4 do receptor nicotínico no cérebro humano (Petrakis, Irinopoulou *et al.*, 2008). Adicionalmente, tem sido proposta uma propriedade da PrP^C modulando o número de receptores colinérgicos presentes na junção neuromuscular e no SNC (Harris, Lele *et al.*, 1993).

Desta forma, o presente trabalho pretende estender o conhecimento acerca do envolvimento da PrP^C sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento. Para isso utilizaremos diferentes linhagens de camundongos (Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0}

e Tg-20) de duas idades distintas (3 e 11 meses), além de ocasional ferramenta farmacológica para confirmação dos resultados provindos dos camundongos geneticamente modificados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o papel da proteína prion celular (PrP^C) em alterações comportamentais, bioquímicas e imunohistoquímicas relacionados ao processo de envelhecimento em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a participação da proteína prion celular (PrP^C) em parâmetros comportamentais (locomotores, olfatórios, emocionais e cognitivos) relacionados ao envelhecimento;
- Investigar a modulação da PrP^C, no contexto do envelhecimento, por ativação farmacológica em tarefas cognitivas específicas;
- Investigar a participação da PrP^C na modulação de sistemas classicamente envolvidos com o envelhecimento, como o sistema colinérgico;
- Investigar a modulação da PrP^C e do processo de envelhecimento em parâmetros imunohistoquímicos relacionados a morte celular programada (apoptose) bem como em mecanismos de plasticidade neural.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental geral

A execução experimental utilizada se constituiu de diferentes desenhos metodológicos, descritos no organograma abaixo:

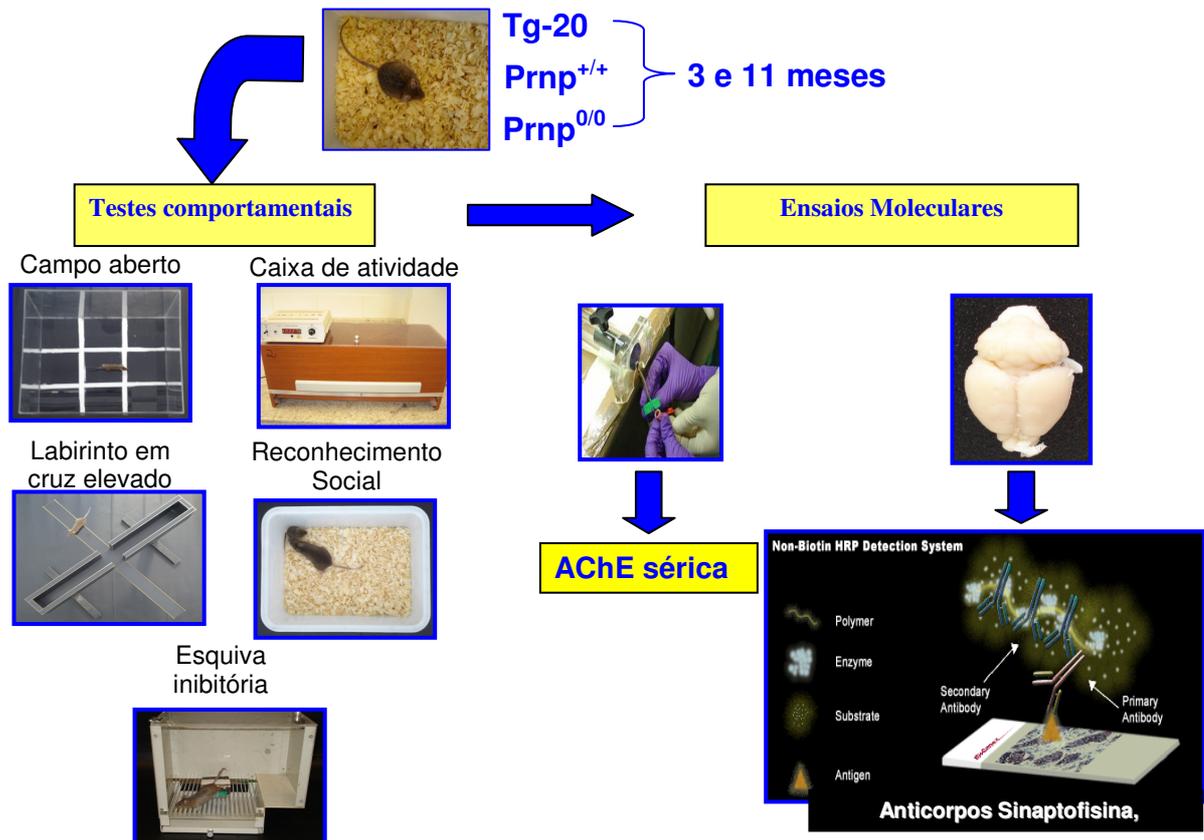


Figura 7 - Esquema com o desenho experimental geral.

Os mesmos animais passaram por todos os testes comportamentais em seqüência previamente estabelecida como aquela de menor interferência entre eles (McIlwain, Merriweather *et al.*, 2001), excluindo-se o teste de sensibilidade ao choque onde foram utilizados grupos independentes.

3.2 Modelo animal

Todos os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo comitê de ética local, de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências

(SBNeC), que se baseia no guia de cuidados e utilização de animais de laboratório do Instituto Americano de Saúde. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.1 Animais geneticamente modificados

No presente estudo foram utilizados camundongos machos com 3 e 11 meses de idade, nocautes para o gene *Prnp*, (designados $Prnp^{0/0}$) descritos previamente (Bueler, Fischer *et al.*, 1992), camundongos que superexpressam PrP^C (designados Tg-20) e seu respectivos controles, camundongos ($Prnp^{+/+}$) enviados pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer (São Paulo SP) quando com 3 meses de idade. Os animais foram mantidos em nosso biotério até atingirem a idade selecionada para o estudo. Todos os animais deste estudo pesavam de 30 – 40 g.

A idade de 11 meses foi selecionada pela alta mortalidade observada nos animais $Prnp^{0/0}$, sendo que na ocorrência de mais casos de morte o estudo seria prejudicado pelo reduzido número de animais.

Os camundongos $Prnp^{+/+}$ foram gerados através de um acasalamento entre os animais C57/BL6J e 129 Sv. O cruzamento contínuo a partir das F1 destes animais gerou a cepa tipo selvagem de *background* misto, controle para os camundongos $Prnp^{0/0}$ e Tg-20. Os camundongos Tg-20 foram obtidos pela inserção de cópias extras do gene *Prnp* em blastocistos provenientes de camundongos $Prnp^{0/0}$ (Fischer, Rulicke *et al.*, 1996).

Os animais foram acondicionados em gaiolas recebendo água e ração à vontade, controle do ciclo claro e escuro, e da climatização do ambiente até a seleção da idade ideal para serem utilizados nos experimentos do presente estudo.

3.2.2 Tratamento Farmacológico

O peptídeo (PepSTI₁₂₃₀₋₂₄₅) (ELGNDAYKKKDFDKAL), que representa o domínio de ligação da PrP^C com a proteína STI1 e um peptídeo não relacionado a mesma porção de ligação (PepSTI₁₄₂₂₋₄₃₇) (QLEPTFIKGYTRKAAA), foram utilizados como previamente descrito (Zanata et al., 2002).

A concentração destes dois peptídeos (50 ng/μl) foi definida como descrito anteriormente e foram diluídos em PBS estéril (pH 7.4). As injeções intracerebroventriculares foram feitas utilizando-se uma microseringa (5 μl, Hamilton) conectada a uma agulha que foi inserida perpendicularmente 3 mm através do crânio do animal como previamente descrito por Harley e McCormick (1957) e modificado posteriormente por Maurice et al. (1996). Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (1 ml/ml; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brazil) utilizando-se um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, USA) e então manuseados para as injeções. A agulha foi inserida unilateralmente, a 1 mm do ponto médio equidistante de cada olho, e em distância igual entre os olhos e as orelhas. O volume de 3 μl de PBS, PepSTI-1230-245 e PepSTI₁₄₂₂₋₄₃₇ foi injetado diretamente no ventrículo lateral. O volume de injeção foi selecionado como descrito previamente (Maurice et al., 1996; Prediger et al., 2007). Os camundongos exibiram comportamento normal em aproximadamente 1 minuto após a administração.

Resultados de erros de injeção ou qualquer sinal de hemorragia cerebral foram descartados das análises estatísticas.

3.3 Modelos comportamentais

3.3.1 Teste do campo aberto

Para avaliarmos possíveis alterações locomotoras associadas ao genótipo ou a idade dos animais, estes foram testados durante 5 minutos no campo aberto seguindo o protocolo

descrito por Prediger et al. (2007). O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor preta (30 x 30 cm), dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, com paredes transparentes de 15 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto, sendo que um sistema de câmera de vídeo captou as imagens do campo aberto, sendo registrado o número de quadrantes cruzados e os atos de levantar.

3.3.2 Teste da caixa de atividade

A avaliação da atividade locomotora dos camundongos foi também realizada em uma caixa de madeira medindo 20 x 11 x 12 cm durante um período de 30 minutos. Esta caixa apresenta três células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do chão em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registra o número de vezes que o animal interrompe os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz consiste em uma medida de atividade). Assim, somente os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas.

3.3.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado com base na sua capacidade de detectar tanto efeitos do tipo-ansiolítico quanto do tipo-ansio gênico em camundongos (Lister, 1987). O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 cm), elevados 60 cm do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Os experimentos foram conduzidos em ambiente com baixa luminosidade (12 lux), sendo que os comportamentos dos animais no LCE foram registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um gravador de DVD instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Cada camundongo foi colocado na plataforma central de frente para um braço fechado. Os animais foram observados durante um período de

5 min. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TBA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x100]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção (Cruz, Frei *et al.*, 1994; Carobrez e Bertoglio, 2005).

3.3.4 Teste de reconhecimento social

O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (1987) sendo este devidamente padronizado as condições de nosso laboratório (Prediger e Takahashi, 2003; Prediger, Batista *et al.*, 2004; Prediger, Da Cunha *et al.*, 2005; Prediger, De-Mello *et al.*, 2006). O teste de reconhecimento social representa um modelo válido para o estudo da memória olfatória de curta-duração. Os camundongos foram isolados em caixas de plástico individuais por 7 dias antes do experimento. O teste consiste de duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo de 30 minutos. Durante a primeira apresentação, um camundongo jovem (do mesmo sexo e linhagem, com 1 mês de idade) foi colocado na caixa do camundongo adulto, e se registrou o tempo que o adulto investigou (investigar compreende: cheirar, seguir, lambar, aproximar-se) o camundongo jovem. Ao final da primeira apresentação, o camundongo jovem foi retirado da caixa do camundongo adulto, ficando isolado em outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após um intervalo de 30 min, o mesmo jovem foi reapresentado ao camundongo adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação gasto pelo

camundongo adulto durante a segunda apresentação. O que acontece neste tipo de experimento é que quando se utiliza um intervalo pequeno (menor que 40 min) entre as duas apresentações, o camundongo adulto é capaz de reconhecer o jovem com o qual foi previamente apresentado, verificando-se uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Entretanto, quando se utiliza um intervalo superior a 40 min entre as duas apresentações, o camundongo adulto perde a capacidade de reconhecimento, não sendo verificada redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação.

3.3.5 Teste de sensibilidade ao choque

Para descartar interferências no teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down* utilizamos o teste da sensibilidade ao choque em vista que em estudos prévios os animais nocautes para PrP^C apresentaram aumentada sensibilidade a estímulos dolorosos específicos (Meotti, Carqueja *et al.*, 2007). Contudo, no estudo citado não se contemplou a sensibilidade ao choque, portanto necessária para a realização deste trabalho.

Os camundongos foram testados em caixas padrão para medo condicionado com medidas de 50 x 25 x 25 cm como previamente descrito (Reiss, Wichmann *et al.*, 2008). O choque nas patas foi aplicado manualmente pelo período de 2 segundos, e sua resposta comportamental anotada. Avaliamos três padrões de resposta ao choque: correr, pular e vocalizar. Níveis de choque iniciaram-se em 0.1 mA, com acréscimo de 0.1 mA em intervalos de 30 s. O choque máximo (0.5 mA) foi definido como aquele responsável por induzir o animal a vocalizar.

3.3.6 Teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down*

A memória aversiva foi avaliada através do modelo de esQUIVA inibitória (EI). Sendo que nesta tarefa, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve

choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquiwa ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado inerente a EI envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, acompanhados de um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse.

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm. Parte do chão do aparelho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma em acrílico com 10-cm² de superfície e 2-cm de altura foi colocada no centro do assoalho. O animal foi posto sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrado. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele é estimulado com um leve choque nas patas (0.3 mA) durante 2,0 segundos. Cada animal foi testado 24h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo também cronometrado o tempo que o animal demora a descer da plataforma. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior que o observado quando desce da plataforma pela primeira vez (Roesler, Walz *et al.*, 1999).

3.4 Obtenção do material histológico

Após a finalização dos testes comportamentais os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) pela via intraperitoneal, e após a toracotomia procedeu-se a coleta de sangue. No período pós-morte, os animais foram perfundidos via transcardíaca com solução salina e PBS contendo paraformoldeído 4% (Sigma, CA). Com a decaptação, procedemos à retirada da parte óssea do crânio, as amostras de encéfalo foram fixadas em

solução tamponada de paraformaldeído 4% durante 24h, e álcool 70% posteriormente, seguido de processamento histológico, fixados e inclusos em parafina.

3.5 Ensaio para dosagem sérica de Acetilcolinesterase

A dosagem sérica de Acetilcolinesterase foi estimada pelo método previamente descrito por Ellman e colaboradores (1961), que se utiliza do iodeto de acetilcolina como substrato. A taxa de hidrólise deste composto é medida em 412 nm através da liberação de compostos tióis que quando reagem com o ditiobisnitrobenzoato (DTNB) produz um composto color denominado ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB).

3.6 Imunohistoquímica

A detecção da morte celular apoptótica (Caspase-3) e os níveis de sinaptogênese (Sinaptofisina) foram acessados em secções de tecido em parafina utilizando-se anticorpo policlonal de coelho anti-caspase-3 (1:200; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-sinaptofisina (1:400; Novocastra, Newcastle, UK), respectivamente. A restauração antigénica por alta temperatura foi procedida pela imersão das fatias em banho-maria em temperaturas de 95–98°C com 10 mM de tampão de citrato trissódico com pH 6.0, por 45 min. Ligações não-específicas foram bloqueadas por secções de incubação de 1h com soro de cabra diluídos em PBS. Após um período de incubação de uma noite (*overnight*) a 4°C com os anticorpos primários, as fatias foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Envision plus (Dako Cytomation), por 1h em temperatura ambiente. As secções foram lavadas em PBS, e a visualização foi completada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (Dako Cytomation) em solução cromógena e contramarcção com solução de hematoxilina de Harri. As imagens foram capturadas

utilizando-se um microscópio (Eclipse 50i; Nikon) com uma câmera digital acoplada (DS-5M-L1; Nikon).

Amostras controle e grupos experimentais foram colocados no mesmo tipo de lâmina e processados nas mesmas condições. As medidas para aquisição de imagem foram idênticas para os controles e para os outros grupos experimentais. Para cada amostra obtivemos imagens (uma por seção) das subregiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3. As imagens digitalizadas de 8-bits, foram então transferidas para um computador, e a medida da intensidade do pixel para marcação de sinaptofisina foi calculado para cada imagem utilizando-se o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD). Este tipo de aproximação feito para acessar a degeneração sináptica, tem sido validada em vários modelos experimentais de neurodegeneração (Buttini, Orth *et al.*, 1999) inclusive em cérebros humanos acometidos por patologias (Masliah, Ellisman *et al.*, 1992). Células caspase-3 positivas foram identificadas pela inspeção visual nas mesmas regiões cerebrais utilizando-se uma grade para contagem no aumento de 400X.

3.7 Análise estatística

Os dados contínuos com distribuição normal envolvendo os resultados comportamentais foram expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.) os demais dados contínuos foram expressos pela média \pm desvio padrão (D.P.). Para as análises estatísticas utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias (na dependência do número de covariáveis em estudo) e para comparações múltiplas foram realizados testes *post hoc* Newman-Keuls utilizando o programa STATISTIC[®] software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

O tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* e do teste de sensibilidade ao choque não obedecem a uma distribuição normal e não preenchem

completamente a suposição de homocedasticidade com a imposição de um teto para a resposta seqüente. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal realizamos uma análise não paramétrica onde são demonstradas as medianas (intervalo interquartis) das latências de descida da plataforma e analisados através do teste Kruskal-Walis seguido do teste *post hoc* de Dunn, dependendo no número de grupos estudados, através do Graph Pad Prism 4® GraphPad Software Inc. Para comparação dos tempos de latência de descida da sessão treino versus o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal, foram analisadas pelo teste da soma de postos de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste T pareado.

3.8 Avaliação da presença do gene *Prnp* e expressão de PrP^C nos animais do estudo

Todos os animais submetidos ao experimento foram genotipados para o *Prnp* (gene que codifica a PrP^C) com o objetivo de controlar o *background* genético. A genotipagem foi realizada no Instituto Ludwig de Pesquisas para o Câncer (São Paulo Branch) pelo grupo coordenado pela Professora Vilma Martins e colaboração da Professora Michelle Landemberger, em amostras de DNA retiradas da cauda dos animais sacrificados após o término dos experimentos.

4. RESULTADOS

4.1 Observação visual dos animais de estudo

Após os animais atingirem as idades selecionadas para este estudo, observamos claras diferenças corporais nos mesmos (Figura 8). Os camundongos *Prnp*^{0/0} de 11 meses apresentaram grande número de descamações cutâneas (escaras) nas regiões caudal e dorsal dos animais. Estas alterações não foram observadas em nenhum animal de outra linhagem e de mesmo período de vida. Provavelmente estas características não se devem a nenhum

componente de agressividade, pois nenhuma alteração neste sentido durante este período foi observada. Nenhuma alteração no peso dos animais foi observada.

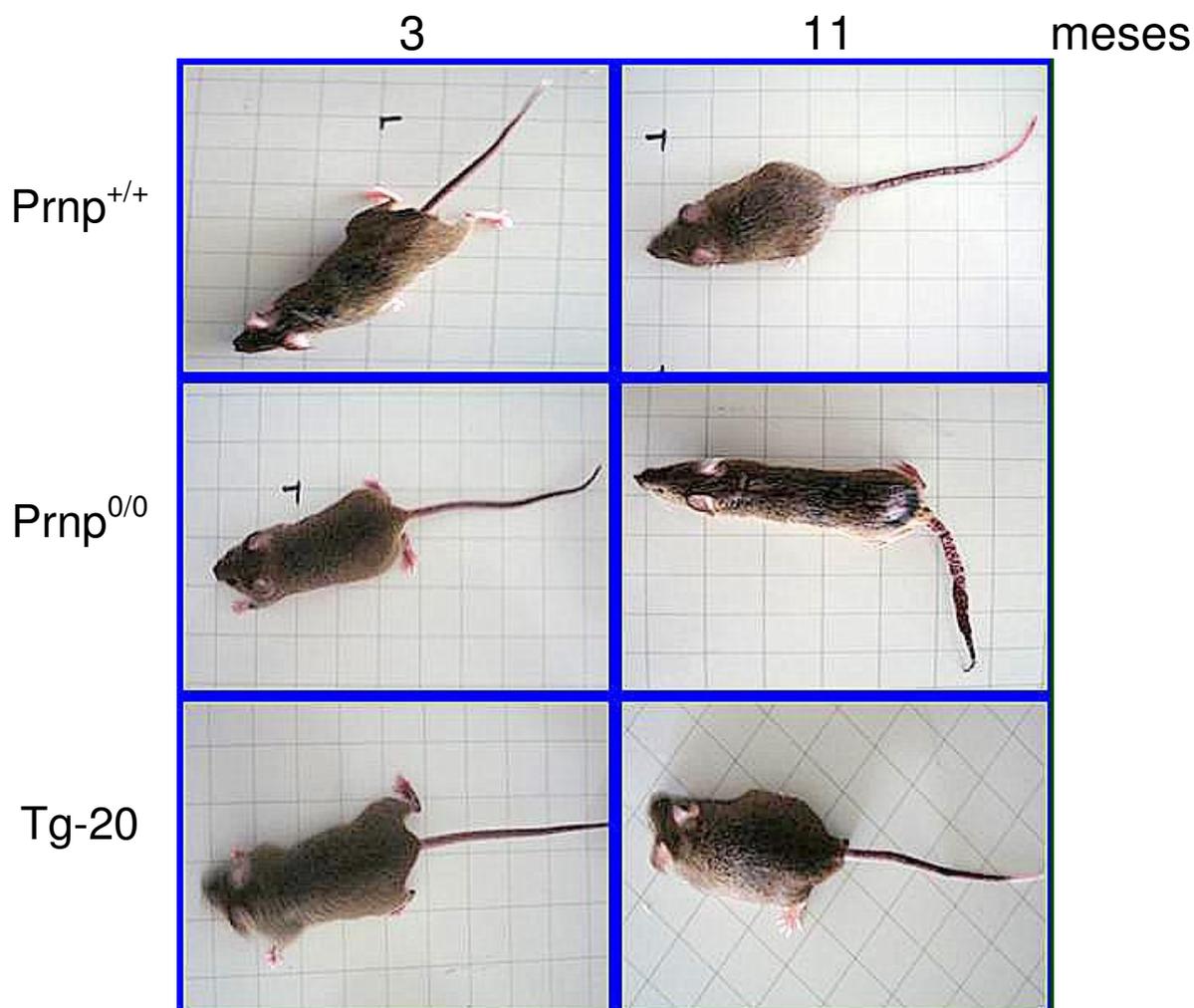


Figura 8 - Observação visual de animais de 3 e 11 meses de idade das linhagens $Prnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ e Tg-20.

4.2 Campo aberto

A Figura 9 representa os efeitos da idade em parâmetros locomotores de camundongos $Prnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ e Tg-20 avaliados no teste do campo aberto. A análise de variância (ANOVA) de duas vias (genótipo x idade) revelou efeitos significativos para o fator genótipo no total de cruzamentos [$F(2, 52)=17.10$, $P\leq 0.05$]; mas não-significante para o fator idade ou para a interação dos fatores [idade: $F(1, 52)=1.57$, $P=0.21$; interação: $F(2, 52)=1.87$,

$P=0.16$]. Análise *post-hoc* revelou que o grupo $Prnp^{0/0}$ de 11 meses de idade apresentaram redução na atividade locomotora em comparação com os outros grupos.

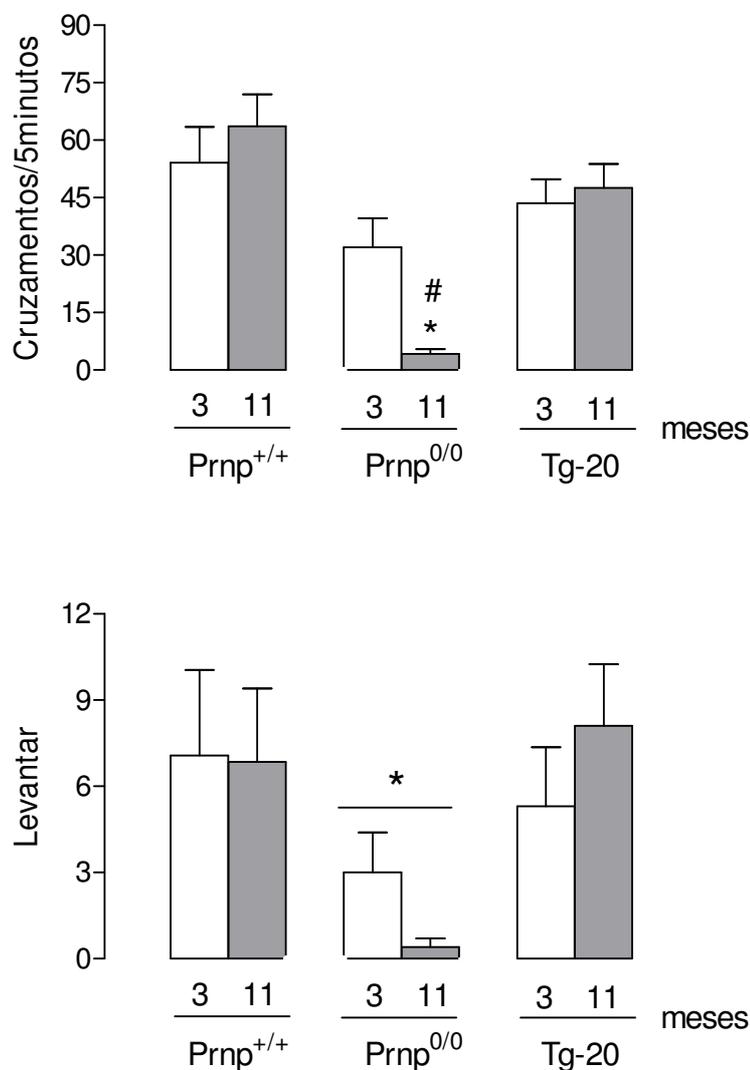


Figura 9 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a locomoção no campo aberto de 5 minutos em camundongos $Prnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade. As barras representam o número de cruzamentos em 5 min. (média \pm E.P.M.) (n = mínimo de 8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao respectivo grupo de 3 meses. # $P \leq 0.05$ comparado ao grupo $Prnp^{+/+}$ de mesma idade (Teste de Newman-Keuls).

4.3 Caixa de atividade

Na Figura 10 são apresentados os resultados da caixa de atividade. Os resultados mostraram-se estatisticamente significantes para todos os fatores [genótipo: $F(2, 52)=6.02$, $P \leq 0.05$; idade: $F(1, 52)=23.46$, $P \leq 0.05$; interação: $F(2, 52)=8.36$, $P \leq 0.05$]. A análise *post-*

hoc mostrou que os animais de 11 meses de idade das linhagens $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ tiveram redução na ambulação, enquanto que camundongos da linhagem Tg-20 mantiveram a mesma resposta tanto com 3 quanto com 11 meses de idade.

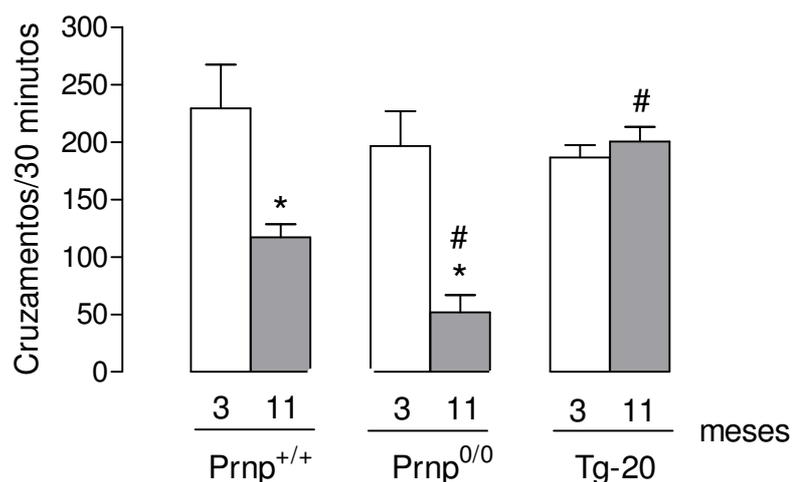


Figura 10 -Efeitos da idade e do genótipo sobre a locomoção na caixa de atividade avaliada durante 30 minutos em camundongos $Prnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade. As barras representam o número de cruzamentos (média \pm E.P.M.) em 30 min (n = mínimo de 8 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao respectivo grupo de 3 meses. # $P \leq 0.05$ comparado ao grupo $Prnp^{+/+}$ de mesma idade (Teste de Newman-Keuls).

Após a análise das características locomotoras propusemos uma correlação entre a densidade da PrP^C em cada linhagem e sua atividade ambulatoria horizontal. Para isto somamos os parâmetros com esta característica e distribuimos os dados pelas diferentes linhagens e idades (Figura 11)

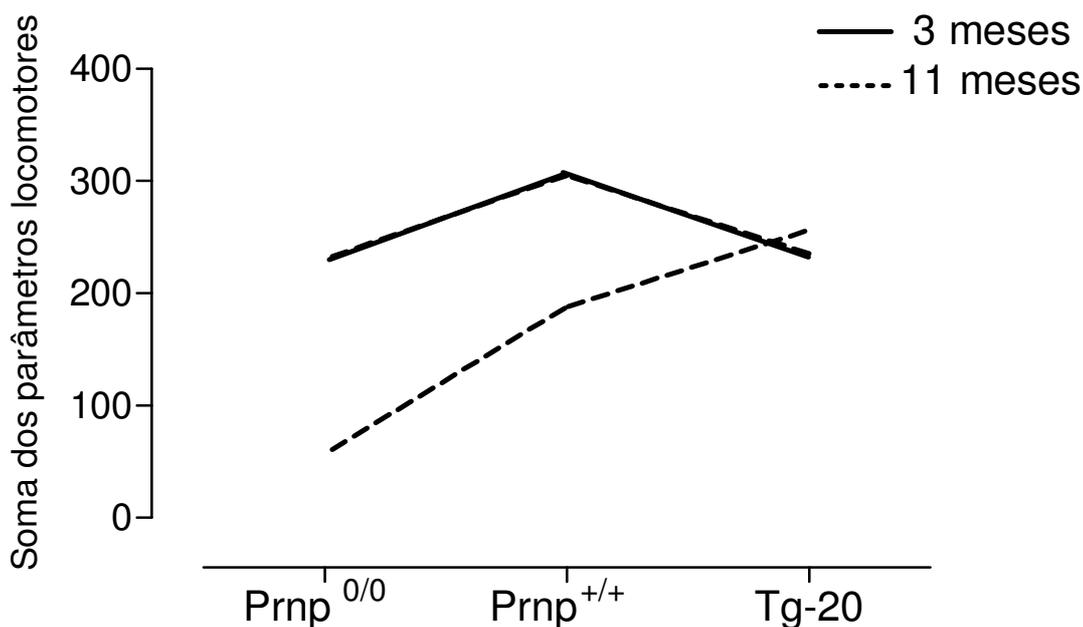


Figura 11 - Relação da densidade de expressão da PrP^C pela atividade locomotora horizontal

4.4 Labirinto em cruz-elevado

ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes para os principais fatores na porcentagem de tempo nos braços abertos [genótipo: $F(2, 53)=9.85$, $P \leq 0.05$; idade: $F(1, 53)=15.23$, $P \leq 0.05$; interação: $F(2, 53)=2.74$, $P=0.07$]. Subsequente análise post-hoc mostrou diferenças entre camundongos Tg-20 de 11 meses e camundongos da mesma idade de diferentes genótipos. Na porcentagem de entradas nos braços abertos não foram observadas diferenças entre para o fator genótipo e o fator de interação [$F(2, 53)=0.28$, $P=0.75$; $F(2, 53)=0.66$, $P=0.52$ respectivamente], mas diferenças estatísticas para o fator idade [$F(1, 53)=16.88$, $P \leq 0.05$]. Novamente na análise post-hoc, camundongos de 11 meses de idade da linhagem Tg-20 diferiram dos outros genótipos de mesma idade. No número de entradas nos braços fechados não foram observadas diferenças entre os fatores [genótipo: $F(2, 53)=0.24$, $P=0.19$; idade: $F(1, 53)=3.04$, $P=0.08$; interação: $F(2, 53)=0.74$, $P=0.48$].

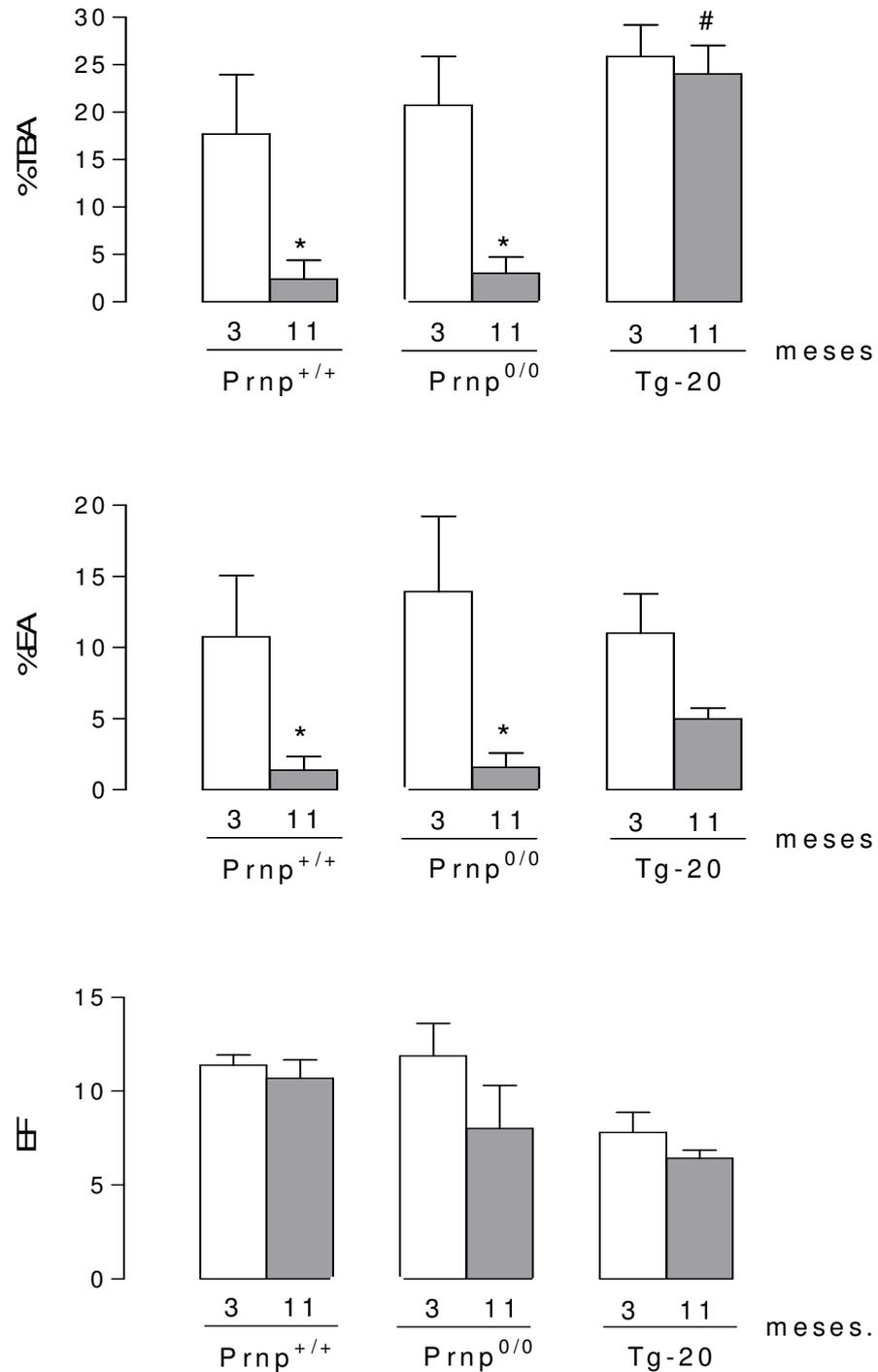


Figura 12 - Efeitos da idade e do genótipo sobre as respostas relacionadas à ansiedade em camundongos Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20 de 3 e 11 meses de idade avaliadas no labirinto em cruz elevado. As barras representam à média ± E.P.M. da % tempo nos braços abertos, % entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados ($n =$ mínimo de 8 animais por grupo). * $P < 0.05$ comparado ao grupo 3 meses do mesmo genótipo. # $P < 0.05$ comparado ao grupo Prnp^{+/+} de mesma idade (Teste de Newman-Keuls).

4.5 Teste de reconhecimento social

A ANOVA de duas vias (idade x genótipo) revelou diferenças estatísticas significantes para o fator idade [$F(1, 59)=8.81, P\leq 0.05$], para o fator genótipo [$F(2, 59)=5.79, P\leq 0.05$] e para interação dos dois fatores [$F(2, 59)=3.49, P\leq 0.05$] sobre o tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo camundongo jovem. Comparações *post-hoc* indicaram que camundongos de 3 meses de idade da linhagem Prnp^{+/+}, e de 3 e 11 meses de idade da linhagem Tg-20 gastaram menos tempo investigando o animal jovem que na primeira exposição. Por outro lado camundongos Prnp^{+/+} de 11 meses de idade, e de 3 e 11 meses de idade da linhagem Prnp^{0/0} gastaram o mesmo tempo investigando o camundongo jovem quanto na primeira exposição, indicando um distúrbio na sua habilidade de reconhecimento social (Fig 13A). Na Figura 13B é ilustrado os resultados obtidos quando camundongos Prnp^{+/+} de 11 meses de idade foram tratados com PBS, com um ligante positivo da PrP^C o peptídeo 230-245 da proteína STII (PepSTII₂₃₀₋₂₄₅) e um peptídeo irrelevante derivado da mesma proteína mas com uma seqüência não-ativa para a PrP^C (PepSTII₄₂₂₋₄₃₇). O fator repetição [$F(1, 11)=52.77, P\leq 0.05$] e a interação entre os dois fatores (repetição x tratamento) mostraram-se estatisticamente significantes [$F(1, 11)=76.50, P\leq 0.05$]. Comparações *post-hoc* indicaram que animais tratados com PepSTII₂₃₀₋₂₄₅ exibiram uma reversão dos prejuízos associados à idade na habilidade de reconhecimento social em contraste com o grupo tratado com o peptídeo irrelevante (PepSTII₄₂₂₋₄₃₇) e com o grupo tratado com PBS.

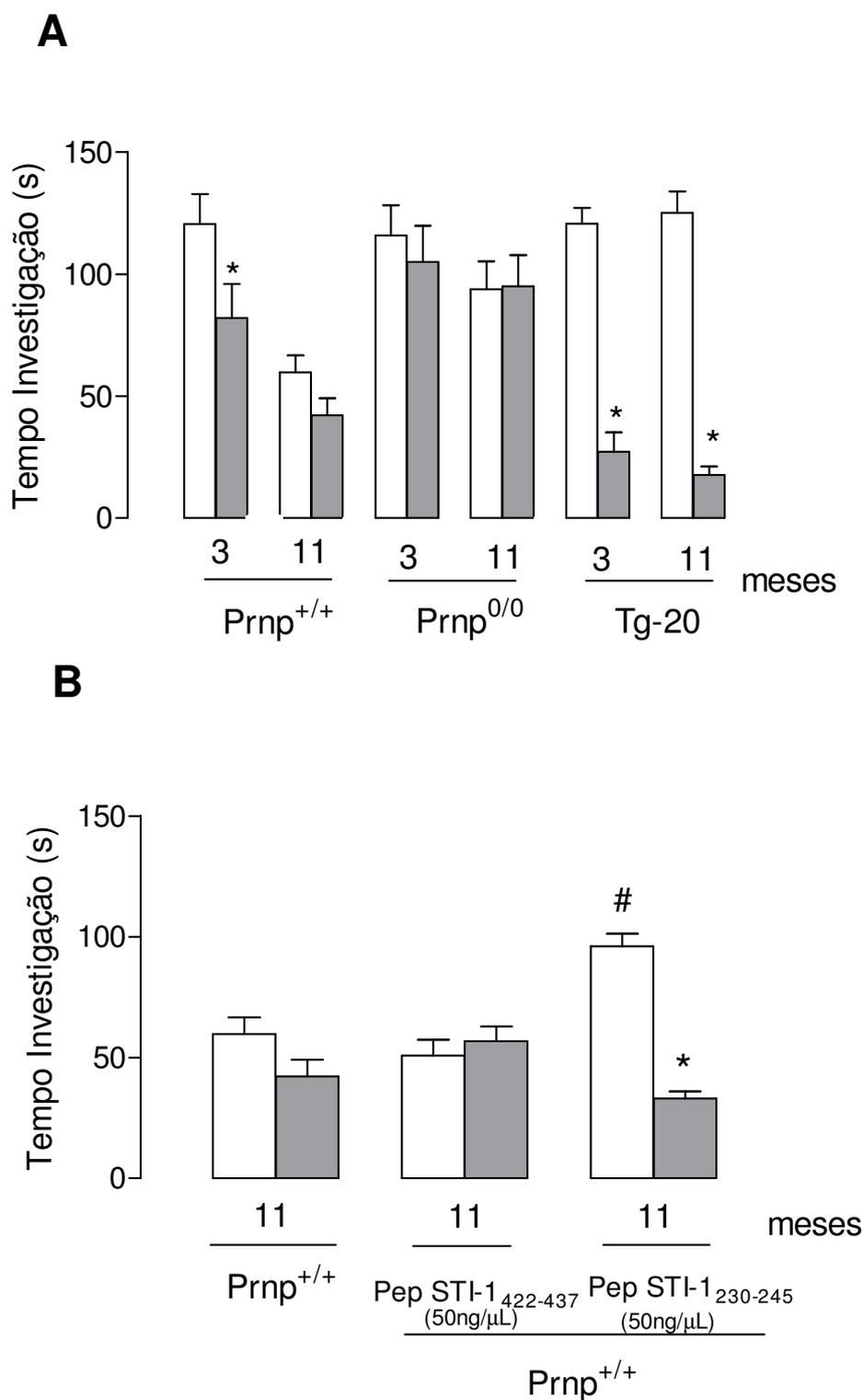


Figura 13 - Efeitos da idade e do genótipo sobre o tempo de investigação dos camundongos Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20 na primeira (branca) e segunda exposição (cinza) ao mesmo camundongo jovem (Figura 13A). Efeitos dos tratamentos com os peptídeos PePSTI₁₄₂₂₋₄₃₇ e PePSTI₁₂₃₀₋₂₄₅ sobre o reconhecimento social de camundongos Prnp^{+/+} de 11 meses de idade (Figura 13B). As barras representam o tempo de investigação (média ± E.P.M., em segundos) na primeira e segunda apresentação. (*n*= mínimo de 9 animais por grupo). **P*≤0.05 comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. #*P*≤0.05 comparado à primeira apresentação do grupo controle (PBS) (Teste de Newman-Keuls).

4.6 Sensibilidade ao choque

O teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou variação entre os comportamentos em relação à intensidade do choque ($P \leq 0.05$), porém sem diferenças entre as linhagens ($P > 0.05$), indicando similar sensibilidade ao choque entre as linhagens.

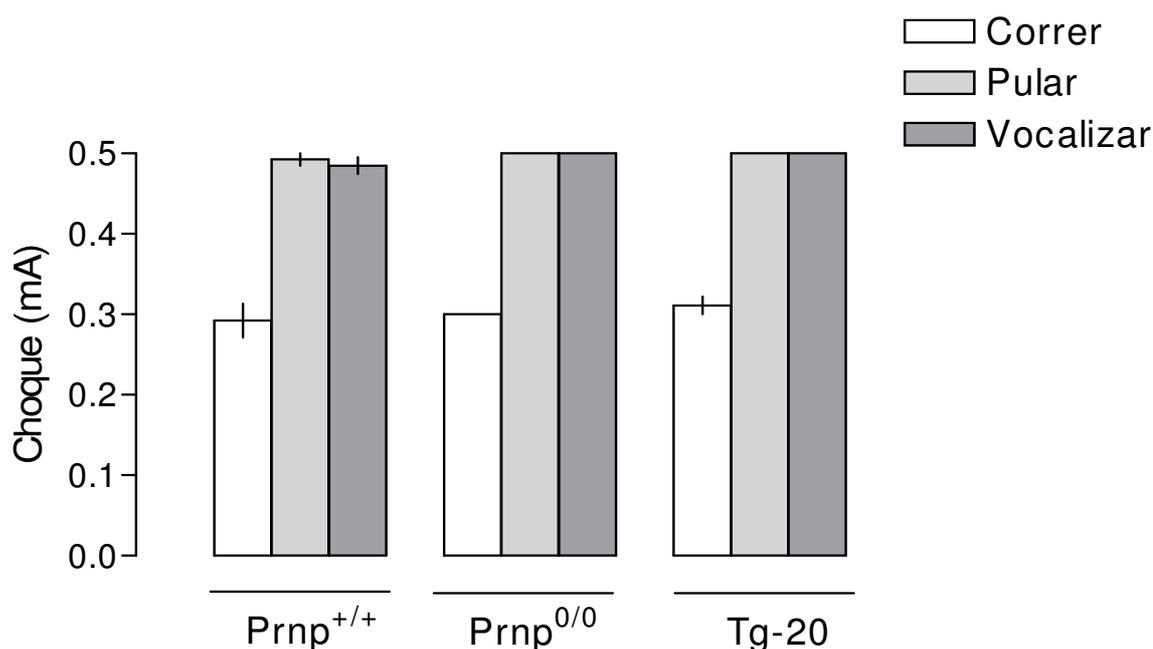


Figura 14- Influência do genótipo sobre a sensibilidade ao choque nas linhagens Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20. Os dados são demonstrados como mediana (intervalos interquartis) (n = mínimo de 10 animais por grupo). As comparações estatísticas foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis.

4.7 Esquiva inibitória do tipo *step-down*

Não foram observadas diferenças para os fatores idade e genótipo na memória de longo prazo de camundongos Prnp^{0/0}, Prnp^{+/+} ou Tg-20 avaliada na esquiva inibitória do tipo *step-down* (Fig. 15). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis não revelou diferenças nas latências para descer da plataforma durante a retenção de longo prazo. O teste de Wilcoxon indicou diferenças entre as sessões de treino e teste de todos os grupos. Estes resultados

indicam que o aprendizado e a memória de longo prazo não foram afetados pelos fatores idade ou genótipo dos animais.

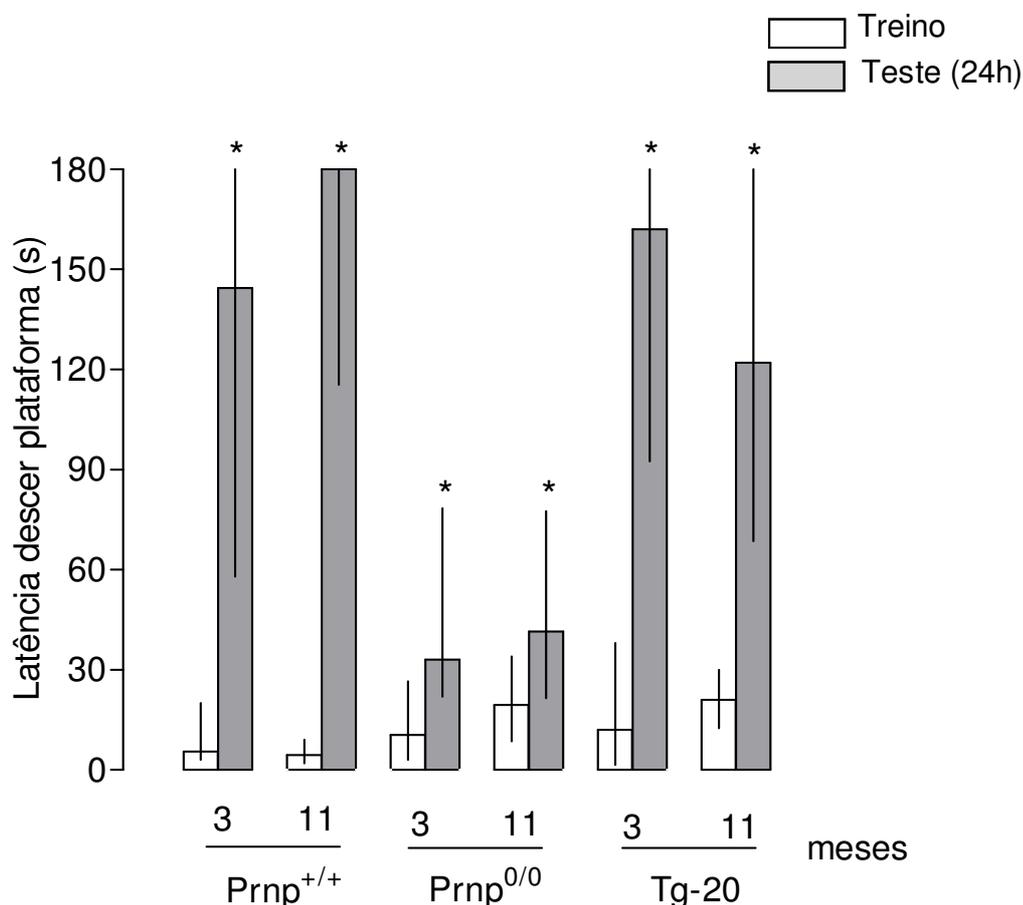


Figura 15 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a retenção de memória de longo prazo (24 h) na tarefa de esquiwa inibitória do tipo step-down em camundongos de 3 e 11 meses de idade das linhagens Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20. Os dados são demonstrados como mediana (intervalos interquartis) dos tempos de latência para descida da plataforma nas sessões de treino (branco) e teste (cinza) (n = mínimo de 10 animais por grupo). As comparações estatísticas foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis seguidas pelo teste de Wilcoxon. * $P \leq 0.05$ comparado às sessões de treino e teste no mesmo grupo.

4.8 Concentração sérica de AChE

A ANOVA de duas vias revelou ausência de significância para o fator idade nas concentrações séricas de AChE [$F(1, 30)=0.003$, $P=0.95$]. Por outro lado, o fator genótipo e a interação entre os fatores apresentaram-se estatisticamente significantes: [$F(2, 30)=8.84$, $P \leq 0.05$] e [$F(2, 30)=4.25$, $P \leq 0.05$], respectivamente. A análise *post-hoc* revelou diferenças

entre os camundongos Tg-20, nas duas idades (3 e 11 meses) quando comparados com os outros grupos (Figura 16).

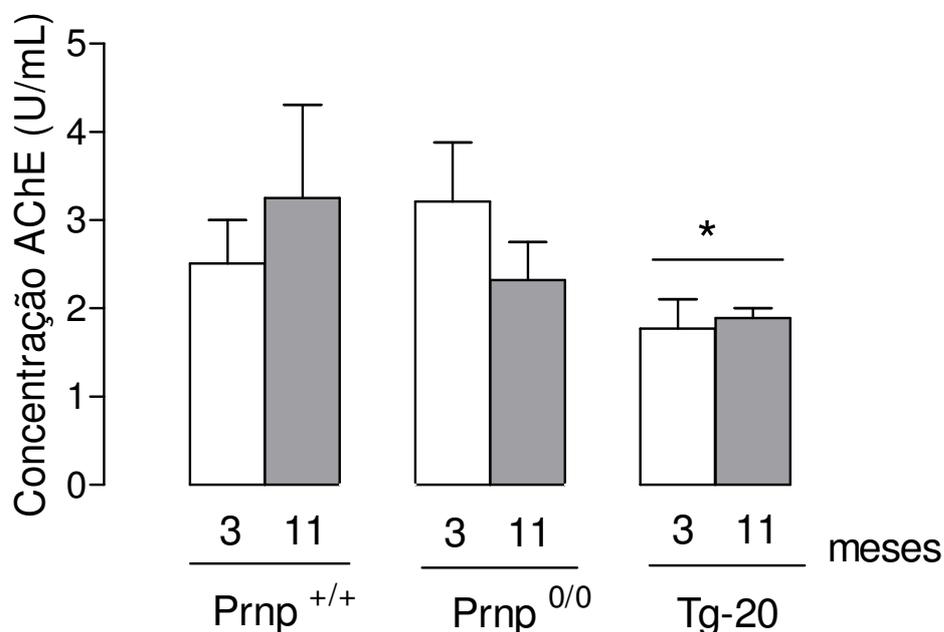


Figura 16 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a concentração sérica de AChE em camundongos Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20 (n = mínimo de 5 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo Prnp^{+/+} de mesma idade (Teste de Newman-Keuls).

4.9 Níveis de expressão de sinaptofisina

No ensaio de imunohistoquímica para sinaptofisina (Figura 17), as análises estatísticas mostraram diferenças para o fator genótipo [$F(2, 45)=7.10$, $P \leq 0.05$]. Em contrapartida, os fatores idade e a interação entre estes não apresentaram diferenças estatísticas [idade: $F(1, 45)=0.10$, $P=0.74$; interação: $F(2, 45)=0.12$, $P=0.88$]. A análise *post-hoc* revelou diferenças entre os níveis de expressão de sinaptofisina nos camundongos Tg-20 em comparação com os outros grupos.

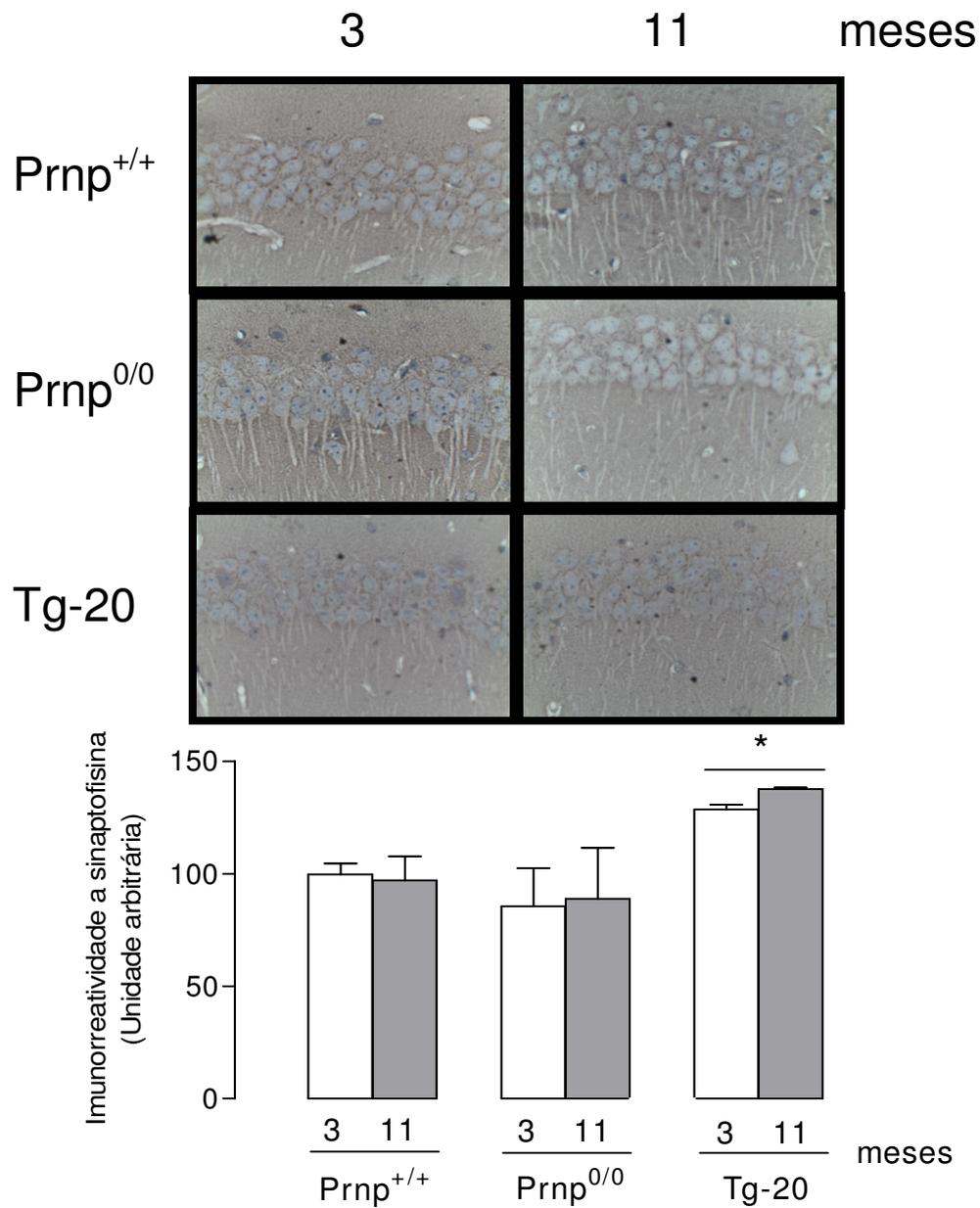


Figura 17 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina em camundongos Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20. Fotomicrografias representativas da região CA1 do hipocampo dos animais (n= mínimo de 5 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo Prnp^{+/+} de mesma idade (Teste de Newman-Keuls).

4.10 Morte celular apoptótica (Caspase-3).

Como indicado na Figura 18, o fator genótipo não apresentou significância estatística na indução de morte celular apoptótica mediada pela atividade da caspase-3 [$F(2, 30)=1.90$, $P=0.19$], enquanto que os fatores idade e a interação entre os fatores foram significantes neste parâmetro [idade: $F(1, 30)=73.10$, $P\leq 0.05$; interação: $F(2, 30)=20.19$, $P\leq 0.05$]. Na análise posterior de *post-hoc* revelou-se que o fator idade produz um aumento na atividade da caspase-3 em camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$, enquanto que esta diferença não pode ser observada no grupo de camundongos Tg-20. Além disso, a análise *post-hoc* demonstrou que animais Tg-20 de 11 meses de idade tiveram diminuída ativação da caspase-3 em comparação com camundongos da mesma idade, mas diferentes genótipos. Pode-se também observar que os camundongos de 3 meses de idade da linhagem Tg-20 apresentaram níveis basais aumentados de expressão desta proteína em relação aos grupos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ de mesma idade.

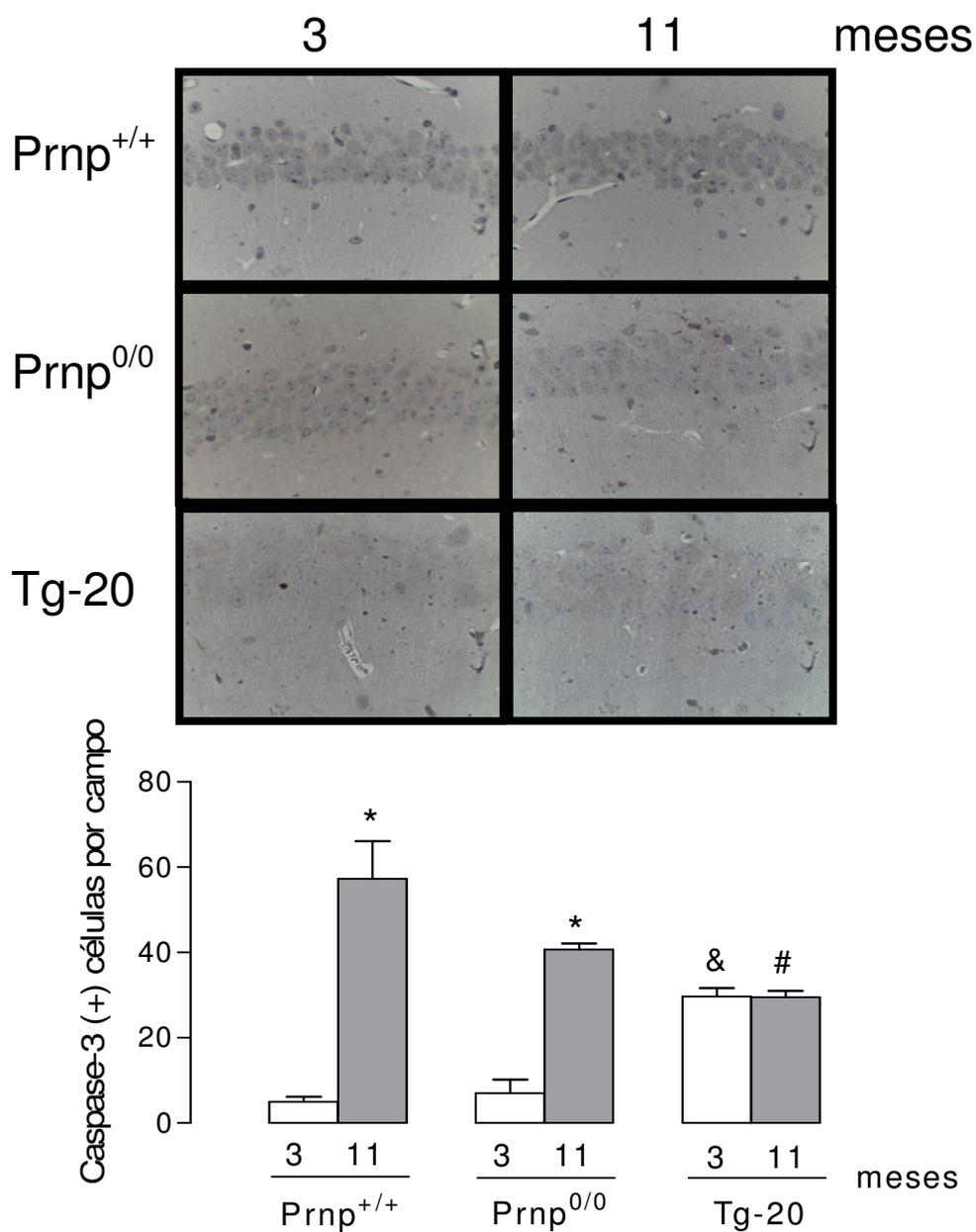


Figura 18 - Efeitos da idade e do genótipo sobre a ativação da proteína pró-apoptótica caspase-3 em camundongos Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} e Tg-20. Fotomicrografias representativas da região CA1 do hipocampo dos animais ($n =$ mínimo de 5 animais por grupo). * $P \leq 0.05$ comparado ao respectivo grupo de 3 meses de idade. # $P \leq 0.05$ comparado ao grupo Prnp^{+/+} de 11 meses de idade. & $P \leq 0.05$ comparado ao grupo Prnp^{+/+} de 3 meses de idade. (Teste de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os camundongos da linhagem Tg-20 que apresentam uma expressão aumentada da PrP^C são mais resistentes aos declínios locomotor, emocional e cognitivo relacionados ao envelhecimento em comparação aos animais Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+}. Camundongos Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+} de 11 meses de idade apresentaram uma redução importante da atividade locomotora como observado nos testes do campo aberto e da caixa de atividade, enquanto que camundongos Tg-20 conservaram o mesmo perfil de ambulação independente do fator idade. Padrão de resposta semelhante foi também observado na capacidade desses animais reconhecerem um camundongo jovem após curto período de tempo e em respostas relacionadas à ansiedade. De forma interessante, camundongos Tg-20 não apresentaram os mesmos prejuízos comportamentais relacionados à idade e a infusão intracerebroventricular do peptídeo 230-245 da STII, que inclui a porção de ligação à PrP^C, reverteu estes distúrbios de memória de curto prazo relacionados a idade em camundongos Prnp^{+/+}. Camundongos Tg-20 também exibiram níveis reduzidos de acetilcolinesterase sérica em comparação aos outros dois genótipos. Análises de imunohistoquímica revelaram aumento na expressão de proteínas hipocampais associadas à morte celular apoptótica e de plasticidade neuronal, respectivamente, caspase-3 e sinaptofisina, em camundongos Tg-20. Os resultados do presente estudo apóiam a hipótese da PrP^C apresentar papel neuroprotetor e sugerem seu envolvimento em algumas alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao envelhecimento via sistema colinérgico e modulação da sinaptogênese e morte celular apoptótica.

Considerando-se o descrito papel neuroprotetor da PrP^C e a função central desta proteína no controle do estresse oxidativo não é surpresa a aumentada resistência dos camundongos Tg-20 ao processo de envelhecimento. Como previamente descrito, em eventos hipóxicos e no envelhecimento, alguns tecidos, como mecanismo protetor, aumentam a

densidade de expressão da PrP^C evitando assim seu colapso fisiológico (Williams, Stadtman *et al.*, 2004). Previamente foi também descrito que camundongos Prnp^{0/0} seriam mais susceptíveis ao envelhecimento em processos cognitivos e locomotores em comparação aos animais Prnp^{+/+} (Coitinho, Roesler *et al.*, 2003; Nazor, Seward *et al.*, 2007). Contudo o presente trabalho tem a adicionar a presença dos animais Tg-20, além de análises neuroquímicas e comportamentais não contempladas anteriormente.

No presente estudo, quando os 3 genótipos de 3 e 11 meses de idade foram expostos aos paradigmas locomotores, o fator idade foi aparentemente relevante. Considerando-se a soma dos parâmetros locomotores, fica claro a real relação entre a presença de PrP^C e a capacidade locomotora em animais de 11 meses de idade, provavelmente pela ausência por este longo período de uma proteína tão importante para prevenção de eventos relacionados ao estresse oxidativo e também para correta função da junção neuromuscular. Ainda, doenças priônicas como a Kuru e a Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) possuem características de perda do controle locomotor, talvez explicada pela perda da função da PrP^C em neurônios de Purkinje (Nazor, Seward *et al.*, 2007).

O sistema colinérgico, como citado na Introdução, é um dos mais importantes sistemas de neurotransmissão envolvidos no envelhecimento. Considerando esta hipótese, a manutenção das capacidades cognitivas e locomotoras em relação aos níveis de AChE em camundongos Tg-20 poderia ser explicada pela diferença entre a concentração de acetilcolina circulante nas três linhagens de camundongos. As inter-relações entre o sistema colinérgico e a PrP^C foram sugeridas devido a localização da proteína prion celular na junção neuromuscular (Gohel, Grigoriev *et al.*, 1999) e a co-imunoprecipitação com a subunidade β -4 do receptor nicotínico no cérebro humano. Além disso, tem-se sugerido que a PrP^C possua a propriedade de regular o número de receptores colinérgicos na junção neuromuscular e no SNC (Harris, Lele *et al.*, 1993).

Nico e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos nocautes para PrP^C apresentavam diminuídos níveis de ansiedade em comparação com o grupo controle depois de duas diferentes formas de estresse agudo (choque elétrico nas patas e natação), sugerindo o envolvimento da PrP^C na modulação da ansiedade depois do estresse agudo e que este efeito poderia acontecer por influência direta nos circuitos límbicos. Sob condições basais e de acordo com resultados anteriores (Roesler, Walz *et al.*, 1999; Nico, De-Paris *et al.*, 2005) nós não observamos diferentes níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado entre camundongos Prnp^{0/0}, Prnp^{+/+} e Tg-20 de 3 meses sugerindo que a PrP^C não tem relação direta com este comportamento nesta idade. Por outro lado, observamos que animais Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+} de 11 meses apresentaram um aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado. Este fenômeno relacionado à idade foi previamente descrito por vários trabalhos (Imhof, Coelho *et al.*, 1993; Ferguson e Gray, 2005; Chen, Wang *et al.*, 2007). De forma contrária, camundongos Tg-20 de 11 meses mostraram comportamento semelhante aos animais de 3 meses aparentemente sugerindo um retardo no envelhecimento emocional.

Está bem estabelecido que as memórias podem ser classificadas de acordo com sua duração em memória de trabalho (memória imediata, durando segundos ou poucos minutos), memória de curto prazo (que desenvolve-se em poucos segundos ou minutos e dura por algumas horas) e a memória de longo prazo (que consolida-se lentamente e é relativamente permanente) (Izquierdo, Medina *et al.*, 1999). De fato, memórias de curto e longo prazo são identificadas como entidades distintas (Izquierdo, Barros *et al.*, 1998). Estes diferentes tipos de memória podem ser avaliados em estudos animais em diferentes tarefas comportamentais.

Como descrito por Dantzer *et al.* (1987), uma forma de memória muito similar à memória factual em humanos que tem recebido pouca atenção na farmacologia comportamental é a chamada “memória social” ou “paradigma de reconhecimento”, que é

geralmente baseada em pistas olfatórias. Este modelo de memória se baseia no fato de que roedores passam mais tempo investigando outros roedores não-familiares jovens mais intensamente que os familiares jovens. Quando o mesmo jovem é reapresentado, a duração da investigação é reduzida. A memória social é prolongada pela exposição repetida a estímulos do roedor jovem e é encurtada por estímulos interferentes retroativos. Pode ser facilitada pela administração de drogas facilitadoras da memória e interrompida por modelos farmacológicos e patofisiológicos conhecidos por causarem déficits em roedores (Perio, Terranova *et al.*, 1989; Prediger, Da Cunha *et al.*, 2005; Prediger, De-Mello *et al.*, 2006). Em contraste com a maioria das outras formas de aprendizado e memória acessadas em roedores, a memória de reconhecimento social é mais duradoura que em outros testes de memória de trabalho, mas mais curta que várias outras formas de memória como as formas declarativas, emocionais ou espaciais que podem ser detectadas 24h depois da fase de condicionamento. De certa forma, o presente estudo reforça achados prévios onde a deleção do gene para PrP^C causa prejuízos na memória de reconhecimento social, mas não a esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO *step-down* (Xikota, Rial *et al.*, 2008). O processo de envelhecimento parece modular o paradigma de reconhecimento em camundongos Prnp^{+/+}, enquanto que a superexpressão da mesma proteína não foi prejudicada por este evento. Considerando-se diferentes mecanismos para diferentes tipos de memória, nossos resultados indicam um prejuízo seletivo em memórias de curto, mas não de longo prazo, como pode ser observado no teste de reconhecimento social e na esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO *step-down*, respectivamente.

Estudos prévios investigando o desempenho cognitivo de camundongos nocaute para o gene Prnp têm sido inconsistentes, com parte dos autores demonstrando que camundongos nulos para produção de PrP^C apresentam prejuízos de aprendizado e memória (Nishida, Katamine *et al.*, 1997; Coitinho, Roesler *et al.*, 2003; Criado, Sanchez-Alavez *et al.*, 2005), enquanto outros não tem relatado diferenças comportamentais significativas (Bueler, Fischer

et al., 1992; Roesler, Walz *et al.*, 1999). Notadamente, dados gerados de estudos com animais geneticamente modificados são ainda controversos pelo tipo de deleção gênica, *background* genético e mecanismos compensatórios que podem modular o desempenho cognitivo (Linden, Martins *et al.*, 2008). Estes fatos levantam a dúvida se as deficiências observadas são provenientes da mutação gênica do gene *Prnp*, ou se outro gene ou genes podem estar envolvidos. Devemos lembrar que o criticismo as respostas comportamentais desempenhados com os animais *Prnp*^{0/0} devem-se a apresentarem um *background* misto (129/Sv×C57BL/6J). De qualquer modo a esta crítica, utilizamos o controle correspondente de mesmo *background* e com prévio e posterior controle genético. Ainda tentando isolar a participação da PrP^C em respostas cognitivas fizemos uso de ferramenta farmacológica para confirmar ou descartar estes resultados. Confirmando os resultados obtidos com os animais geneticamente modificados, o acesso farmacológico obteve sucesso na recuperação dos déficits cognitivos relacionados à idade, indicando o papel da PrP^C na modulação de eventos mnemônicos específicos. A porção 230–245 (representada pelo PepSTII₂₃₀₋₂₄₅) da STII representa o domínio de ligação para a PrP^C e a interação entre estas proteínas ativam mecanismos intracelulares como da MAPK e PKA (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Lopes, Hajj *et al.*, 2005). Estas cascatas são consideradas de importância crucial em processos cognitivos (Izquierdo, Barros *et al.*, 1998). Na ausência deste domínio de ligação o peptídeo PepSTII₄₂₂₋₄₃₇ aparentemente não foi suficiente para ativar estes mecanismos não apresentando efeito no paradigma do reconhecimento social.

Ainda, sobre o teste de reconhecimento social, é evidente a necessidade de a função olfatória estar intacta para que este seja interpretado sem interferências. Sob este aspecto estudos prévios demonstram que os animais das três linhagens deste estudo apresentam capacidade olfatória normal (Lobao-Soares, Walz *et al.*, 2008).

Nos níveis de sinaptofisina, camundongos Tg-20 de 3 e 11 meses mostraram níveis aumentados em comparação com camundongos Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+}, indicando expressão superior desta proteína pré-sináptica, frequentemente relacionada à plasticidade sináptica e a sinaptogênese (Lively e Brown, 2008; Nithianantharajah e Murphy, 2008). Na mesma direção os níveis de caspase-3 mostraram-se diminuídos em animais Tg-20 de 11 meses quando comparado aos outros grupos de 11 meses indicando diminuição dos níveis de morte apoptótica no mesmo período de tempo. De fato, camundongos Tg-20 de 3 meses de idade também apresentaram maior ativação de caspase-3. Este dado pode ser explicado por estudos prévios que descrevem a relação entre a superexpressão da PrP^C e a aumentada ativação da proteína pró-apoptótica caspase-3 via Mdm2 e p53, mecanismos estes moduladores da atividade apoptótica (Paitel, Alves Da Costa *et al.*, 2002; Paitel, Fahraeus *et al.*, 2003; Sunyach e Checler, 2005) em trabalhos *in vitro* e *in vivo*. Nos trabalhos acima citados é interessante notar que apesar do aumento da expressão de mecanismos tidos como pró-apoptóticos, foi observado pelos autores que a PrP^C não deixou, mesmo em situações críticas (como por exemplo a adição de estaurosporina) de emitir sinais de neuroproteção, porém pode-se supor que talvez a indução do mecanismo de apoptose seja de fato neuroprotetivo. Como citado anteriormente quando em situação de agressão, o tecido cerebral parece aumentar a expressão de PrP^C para evitar seu colapso, pode-se talvez inferir que percebendo a severidade do insulto acontece a indução da sinalização apoptótica afim de evitar processos como a necrose, que envolveria maior acometimento deste tecido.

De qualquer forma, a superexpressão da PrP^C e o consequente aumento da atividade da caspase-3 não provocou nenhuma disfunção comportamental nos referidos animais. Talvez, em nível funcional, o aumentado nível de morte celular apoptótica seja de alguma forma compensado pelo alto nível de sinaptogênese e/ou renovação celular indicado pelo aumento quantitativo na expressão da proteína sinaptofisina.

Não se pode ignorar a hipótese de que além da modulação dos sistemas aqui comentados, outros sistemas, como o sistema glutamatérgico, que aparentemente mantêm uma estreita relação com a PrP^C, e que também está envolvido no processo de envelhecimento poderia então ser parcialmente responsável por estas respostas, mas futuras investigações são necessárias para se confirmar ou descartar esta hipótese (Khosravani, Zhang *et al.*, 2008).

Conjuntamente, os resultados do presente trabalho indicam que a PrP^C tem papel fundamental no processo de envelhecimento, onde a superexpressão desta proteína é capaz de retardar o processo de envelhecimento nos parâmetros avaliados neste estudo. Além disso, nossos achados reforçam o papel da PrP^C em mecanismos específicos de memória com ferramentas genéticas e farmacológicas. Estudos futuros são necessários para precisamente quantificar o retardo no envelhecimento encontrado neste estudo em camundongos Tg-20, e também amplificar a exposição destas ferramentas a outros paradigmas cognitivos para adicionar ou descartar outros mecanismos mnemônicos modulados pela PrP^C.

6. CONCLUSÕES

- O desempenho locomotor dos camundongos de 11 meses de idade parece estar diretamente relacionado à densidade de expressão da PrP^C;
- A PrP^C parece modular a memória de curto mas não a de longo prazo, a adição de peptídeo com o domínio de ligação e ativador da interação PrP^C/STII reverte os prejuízos cognitivos adquiridos com a idade;
- Camundongos da linhagem Tg-20 de 11 meses de idade parecem ser mais resistentes a alterações comportamentais e neuroquímicas em comparação aos animais Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} da mesma idade;
- Esta maior resistência observada nos animais Tg-20 pode residir em maiores taxas de plasticidade neural e/ou menor taxa de degradação colinérgica.

Artigo científico referente a esta dissertação:

RIAL, D., Duarte, F.S., Xikota, J.C., Schmitz, A.E., Dafré, A.L., Figueiredo, C.P., Walz, R., Prediger, R.D.S. Cellular prion protein (PrP^C) modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice; Submetido à *Neurobiology of Aging*.

Outros artigos publicados neste período:

Xikota, J. C., RIAL, D., Ruthes, D., Pereira, R., Figueiredo, C.P., Prediger, R.D.S., Walz, R.. Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein. *Brain Res*, Sep 24. 2008.

RIAL, D., R. N. Takahashi, G. S. Morato. Aniracetam and DNQX affect the acquisition of rapid tolerance to ethanol in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, Oct 25. 2008.

Prediger, R.D.S., M. S. Fernandes, RIAL, D., Wopereis, S., Pereira, V.S., Bosse, T.S., Da Silva C.B., Carradore, R.S., Machado M.S., Cechinel-Filho, V., Costa-Campos, L. . Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol*, v.120, n.3, Dec 8, p.465-73. 2008.

RIAL, D., Xikota, J.C., Miozzo, A., Cruz, V. E. A., Prediger, R. D. S., Walz, R. Differential gender-related susceptibility to learning and memory deficits in mice submitted to neonatal freezing microgyria model. *Brain research bulletin*, "In press".

Prediger R. D. S., RIAL, D., Medeiros R., Figueiredo C.P., Doty, R.L. Takahashi, R.N. The risk is in the air: intranasal MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. "In press".

REFERÊNCIAS

- Aguzzi, A. e C. Haass. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. Science, v.302, n.5646, Oct 31, p.814-8. 2003.
- Almaguer-Melian, W., R. Cruz-Aguado, *et al.* Effect of LTP-reinforcing paradigms on neurotransmitter release in the dentate gyrus of young and aged rats. Biochem Biophys Res Commun, v.327, n.3, Feb 18, p.877-83. 2005.
- Altavista, M. C., P. Rossi, *et al.* Aging is associated with a diffuse impairment of forebrain cholinergic neurons. Brain Res, v.508, n.1, Jan 29, p.51-9. 1990.
- Andrews-Hanna, J. R., A. Z. Snyder, *et al.* Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. Neuron, v.56, n.5, Dec 6, p.924-35. 2007.
- Atri, A., S. Sherman, *et al.* Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. Behav Neurosci, v.118, n.1, Feb, p.223-36. 2004.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, *et al.* The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, v.217, n.4558, Jul 30, p.408-14. 1982.
- Basler, K., B. Oesch, *et al.* Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell, v.46, n.3, Aug 1, p.417-28. 1986.
- Baune, B. T., G. Ponath, *et al.* Association between IL-8 cytokine and cognitive performance in an elderly general population--the MEMO-Study. Neurobiol Aging, v.29, n.6, Jun, p.937-44. 2008.
- Baxter, M. G., K. M. Frick, *et al.* Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. Neuroscience, v.89, n.3, Mar, p.771-9. 1999.
- Beckman, K. B. e B. N. Ames. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev, v.78, n.2, Apr, p.547-81. 1998.
- Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nat Rev Genet, v.6, n.8, Aug, p.611-22. 2005.
- Bolton, D. C., M. P. Mckinley, *et al.* Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. Science, v.218, n.4579, Dec 24, p.1309-11. 1982.
- Borchelt, D. R., M. Scott, *et al.* Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. J Cell Biol, v.110, n.3, Mar, p.743-52. 1990.
- Broks, P., G. C. Preston, *et al.* Modelling dementia: effects of scopolamine on memory and attention. Neuropsychologia, v.26, n.5, p.685-700. 1988.
- Brown, D. R., K. Qin, *et al.* The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature, v.390, n.6661, Dec 18-25, p.684-7. 1997.

- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, *et al.* Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. Exp Neurol, v.146, n.1, Jul, p.104-12. 1997.
- Brown, D. R., B. S. Wong, *et al.* Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. Biochem J, v.344 Pt 1, Nov 15, p.1-5. 1999.
- Bueler, H., A. Aguzzi, *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell, v.73, n.7, Jul 2, p.1339-47. 1993.
- Bueler, H., M. Fischer, *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature, v.356, n.6370, Apr 16, p.577-82. 1992.
- Butterfield, D. A. e J. Kanski. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. Mech Ageing Dev, v.122, n.9, Jul 15, p.945-62. 2001.
- Buttini, M., M. Orth, *et al.* Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. J Neurosci, v.19, n.12, Jun 15, p.4867-80. 1999.
- Carobrez, A. P. e L. J. Bertoglio. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev, v.29, n.8, p.1193-205. 2005.
- Caughey, B., D. A. Kocisko, *et al.* Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. Chem Biol, v.2, n.12, Dec, p.807-17. 1995.
- Chaimowicz, F. [Health of Brazilian elderly just before of the 21st century: current problems, forecasts and alternatives]. Rev Saude Publica, v.31, n.2, Apr, p.184-200. 1997.
- Chen, G. H., C. Wang, *et al.* Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. Physiol Behav, v.91, n.5, Aug 15, p.644-51. 2007.
- Chen, S., A. Mange, *et al.* Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. Mol Cell Neurosci, v.22, n.2, Feb, p.227-33. 2003.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. Embo J, v.21, n.13, Jul 1, p.3317-26. 2002.
- Coitinho, A. S., A. R. Freitas, *et al.* The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. Eur J Neurosci, v.24, n.11, Dec, p.3255-64. 2006.
- Coitinho, A. S., R. Roesler, *et al.* Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. Neuroreport, v.14, n.10, Jul 18, p.1375-9. 2003.
- Colling, S. B., J. Collinge, *et al.* Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca²⁺-activated K⁺ currents. Neurosci Lett, v.209, n.1, May 3, p.49-52. 1996.

Colling, S. B., M. Khana, *et al.* Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. Brain Res, v.755, n.1, Apr 25, p.28-35. 1997.

Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, *et al.* Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. Neurobiol Dis, v.19, n.1-2, Jun-Jul, p.255-65. 2005.

Cruz, A. P., F. Frei, *et al.* Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.49, n.1, Sep, p.171-6. 1994.

Dantzer, R., R. M. Bluthe, *et al.* Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. Psychopharmacology (Berl), v.91, n.3, p.363-8. 1987.

Diener, T. O., M. P. McKinley, *et al.* Viroids and prions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.17, Sep, p.5220-4. 1982.

Dreher, J. C., A. Meyer-Lindenberg, *et al.* Age-related changes in midbrain dopaminergic regulation of the human reward system. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.39, Sep 30, p.15106-11. 2008.

Egan, M. F., M. Kojima, *et al.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell, v.112, n.2, Jan 24, p.257-69. 2003.

Ellis, V., M. Daniels, *et al.* Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. Biochemistry, v.41, n.22, Jun 4, p.6891-6. 2002.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, v.7, Jul, p.88-95. 1961.

Ferguson, S. A. e E. P. Gray. Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats. Physiol Behav, v.85, n.5, Aug 7, p.621-8. 2005.

Ferrer, I., R. Blanco, *et al.* Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, v.101, n.1, Jan, p.49-56. 2001.

Fischer, M., T. Rulicke, *et al.* Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. Embo J, v.15, n.6, Mar 15, p.1255-64. 1996.

Gallagher, M. e P. J. Colombo. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. Curr Opin Neurobiol, v.5, n.2, Apr, p.161-8. 1995.

Gauczynski, S., J. M. Peyrin, *et al.* The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. Embo J, v.20, n.21, Nov 1, p.5863-75. 2001.

Gohel, C., V. Grigoriev, *et al.* Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) at the neuromuscular junction. J Neurosci Res, v.55, n.2, Jan 15, p.261-7. 1999.

- Gonzalez-Iglesias, R., M. A. Pajares, *et al.* Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. J Mol Biol, v.319, n.2, May 31, p.527-40. 2002.
- Gorbunova, V., A. Seluanov, *et al.* Changes in DNA repair during aging. Nucleic Acids Res, v.35, n.22, p.7466-74. 2007.
- Griffiths, R. A., W. R. Good, *et al.* Depression, dementia and disability in the elderly. Br J Psychiatry, v.150, Apr, p.482-93. 1987.
- Hainfellner, J. A., J. Wanschitz, *et al.* Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. Acta Neuropathol, v.96, n.2, Aug, p.116-22. 1998.
- Harris, D. A., D. L. Falls, *et al.* A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.17, Sep 1, p.7664-8. 1991.
- Harris, D. A., P. Lele, *et al.* Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.9, May 1, p.4309-13. 1993.
- Hasselmo, M. E. e E. Barkai. Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. J Neurosci, v.15, n.10, Oct, p.6592-604. 1995.
- Head, E., M. M. Corrada, *et al.* Synaptic proteins, neuropathology and cognitive status in the oldest-old. Neurobiol Aging, Nov 12. 2007.
- Heinz, A. e M. N. Smolka. The effects of catechol O-methyltransferase genotype on brain activation elicited by affective stimuli and cognitive tasks. Rev Neurosci, v.17, n.3, p.359-67. 2006.
- Henskens, L. H., A. A. Kroon, *et al.* Associations of the angiotensin II type 1 receptor A1166C and the endothelial NO synthase G894T gene polymorphisms with silent subcortical white matter lesions in essential hypertension. Stroke, v.36, n.9, Sep, p.1869-73. 2005.
- Huerta, P. T. e J. E. Lisman. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. Nature, v.364, n.6439, Aug 19, p.723-5. 1993.
- IBGE. Dados sobre a população. Idade e sexo: 1 2004.
- Imhof, J. T., Z. M. Coelho, *et al.* Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. Behav Brain Res, v.56, n.2, Sep 30, p.177-80. 1993.
- Izquierdo, I., D. M. Barros, *et al.* Mechanisms for memory types differ. Nature, v.393, n.6686, Jun 18, p.635-6. 1998.
- Izquierdo, I., J. H. Medina, *et al.* Separate mechanisms for short- and long-term memory. Behav Brain Res, v.103, n.1, Aug, p.1-11. 1999.

Jacobson, L., R. Zhang, *et al.* Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. Exp Gerontol, Aug 12. 2008.

Kalache, A. e I. Keller. The greying world: a challenge for the twenty-first century. Sci Prog, v.83 (Pt 1), p.33-54. 2000.

Kalamida, D., K. Poulas, *et al.* Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. Febs J, v.274, n.15, Aug, p.3799-845. 2007.

Kay, D. W., A. S. Henderson, *et al.* Dementia and depression among the elderly living in the Hobart community: the effect of the diagnostic criteria on the prevalence rates. Psychol Med, v.15, n.4, Nov, p.771-88. 1985.

Keshet, G. I., O. Bar-Peled, *et al.* The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. J Neurochem, v.75, n.5, Nov, p.1889-97. 2000.

Khosravani, H., Y. Zhang, *et al.* Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. J Cell Biol, v.181, n.3, May 5, p.551-65. 2008.

Kim, S. R., J. H. Park, *et al.* Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. Mech Ageing Dev, Sep 20. 2008.

Kretzschmar, H. A., L. E. Stowring, *et al.* Molecular cloning of a human prion protein cDNA. DNA, v.5, n.4, Aug, p.315-24. 1986.

Kuwata, K., N. Nishida, *et al.* Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.29, Jul 17, p.11921-6. 2007.

Lamar, M., W. J. Cutter, *et al.* 5-HT, prefrontal function and aging: fMRI of inhibition and acute tryptophan depletion. Neurobiol Aging, Nov 29. 2007.

Lee, K. S., A. C. Magalhaes, *et al.* Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. J Neurochem, v.79, n.1, Oct, p.79-87. 2001.

Leucht, C., S. Simoneau, *et al.* The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. EMBO Rep, v.4, n.3, Mar, p.290-5. 2003.

Li, Y., A. Grupe, *et al.* DAPK1 variants are associated with Alzheimer's disease and allele-specific expression. Hum Mol Genet, v.15, n.17, Sep 1, p.2560-8. 2006.

Liao, Y. C., Z. Tokes, *et al.* Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. Lab Invest, v.57, n.4, Oct, p.370-4. 1987.

Licastro, F., E. Porcellini, *et al.* Genetic risk profiles for Alzheimer's disease: integration of APOE genotype and variants that up-regulate inflammation. Neurobiol Aging, v.28, n.11, Nov, p.1637-43. 2007.

Linden, R., V. R. Martins, *et al.* Physiology of the prion protein. Physiol Rev, v.88, n.2, Apr, p.673-728. 2008.

Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl), v.92, n.2, p.180-5. 1987.

Lively, S. e I. R. Brown. Localization of the extracellular matrix protein SC1 coincides with synaptogenesis during rat postnatal development. Neurochem Res, v.33, n.9, Sep, p.1692-700. 2008.

Lobao-Soares, B., R. Walz, *et al.* Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. Behav Brain Res, v.183, n.1, Oct 1, p.87-94. 2007.

_____. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. Behav Brain Res, v.194, n.2, Dec 12, p.129-37. 2008.

Locht, C., B. Chesebro, *et al.* Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.17, Sep, p.6372-6. 1986.

Lopes, M. H., G. N. Hajj, *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. J Neurosci, v.25, n.49, Dec 7, p.11330-9. 2005.

Lynch, G., C. S. Rex, *et al.* Synaptic plasticity in early aging. Ageing Res Rev, v.5, n.3, Aug, p.255-80. 2006.

Ma, J. e S. Lindquist. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.26, Dec 18, p.14955-60. 2001.

Mallucci, G. e J. Collinge. Rational targeting for prion therapeutics. Nat Rev Neurosci, v.6, n.1, Jan, p.23-34. 2005.

Martins, V. R., R. Linden, *et al.* Cellular prion protein: on the road for functions. FEBS Lett, v.512, n.1-3, Feb 13, p.25-8. 2002.

Masliah, E., L. Crews, *et al.* Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, v.9, n.3 Suppl, p.91-9. 2006.

Masliah, E., M. Ellisman, *et al.* Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol, v.51, n.4, Jul, p.404-14. 1992.

Masuda, H., H. Chikuda, *et al.* Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. Mech Ageing Dev, v.126, n.12, Dec, p.1274-83. 2005.

Mattay, V. S., T. E. Goldberg, *et al.* Neurobiology of cognitive aging: insights from imaging genetics. Biol Psychol, v.79, n.1, Sep, p.9-22. 2008.

Mattson, M. P., W. Duan, *et al.* Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. Neurobiol Aging, v.23, n.5, Sep-Oct, p.695-705. 2002.

McIlwain, K. L., M. Y. Merriweather, *et al.* The use of behavioral test batteries: effects of training history. Physiol Behav, v.73, n.5, Aug, p.705-17. 2001.

Meggio, F., A. Negro, *et al.* Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. Biochem J, v.352 Pt 1, Nov 15, p.191-6. 2000.

Meotti, F. C., C. L. Carqueja, *et al.* Involvement of cellular prion protein in the nociceptive response in mice. Brain Res, v.1151, Jun 2, p.84-90. 2007.

Miyazono, M., T. Kitamoto, *et al.* Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. Acta Neuropathol, v.83, n.4, p.333-9. 1992.

Moore, L., X. Lu, *et al.* Aging-associated truncated form of p53 interacts with wild-type p53 and alters p53 stability, localization, and activity. Mech Ageing Dev, v.128, n.11-12, Nov-Dec, p.717-30. 2007.

Muller, M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. Antioxid Redox Signal, v.11, n.1, Jan, p.59-98. 2009.

Myers, C. P., J. W. Lewcock, *et al.* Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits. Neuron, v.46, n.1, Apr 7, p.37-49. 2005.

Nagai, T., K. Yamada, *et al.* Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. Faseb J, v.17, n.1, Jan, p.50-2. 2003.

Nazor, K. E., T. Seward, *et al.* Motor behavioral and neuropathological deficits in mice deficient for normal prion protein expression. Biochim Biophys Acta, v.1772, n.6, Jun, p.645-53. 2007.

Nico, P. B., F. De-Paris, *et al.* Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. Behav Brain Res, v.162, n.2, Jul 30, p.173-81. 2005.

Nishida, N., S. Katamine, *et al.* Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. Cell Mol Neurobiol, v.17, n.5, Oct, p.537-45. 1997.

Nithianantharajah, J. e M. Murphy. Auditory specific fear conditioning results in increased levels of synaptophysin in the basolateral amygdala. Neurobiol Learn Mem, v.90, n.1, Jul, p.36-43. 2008.

Opas/Oms. Dados sobre a população pan-americana. www.cedoc-opas.bvs.br/php/level.php?lang=pt&component=17&item=2: 1. 1: 1 p. 2002.

- Paitel, E., C. Alves Da Costa, *et al.* Overexpression of PrP^c triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. J Neurochem, v.83, n.5, Dec, p.1208-14. 2002.
- Paitel, E., R. Fahraeus, *et al.* Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. J Biol Chem, v.278, n.12, Mar 21, p.10061-6. 2003.
- Pan, K. M., M. Baldwin, *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.23, Dec 1, p.10962-6. 1993.
- Papassotiropoulos, A., D. A. Stephan, *et al.* Common Kibra alleles are associated with human memory performance. Science, v.314, n.5798, Oct 20, p.475-8. 2006.
- Paquet, C., N. Privat, *et al.* Cerebral amyloid angiopathy with co-localization of prion protein and beta-amyloid in an 85-year-old patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Acta Neuropathol, v.116, n.5, Nov, p.567-73. 2008.
- Pera, M., S. Roman, *et al.* Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106-126. Biochem Biophys Res Commun, v.346, n.1, Jul 21, p.89-94. 2006.
- Perio, A., J. P. Terranova, *et al.* Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants. Psychopharmacology (Berl), v.97, n.2, p.262-8. 1989.
- Perry, J. J., L. Fan, *et al.* Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and DNA repair. Neuroscience, v.145, n.4, Apr 14, p.1280-99. 2007.
- Petrakis, S., T. Irinopoulou, *et al.* Cellular prion protein co-localizes with nAChR beta4 subunit in brain and gastrointestinal tract. Eur J Neurosci, v.27, n.3, Feb, p.612-20. 2008.
- Pollack, M., S. Phaneuf, *et al.* The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. Ann N Y Acad Sci, v.959, Apr, p.93-107. 2002.
- Prediger, R. D., L. C. Batista, *et al.* Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. Eur J Pharmacol, v.499, n.1-2, Sep 19, p.147-54. 2004.
- Prediger, R. D., C. Da Cunha, *et al.* Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. Behav Pharmacol, v.16, n.4, Jul, p.209-18. 2005.
- Prediger, R. D., N. De-Mello, *et al.* Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. Eur J Pharmacol, v.531, n.1-3, Feb 15, p.176-82. 2006.

Prediger, R. D., J. L. Franco, *et al.* Differential susceptibility following beta-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, v.177, n.2, Feb 27, p.205-13. 2007.

Prediger, R. D. e R. N. Takahashi. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. Eur J Pharmacol, v.462, n.1-3, Feb 21, p.115-23. 2003.

Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science, v.216, n.4542, Apr 9, p.136-44. 1982a.

_____. Research on scrapie. Lancet, v.2, n.8296, Aug 28, p.494-5. 1982b.

_____. Molecular biology of prion diseases. Science, v.252, n.5012, Jun 14, p.1515-22. 1991.

Prusiner, S. B., M. R. Scott, *et al.* Prion protein biology. Cell, v.93, n.3, May 1, p.337-48. 1998.

Rachidi, W., D. Vilette, *et al.* Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. J Biol Chem, v.278, n.11, Mar 14, p.9064-72. 2003.

Reiss, D., J. Wichmann, *et al.* Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) agonist, Ro64-6198, on reactivity to acute pain in mice: comparison to morphine. Eur J Pharmacol, v.579, n.1-3, Jan 28, p.141-8. 2008.

Roesler, R., R. Walz, *et al.* Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). Brain Res Mol Brain Res, v.71, n.2, Aug 25, p.349-53. 1999.

Rogaeva, E., Y. Meng, *et al.* The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. Nat Genet, v.39, n.2, Feb, p.168-77. 2007.

Rollo, C. D. Dopamine and Aging: Intersecting Facets. Neurochem Res, Oct 8. 2008.

Schmitt-Ulms, G., G. Legname, *et al.* Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. J Mol Biol, v.314, n.5, Dec 14, p.1209-25. 2001.

Schwarze-Eicker, K., K. Keyvani, *et al.* Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. Neurobiol Aging, v.26, n.8, Aug-Sep, p.1177-82. 2005.

Shawi, M. e C. Autexier. Telomerase, senescence and ageing. Mech Ageing Dev, v.129, n.1-2, Jan-Feb, p.3-10. 2008.

Shitara, S., M. Kakeda, *et al.* Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector. Biochem Biophys Res Commun, v.369, n.3, May 9, p.807-11. 2008.

Sieb, J. P. Myasthenia gravis: emerging new therapy options. Curr Opin Pharmacol, v.5, n.3, Jun, p.303-7. 2005.

Smith, C. D., A. H. Andersen, *et al.* Women at risk for AD show increased parietal activation during a fluency task. Neurology, v.58, n.8, Apr 23, p.1197-202. 2002.

Sonntag, W. E., C. D. Lynch, *et al.* Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. Neuroscience, v.88, n.1, Jan, p.269-79. 1999.

Soti, C. e P. Csermely. Aging cellular networks: chaperones as major participants. Exp Gerontol, v.42, n.1-2, Jan-Feb, p.113-9. 2007.

Spudich, A., R. Frigg, *et al.* Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. Neurobiol Dis, v.20, n.2, Nov, p.442-9. 2005.

Steele, A. D., J. G. Emsley, *et al.* Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.9, Feb 28, p.3416-21. 2006.

Stichel, C. C. e H. Luebbert. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. Neurobiol Aging, v.28, n.10, Oct, p.1507-21. 2007.

Sunyach, C. e F. Checler. Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. J Neurochem, v.92, n.6, Mar, p.1399-407. 2005.

Swerdlow, R. H. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? Neurobiol Aging, v.28, n.10, Oct, p.1465-80. 2007.

Tobler, I., S. E. Gaus, *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature, v.380, n.6575, Apr 18, p.639-42. 1996.

Tyner, S. D., S. Venkatachalam, *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature, v.415, n.6867, Jan 3, p.45-53. 2002.

Wang, V., T. C. Chuang, *et al.* Octarepeat changes of prion protein in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, May 1. 2008.

Warner, R. G., C. Hundt, *et al.* Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. J Biol Chem, v.277, n.21, May 24, p.18421-30. 2002.

Weise, J., R. Sandau, *et al.* Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. Stroke, v.37, n.5, May, p.1296-300. 2006.

Westaway, D., P. A. Goodman, *et al.* Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. Cell, v.51, n.4, Nov 20, p.651-62. 1987.

Williams, W. M., E. R. Stadtman, *et al.* Ageing and exposure to oxidative stress in vivo differentially affect cellular levels of PrP in mouse cerebral microvessels and brain parenchyma. Neuropathol Appl Neurobiol, v.30, n.2, Apr, p.161-8. 2004.

Wu, D., C. Mura, *et al.* Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. Am J Physiol, v.275, n.3 Pt 1, Sep, p.C661-8. 1998.

Xikota, J. C., D. Rial, *et al.* Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein. Brain Res, Sep 24. 2008.

Ypsilanti, A. R., M. T. Girao Da Cruz, *et al.* The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. Neurobiol Aging, v.29, n.11, Nov, p.1666-79. 2008.

Zanata, S. M., M. H. Lopes, *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. Embo J, v.21, n.13, Jul 1, p.3307-16. 2002.

Zhang, Y., E. Chong, *et al.* Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs. Exp Gerontol, v.37, n.6, Jun, p.777-89. 2002.