

Potencial inibitório *in vitro* de chás comerciais e da quercetina sobre a atividade de acetilcolinesterase cerebral em cães

Soraia John da Silva
Gabriel Marchiori Gonzaga
Iury Uzêda da Rocha
Ciro Eugenio da Silva de Oliveira
Arthur Eugen Kummerle
Cristiane Martins Cardoso

RESUMO

Com o aumento na expectativa de vida dos animais de companhia, há um maior aparecimento de doenças neurodegenerativas, como a Disfunção Cognitiva Canina (DCC). A DCC apresenta diversas semelhanças à Doença de Alzheimer (DA) presente em seres humanos. Entre estas semelhanças, é possível citar o nível reduzido de acetilcolina, o que justifica a busca por tratamentos que tenham como foco a inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela degradação deste neurotransmissor. Neste trabalho, foi avaliado o potencial inibitório dos chás de maçã, de hortelã e de chá verde sobre a atividade de AChE presente em cérebro de cães. O chá verde foi o chá mais eficaz na inibição desta enzima, apresentando uma IC50 de aproximadamente 1.7 mg/mL. A quercetina, flavonol que segundo a literatura está presente no chá verde e ausente nos chás de maçã e hortelã, pode ser um dos constituintes responsáveis por esta inibição. Desta forma, também foi avaliado o potencial anticolinesterásico da quercetina em cérebro canino, obtendo-se uma IC50 de 0,41 mM. Uma vez que a quercetina já tem sido utilizada na medicina veterinária para outros fins, o potencial anticolinesterásico deste flavonol em cérebro canino mostra-se de grande relevância para os estudos da DCC.

Palavras-chave: Chás. Flavonoide. Acetilcolinesterase. DCC.

The inhibitory potential *in vitro* of commercial teas and quercetin on cerebral acetylcholinesterase activity in dogs

ABSTRACT

Canine Cognitive Dysfunction (CCD) is a neurodegenerative disease with very similar characteristics to humans Alzheimer's disease. Currently, the increase of pets life expectancy leads to the more frequent appearance of neurodegenerative diseases in these species. Among the main hypotheses for the appearance of CCD has the reduction of acetylcholine levels in the synaptic cleft.

Soraia John da Silva – Msc., Doutoranda do curso de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

Gabriel Marchiori Gonzaga – Graduando do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ.

Iury Uzêda da Rocha – Graduando do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ.

Ciro Eugenio da Silva de Oliveira – Graduando do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ.

Arthur Eugen Kummerle – Prof. Dr. da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Cristiane Martins Cardoso – Prof. Dr. da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Veterinária em Foco	Canoas	v.14	n.2	p.3-12	jan./jun. 2017
---------------------	--------	------	-----	--------	----------------

This hypothesis justifies many researches that search CCD treatment based on acetylcholinesterase (AChE) inhibition, an acetylcholine degrading enzyme. In this work, inhibitory potential of some commercial teas (apple tea, peppermint tea and green tea) toward brain AChE activity of dogs was evaluated. Green tea is tea more effective to inhibit this enzyme, getting a IC 50 of approximately 1.7 mg / mL. Quercetin, flavonol which according to the literature is present in green tea and absent in apple and peppermint teas, may be one of the molecules that contribute to AChE inhibition. In this way, quercetin anticholinesterase potential in canine brain was also evaluated, obtaining an IC 50 of 0.41 mM. Since quercetin has already been used in veterinary medicine for other fins, the anticholinesterase potential of this flavonol toward canine brain is of great relevance for CCD studies.

Keywords: Teas. Flavonoid. Acetylcholinesterase. CCD.

INTRODUÇÃO

Os avanços da medicina veterinária, somados a outros fatores, como maior cuidado por parte dos tutores dos animais de companhia, possibilitaram um aumento na expectativa de vida destes animais (NEILSON et al., 2001). Juntamente com o aumento desta taxa, ocorre uma elevação na incidência de doenças degenerativas (DE ALMEIDA et al., 2006).

A síndrome da Disfunção Cognitiva Canina (DCC) é uma alteração neurodegenerativa que afeta cães geriátricos, sendo caracterizada por um declínio progressivo na função cognitiva do animal, o que resulta em deficiência de aprendizagem, memória, percepção espacial e alterações nos padrões de sono e interação social (TRAVANCINHA, 2014). Cães de raças grandes e gigantes são considerados geriátricos a partir de 5 anos de idade, enquanto os de raças pequenas ou médias são estimados como de meia idade a partir dos 7 anos (SEOANE, 2012).

Atualmente, os sinais clínicos da DCC podem ser divididos em cinco categorias de comportamento e a sigla DISHA apresenta estes sinais: disorientation (desorientação), interaction changes (mudança na interação), sleep/wake disturbances (distúrbios no ciclo sono/vigília), house soiling (sujar a casa, relacionado ao fato do animal defecar e urinar em casa) e activity changes (mudança no nível de atividade) (LANDSBERG et al., 2003).

A Doença de Alzheimer (DA), encontrada com frequência em idosos, é a forma mais comum de demência no homem e possui fisiopatologia semelhante à DCC (ADAMS et al., 2000; BOWEN; HEATH, 2005). Cães idosos desenvolvem déficits cognitivos e neuropatologia semelhantes aos vistos no envelhecimento e demência humana (COTMAN et al., 2002; STUDZINSKI et al., 2005).

Animais portadores de DCC apresentam redução no número de neurônios, aumento do volume ventricular cerebral e depósitos neurotóxicos, incluindo lipofuscina, ubiquitina e peptídeo β -amiloide (HORWITZ; NEILSON, 2008). Alterações histopatológicas, danos do DNA, alterações vasculares, neuronais e gliais, calcificação das meninges, bem como uma resposta inflamatória em torno das placas A β também são observadas em cães com DCC (BORRÁS et al., 1999; VASCONCELLOS et al., 2013). Tanto na DCC quanto na DA também ocorre diminuição ou desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores

como acetilcolina, serotonina, noraepinefrina e dopamina. O declínio na acetilcolina, por exemplo, está relacionado ao comprometimento cognitivo, uma vez que a mesma tem uma função estimulante do SNC e um papel fundamental na ativação das áreas de memória e aprendizagem (DEWEY; COSTA, 2015; RUEH; HART, 1998; HEIBLUM et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2013; FOIDL et al., 2016).

Redução tanto na quantidade de receptores colinérgicos quanto na sinalização induzida por esses receptores tem sido observada em regiões específicas no cérebro de pacientes com DA. Isso tem mostrado afetar memória, aprendizado, atenção e outros processos cognitivos (SULTZER et al., 2017; VENTURA et al., 2010; SHIMOHAMA et al., 1986).

O primeiro fármaco a ser aprovado para o uso em cães diagnosticados com disfunção cognitiva foi a selegilina, que atenua a depleção da neurotransmissão, especialmente da dopamina. Desta forma, este composto melhora a atividade catecolaminérgica e atrasa a progressão da doença neurodegenerativa (TRAVANCINHA, 2014).

Está também descrito o uso de propentofilina, que consiste num derivado da xantina e tem por mecanismo de ação a inibição da fosfodiesterase, promovendo um aumento do fluxo sanguíneo ao coração, musculatura e sistema nervoso central (TRAVANCINHA, 2014). Fármacos que aumentem o nível de acetilcolina têm demonstrado bons resultados sobre a memória e o desempenho em atividades de cães (LANDSBERG, 2005).

Em relação à DA, desde a introdução do primeiro inibidor de colinesterase em 1997, muitos consideram os inibidores de colinesterase, donepezil, galantamina, rivastigmina, como a primeira linha para terapia farmacológica desta neuropatia. Estes medicamentos visam inibir a degradação de acetilcolina, através do bloqueio da enzima acetilcolinesterase (AChE) (BIRKS, 2006).

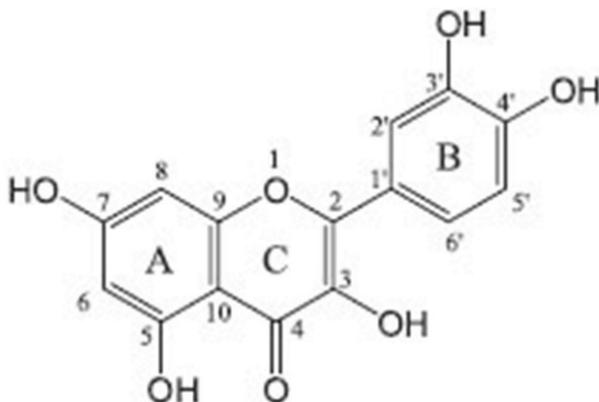
Ainda não existe um tratamento totalmente eficaz tanto para a Doença de Alzheimer, quanto para a Disfunção Cognitiva Canina. Além disso, poucos testes são feitos sobre o uso de anticolinesterásicos em cães e muitos dos compostos disponíveis em farmácias humanas não possuem a mesma eficácia nestes animais e/ou são bastante tóxicos a eles. Desta forma, muitos médicos veterinários optam por receitar apenas compostos que possam vir a atenuar os sintomas da DCC ou a retardar um pouco a evolução da doença.

O interesse e a aceitação de tratamentos naturais, sobretudo com uso de plantas populares, têm crescido nos últimos anos. Os extratos de hortelã e de chá verde, assim como a procianidina presente na maçã, já mostraram um potencial em atuar doenças neurodegenerativas como a DA, uma vez que foram capazes de inibir a atividade de AChE em linhagens de células humanas e em *Electrophorus electricus* e em inibir a agregação de peptídeos β -amiloides (PEDRO, 2008; RAGHAVENDRA et al., 2015; TODA et al., 2011).

As plantas, de uma forma geral, apresentam como constituintes diversos compostos fenólicos com propriedades terapêuticas bastante importantes, como é o caso dos flavonoides que atuam como antioxidantes e anticarcinogênicos. A quercetina (Figura

1) representa o principal flavonoide presente na dieta humana e pode ser encontrada, por exemplo, no chá verde (BEHLING et al., 2004; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). A quercetina, além de diversas propriedades terapêuticas já descritas, também já demonstrou potencial inibitório sobre a atividade colinesterásica de *E. electricus*.

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura da quercetina.



Fonte: Simões et al., 2013.

Desta forma, este trabalho tem por objetivo avaliar a eficácia dos chás de hortelã, de maçã e chá verde, bem como da quercetina, na inibição da enzima acetilcolinesterase em cérebro canino. E, assim, buscar contribuir nos estudos de tratamentos mais eficazes para a Disfunção Cognitiva Canina.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Protocolo n° 1916200116.

Os chás foram preparados em laboratório através da adição de sachês industrializados em água destilada a 100°C por 10 minutos. A proporção usada foi de 1 g das respectivas folhas, ou casca do fruto, para 50 mL de água. Para este preparo foram utilizadas as folhas de *Mentha piperita* (hortelã) e *Cammelia sinensis* (chá verde) e o fruto de *Pyrus malus* (maçã). A quercetina foi obtida comercialmente pela marca Sigma-Aldrich ($\geq 95\%$).

Cérebros de cães Sem Raça Definida (SRD) foram obtidos em colaboração com a professora Marilene Farias de Queiroz Brito e foram oriundos de necropsias das aulas práticas da disciplina Anatomia Patológica Especial da UFRRJ.

Os cérebros foram homogeneizados em homogeneizador mecânico (tipo Potter-Elvehjem) com tampão de ensaio (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). Foi utilizado 0,25 g de cérebro/mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi congelado e armazenado para posterior uso.

Para determinação da concentração proteica nos homogeneizados cerebrais foi utilizada a metodologia proposta por Peterson (1977). Albumina sérica bovina (10 e 100µg) foi usada como padrão.

A presença da atividade acetilcolinesterásica no homogeneizado foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado. O homogeneizado foi adicionado aos poços de uma placa de ELISA contendo tampão de ensaio e o composto a ser analisado (exceto para os grupos controle). Foi adicionado DTNB (ácido 5,5' ditionitrobenzeno) 0,32 mM dissolvido em tampão e após 10 minutos de incubação a 37°C foi feita a primeira leitura espectrofotométrica a 412 nm. Posteriormente foi adicionado o substrato (iodeto de acetiltiocolina) 1,5 mM, obtendo assim um volume reacional de 220 µL. Posteriormente fez-se uma nova incubação de 10 minutos a 37°C. A densidade óptica final dos meios reacionais foi medida a 412 nm. Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a subtração entre as duas absorvâncias obtidas. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, como sugerido por Eyer et al. (2003).

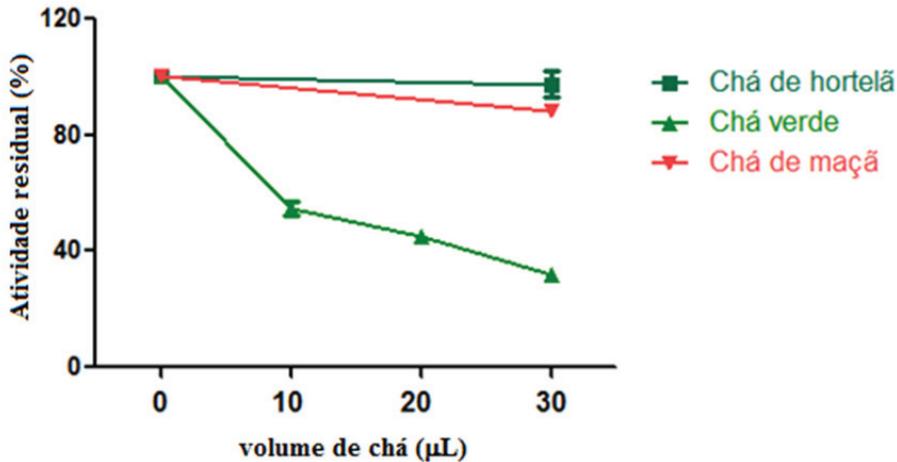
Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância no programa GraphPad Prism 5. Foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos chás de hortelã, de maçã e de chá verde se deu pelo fato de serem plantas bastante comuns no Brasil e de terem apresentado anteriormente efeitos terapêuticos interessantes para neuropatologias.

O ensaio de determinação da concentração proteica revelou uma concentração de aproximadamente 2.1 mg/mL de proteínas totais no homogeneizado cerebral. O efeito *in vitro* dos chás sobre a atividade de AChE neste homogeneizado pode ser observado na Figura 2.

FIGURA 2 – Efeito de chás sobre a atividade de acetilcolinesterase em homogeneizado de cérebro canino. Concentração dos chás: 1g de folhas/50 mL de água destilada. Concentração de proteína total de amostra de cérebro canino presente na reação: 0.24 mg/mL. Volume final da reação: 220 μ L.



Fonte: o autor.

A partir da observação da Figura 2 e da análise estatística pôde-se observar que o chá que inibiu de forma mais expressiva a atividade enzimática de AChE foi o chá verde. Embora o chá de maçã tenha inibido de forma significativa a atividade enzimática, o mesmo não ocorreu com o chá de hortelã.

Nossos resultados indicaram uma IC₅₀ (concentração responsável por inibir 50% da atividade enzimática) de 1,7 mg/mL para o chá verde, concentração mais alta do que as apresentadas na literatura onde fez-se uso dos extratos desta planta sobre *E. electricus* (IC₅₀: 5.96 e 42.05 μ g/mL) (JAZAYERI et al., 2014; RAGHAVENDRA et al., 2015). Esta diferença nas IC₅₀s de chá verde obtidas neste trabalho e em trabalhos anteriores pode ser decorrente de diferenças entre a estrutura da acetilcolinesterase de *E. electricus* e de cães. Além disso, como foi demonstrado nos estudos de Nishiwama et al. (2010), a forma de preparo e de acondicionamento e o tempo de infusão influenciam bastante nas atividades biológicas do chá verde e no teor dos compostos bioativos.

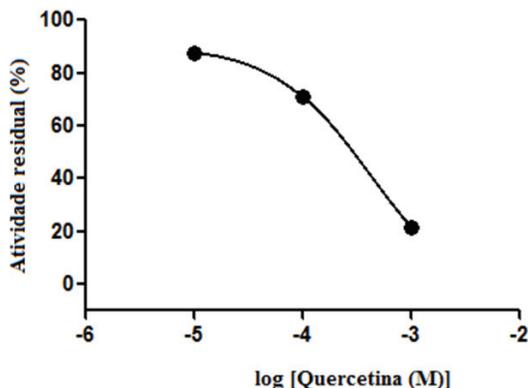
Embora o chá verde tenha apresentado alta eficácia na inibição da acetilcolinesterase, sabe-se que o mesmo é capaz de provocar alta toxicidade no seu uso crônico em cães, como demonstrado anteriormente por Kapetanovic et al. (2009). Assim, este trabalho também buscou avaliar o potencial anticolinesterásico de um flavonol presente em alta concentração neste chá (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006), e que já possui uso na medicina veterinária: a quercetina (BROADFOOT et al., 2009).

Além disso, Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006), avaliando o teor de quercetina nos chás de maçã, hortelã e chá verde, demonstraram que somente no chá verde este flavonol foi encontrado. A presença deste constituinte, portanto, pode ter sido crucial

para o alto potencial anticolinesterásico do chá verde e para ausência deste potencial nos outros chás aqui testados.

O efeito da quercetina sobre acetilcolinesterase cerebral em cães é demonstrada na Figura 3.

FIGURA 3 – Curva logarítmica de IC50 (Concentração responsável por inibir 50% da atividade enzimática) da quercetina sobre a atividade de AChE em cérebro canino. . Concentração de proteína total de amostra de cérebro canino presente na reação: 0.24 mg/mL. Volume final da reação: 220 µL.



Fonte: o autor.

Como pode ser observado na Figura 3, a quercetina inibiu de forma significativa a atividade colinesterásica no cérebro canino. A IC50 da quercetina neste trabalho foi de 0,41 mM, concentração semelhante a encontrada por Khan et al. (2009) em seu estudo com *E. electricus*, onde o autor classificou este flavonoide como um inibidor competitivo de AChE.

A inibição da acetilcolinesterase cerebral de cães pela quercetina pode vir a provocar aumento do nível de acetilcolina nos pacientes com DCC. Isto, por sua vez, pode acarretar melhora na memória e no desempenho cognitivo destes animais, uma vez que este neurotransmissor está intimamente relacionado a estas atividades.

Sendo assim, este trabalho é um passo inicial, mas de grande importância, na busca para tratamentos mais eficazes e seguros para a DCC.

CONCLUSÃO

O chá de hortelã não altera a atividade de acetilcolinesterase em cérebro canino enquanto o chá de maçã é capaz de provocar uma inibição leve nesta atividade. O chá verde, por sua vez, mostrou apresentar um bom potencial inibitório sobre AChE em homogeneizado de cérebro canino. A quercetina, flavonol presente em alta concentração

neste chá, mostrou ser um dos responsáveis pela inibição colinesterásica apresentada pelo chá. Embora os resultados aqui presentes sejam dados ainda iniciais, a inibição da acetilcolinesterase cerebral por parte de uma substância já utilizada na medicina veterinária é de grande relevância para estudos que busquem futuros métodos de tratamento mais eficazes e seguros para a Disfunção Cognitiva Canina.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.; CHAN, A.; CALLAHAN, H.; MILGRAM, N. The Canine as a Model of Human Cognitive Aging: Recent developments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.24, p.675-692, 2000.
- BEHLING, E. V. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.15, n.3, 285-292, 2008.
- BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v.25, n.1, 2006.
- BORRAS, D.; FERRER, I.; PUMAROLA, M. Age-related changes in the brain of the dog. *Veterinary Pathology Online*, v.36, n.3, p.202-211, 1999.
- BOWEN, J.; HEATH, S. Geriatric behavioural issues. In: *Behaviour problems in small animals*. Practical advice for the veterinary team, London, WB Saunders, p.59-69, 2005.
- BROADFOOT, P. J. et al. Integrating Complementary Medicine into veterinary Practice. John Wiley e Sons, p.928, 2009.
- COTMAN, C. W. et al. Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiology of aging*, v.3, n.5, p.809-818, 2002.
- DE ALMEIDA, G. et al. Perfil clínico-epidemiológico da fibrilação atrial espontânea em cães. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*, v.19, n.1, p.20-28, 2006.
- DEWEY, C.; COSTA, R. *Practical guide to canine and feline neurology* 3.ed. Wiley Blackwell, p.688, 2015.
- ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, v.7, n.2, p.88-95, 1961.
- EYER, P. et al. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical biochemistry*, v.312, n.2, p.224-227, 2003.
- FOIDL, B. et al. Cholinergic neurodegeneration in an Alzheimer mouse model overexpressing amyloid-precursor protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations. *Neurobiology of learning and memory*, v.136, p.86-96, 2016.
- HEIBLUM, M.; LABASTIDA, R.; CHAVES, G.; TEJEDA, A. "Didy," a clinical case of cognitive dysfunction syndrome. *Journal of Veterinary Behavior*, v.2, p.68-72, 2007.

HORWITZ, D.; NEILSON, J. Disfunção cognitiva: caninos e felinos. In: *Blackwell's – Consulta Veterinária em 5 minutos: Comportamento canino e felino*, São Paulo, p.378-386, 2008.

JAZAYERI, Seyed Behzad et al. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, n.1, p.17, 2014.

KHAN, M. et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-biological interactions*, v.181, n.3, p.383-389, 2009.

LANDSBERG, G. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.29, n.3, p.471-479, 2005.

LANDSBERG, G.; HUNTHASUEN, W.; ACKERMAN, L. The effects of aging on the behavior of senior pets. In: *Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat*, 2.ed. Saunders, Edinburgh, p.269-304, 2003.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.380-385, 2006.

NEILSON, J.; HART, B.; CLIFF, K.; RUEHL, W. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.218, n.11, p.1787-1791, 2001.

NISHIYAMA, F. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, 2010.

PEDRO, M. *Pesquisa de actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase em extratos aquosos de várias plantas usadas como infusões: identificação de compostos com maior actividade inibitória*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Lisboa, Lisboa, p.72, 2008.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v.83, n.2, p.346-356, 1977.

RAGHAVENDRA, H. L.; PRASHITH, K. T. R.; KHANUM, F. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Green Tea Polyphenols. *Science, Technology and Arts Research Journal*, v.3, n.4, p.141-142, 2015.

RUEHL, W.; HART, B. In: DODMAN, N.; SHUSTER, L. *Psychopharmacology of Animal Behavior Disorders*. Blackwell Science, capítulo. 13, p.283-303, 1998.

SEOANE, M. Avaliação da ocorrência das alterações ultrassonográficas na cavidade abdominal, detectadas em cães idosos clinicamente saudáveis atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.113, 2012.

SHIMOHAMA, Shun et al. Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *Journal of Neurochemistry*, v.46, n.1, p.288-293, 1986.

SIMÕES, V. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). *Química Nova*, v.36, n.4, p.495-501, 2013.

STUDZINSKI, C.; ARAUJO, J.; MILGRAM, N. The canine model of human cognitive aging and dementia: pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.29, n.3, p.489-498, 2005.

SULTZER, D. L. et al. Cholinergic Receptor Binding in Alzheimer's Disease and Healthy Aging: Assessment in Vivo with PET Imaging. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, p.38, 2017.

TODA, T. et al. Apple Procyanidins Suppress Amyloid β -Protein Aggregation. *Biochemistry research international*, 2011.

TRAVANCINHA, J. *Alterações comportamentais sugestivas de síndrome da disfunção cognitiva em cães geriátricos*. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

VASCONCELLOS, R. Disfunção cognitiva em cães idosos: avaliação clínica e estratégias terapêuticas. *Clínica Veterinária*, XVII, n.103, p.62-70, 2013.

VENTURA, A. L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista Psiquiatria Clínica*, v.37, n.2, p.66-72, 2010.