

## Lítio crônico potencializa a sobrevivência de novas células induzida por enriquecimento ambiental no hipocampo de camundongos adultos\*

### Chronic lithium potentiates enrichment-induced survival of new cells in the hippocampus of adult mice

Fabiana Gadotti Cerulli<sup>1</sup>, Hélio Oliveira Ximenes de Souza<sup>1</sup>,  
Wagner Farid Gattaz<sup>2</sup>, Evelin Lisete Schaeffer<sup>3</sup>

Cerulli FG, Souza HOX, Gattaz WF, Schaeffer EL. Lítio crônico potencializa a sobrevivência de novas células induzida por enriquecimento ambiental no hipocampo de camundongos adultos. / Chronic lithium potentiates enrichment-induced survival of new cells in the hippocampus of adult mice. Rev Med (São Paulo). 2013 jan.-mar.;92(1):78-80.

**RESUMO:** Com a descoberta nas últimas décadas de que neurogênese (nascimento de novos neurônios) persiste no cérebro adulto, surgiu a hipótese de que doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer poderiam ser superadas, ou pelo menos melhoradas, uma vez que a geração de novos neurônios poderia ajudar a compensar a perda de neurônios nessas doenças. De fato, a neuroproliferação está aumentada no cérebro de sujeitos com doença de Alzheimer, mas os novos neurônios falham em sobreviver e se diferenciar em células maduras. O objetivo deste trabalho foi examinar o efeito isolado bem como o efeito combinado de carbonato de lítio (2,0 g/kg de ração) e enriquecimento ambiental (com estimulação cognitiva e física) sobre a sobrevivência de novas células geradas no hipocampo de camundongos adultos. Camundongos C57Bl/6 de 3 meses de idade no início do estudo foram submetidos por 4 semanas à uma das seguintes condições de tratamento: (a) Ambiente Convencional sem Lítio (n = 7); (b) Ambiente Convencional mais Lítio (n = 7); (c) Ambiente Enriquecido sem Lítio (n = 7); e (d) Ambiente Enriquecido mais Lítio (n = 6). Imediatamente antes do início dos tratamentos, os animais receberam injeção intraperitoneal de BrdU, um marcador de proliferação celular. Vinte e seis dias após o início dos tratamentos, foi coletado sangue da cauda dos

animais para medidas de litemia. Vinte e oito dias após a injeção de BrdU, os animais foram sacrificados através de perfusão intracardiaca seguida por fixação com paraformaldeído 4%, para verificação da sobrevivência de células proliferativas. Os cérebros fixados foram cortados em criostato em cortes seriais adjacentes de 60  $\mu\text{m}$ , e os cortes foram processados para marcação imunohistoquímica para BrdU. O número de células BrdU-positivas (BrdU+) foi contado no giro denteado do hipocampo com o uso de um microscópio de luz e objetiva de imersão (aumento 100x). O tratamento com carbonato de lítio por 4 semanas resultou em litemia média de 0,65 mmol/L, portanto, dentro da faixa terapêutica que é entre 0,5 e 1,0 mmol/L. O número de células BrdU+ aumentou significativamente no hipocampo de animais expostos ao Ambiente Enriquecido sem Lítio (142 $\pm$ 23 células;  $p < 0,01$ ) e ao Ambiente Enriquecido mais Lítio (174 $\pm$ 28 células;  $p < 0,001$ ) em comparação ao Ambiente Convencional sem Lítio (105 $\pm$ 21 células). A exposição ao Ambiente Convencional mais Lítio (95 $\pm$ 16 células) não alterou o número de células BrdU+ em comparação ao Ambiente Convencional sem Lítio ( $p > 0,1$ ). No entanto, a exposição ao Ambiente Enriquecido mais Lítio resultou em um número significativamente maior de células BrdU+ em comparação ao Ambiente Enriquecido sem Lítio ( $p$

\* 2º lugar - Painel Área Básica. XXXI Congresso Médico Universitário da FMUSP - COMU - 2012.

<sup>1</sup> Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. e-mail: fabigadotti@gmail.com

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<sup>3</sup> Orientadora, Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. e-mail: schaeffer@usp.br

**Endereço para correspondência.** Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Rua Doutor Ovídio Pires de Campos, 785. CEP: 05403-010 - São Paulo, SP, Brasil. e-mail: schaeffer@usp.br

< 0,05). Os resultados sugerem que o tratamento crônico com lítio acentua a sobrevivência de novas células induzida por enriquecimento ambiental no hipocampo de camundongos adultos, provavelmente proporcionando um ambiente favorável para os estímulos ambientais exercerem um efeito protetor mais forte. O tratamento combinado com lítio e enriquecimento ambiental (com estimulação cognitiva e física) poderia constituir uma estratégia para promover a sobrevivência de novos neurônios

## INTRODUÇÃO

A suposição secular de que novas células nervosas não se originam após o desenvolvimento embrionário foi suplantada com a descoberta de que neurogênese (nascimento de novos neurônios) ocorre constitutivamente no cérebro de mamíferos adultos<sup>1</sup>. Com essa descoberta, a neurogênese adulta no cérebro danificado de sujeitos com doença de Alzheimer (DA) tem se tornado foco de interesse e os estudos têm mostrado que a neuroproliferação está aumentada no cérebro com DA<sup>2,3</sup>, mas que os novos neurônios falham em sobreviver e se diferenciar em células maduras<sup>2,4</sup>. Assim, medidas para estimular a sobrevivência e o amadurecimento de novos neurônios poderiam constituir novas estratégias terapêuticas para promover a recuperação da circuitaria neuronal no cérebro danificado de sujeitos com DA. Nesse sentido, duas perspectivas que se destacam na literatura são o lítio<sup>5-8</sup> e o enriquecimento ambiental<sup>9-14</sup>.

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi examinar o efeito combinado de carbonato de lítio e enriquecimento ambiental sobre a sobrevivência de novas células geradas no hipocampo de camundongos adultos, em comparação com o efeito isolado dessas duas estratégias promotoras de neurogênese adulta.

## MÉTODOS

Vinte e oito camundongos C57Bl/6 machos de 3 meses de idade foram injetados no peritônio com bromodeoxiuridina (BrdU; análogo da timidina que se incorpora ao DNA de células em proliferação) e submetidos a um dos seguintes tratamentos por 28 dias (n = 7 por grupo): (a) ambiente padrão contendo dieta controle; (b) ambiente padrão contendo dieta com carbonato de lítio (2,0 g/kg de ração); (c) ambiente enriquecido (com objetos de estimulação cognitiva e física) contendo dieta controle; e (d) ambiente enriquecido contendo dieta com carbonato de lítio. Os animais foram sacrificados por perfusão intracardíaca e os cérebros coletados 28 dias pós-BrdU para análise

e assim melhorar a função cognitiva na doença de Alzheimer, especialmente em estágio inicial.

**DESCRITORES:** Lítio; Hipocampo; Carbonato de lítio; Neurônios; Doença de Alzheimer; Camundongos.

**KEY-WORDS:** Lithium; Hippocampus; Lithium carbonate; Neurons; Alzheimer disease; Mice.

de sobrevivência das células que incorporaram BrdU. Os cérebros foram cortados ao longo do hipocampo inteiro em criostato, e cada três cortes foram marcados por imunohistoquímica para BrdU. O número de células positivas para BrdU (BrdU<sup>+</sup>) foi contado no giro denteado do hipocampo em cada três cortes com o uso de um microscópio de luz comum e objetiva de 100×, e o número total de células BrdU<sup>+</sup> no giro denteado inteiro foi estimado multiplicando-se o número de células contadas por 3.

## RESULTADOS

O número total estimado de células BrdU<sup>+</sup> no giro denteado do hipocampo estava significativamente aumentado em animais expostos ao ambiente enriquecido contendo dieta controle e ao ambiente enriquecido contendo dieta com lítio quando comparado com animais expostos ao ambiente padrão contendo dieta controle e ao ambiente padrão contendo dieta com lítio (ANOVA/Tukey: p < 0,001). Não foram observadas diferenças no número de células BrdU<sup>+</sup> entre animais expostos ao ambiente padrão contendo dieta controle e ao ambiente padrão contendo dieta com lítio (ANOVA/Tukey: p > 0,5). No entanto, o número de células BrdU<sup>+</sup> estava significativamente maior em animais expostos ao ambiente enriquecido contendo dieta com lítio quando comparado com animais expostos ao ambiente enriquecido contendo dieta controle (ANOVA/Tukey: p < 0,05).

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o tratamento crônico com lítio potencializa a sobrevivência de novas células induzida por enriquecimento ambiental no hipocampo de camundongos adultos, provavelmente proporcionando um ambiente favorável para os estímulos ambientais exercerem um efeito protetor mais forte. Deste modo, o tratamento combinado com lítio e enriquecimento ambiental (com estimulação cognitiva e física) poderia constituir uma estratégia para promover a sobrevivência de novos neurônios e assim melhorar a função cognitiva na DA, especialmente em estágio inicial.

## REFERÊNCIAS

1. Yamashima T, Tonchev AB, Yukie M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci*. 2007;18(1):67-82. doi: 10.1515/REVNEURO.2007.18.1.67
2. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):343-7. doi:10.1073/pnas.2634794100
3. Ziabreva I, Perry E, Perry R, Minger SL, Ekonomou A, Przyborski S, Ballard C. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res*. 2006;61(3):311-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2006.07.017>
4. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tamimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(1):78-84. doi: 10.1097/nen.0b013e318160c5db
5. Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem*. 2000;75(4):1729-34. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751729.x
6. Son H, Yu IT, Hwang SJ, Kim JS, Lee SH, Lee YS, Kaang BK. Lithium enhances long-term potentiation independently of hippocampal neurogenesis in the rat dentate gyrus. *J Neurochem*. 2003;85(4):872-81. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01725.x
7. Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry*. 2008;13(3):285-92. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01725.x
8. Fiorentini A, Rosi MC, Grossi C, Luccarini I, Casamenti F. Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice. *PLoS One*. 2010;5(12):e14382. doi: 10.1371/journal.pone.0014382.
9. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;386(6624):493-5. doi:10.1038/386493a0
10. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*. 1998;8(16):939-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00377-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00377-6)
11. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998;18(9):3206-12. available from: <http://www.jneurosci.org/content/18/9/3206.full.pdf+html>
12. Herring A, Ambrée O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol*. 2009;216(1):184-92. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.027.
13. Okuda H, Tatsumi K, Makinodan M, Yamauchi T, Kishimoto T, Wanaka A. Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *J Neurosci Res*. 2009;87(16):3546-53. doi: 10.1002/jnr.22160.
14. Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O. Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup> mice. *FASEB J*. 2010;24(6):1667-81. doi: 10.1096/fj.09-136945.