

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Curso de Ciências Biológicas

Trabalho de Conclusão de Curso

Estudo de Agentes Neuroprotetores em um Modelo de
Isquemia Cerebral *in vitro*

Acadêmico: Wagner Carbolin Martins

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca

Co-Orientadora: M.Sc. Tharine Aparecida Dal-Cim

Florianópolis, junho de 2009.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família, meu pai, excelentíssimo senhor Múcio Martins, minha querida mãe, excelentíssima senhora Margareth por todo o amor e apoio durante todos esses anos de minha vida e minha irmã que...bem, é minha irmã apesar de tudo e uma das pessoas que mais amo nesta vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Carla Inês Tasca, pela experiência, oportunidade de realizar este trabalho e pela paciência para comigo.

À minha co-orientadora, Tharine Aparecida Dal-Cim, pelo apoio e ajuda neste trabalho e principalmente por me aturar durante longas jornadas diárias para a realização do mesmo.

Ao Samuel e Gianni, que também foram de grande ajuda durante este projeto, pelos churrascos passados e pelos muitos outros que estão por vir.

Ao pessoal do laboratório, Daniela, Simone, Adalberto, Sarah, Suely, Ana e Tet, por todo o companheirismo.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer George Beauchamp e Adolph Rickenbacker, inventores da guitarra elétrica, pois sem ela não existiria algumas das paixões de minha vida, o blues, o rock'n'roll e o heavy metal.

Stay Heavy For All Eternity.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	5
Lista de Figuras.....	6
Resumo.....	7
1. Introdução.....	8
1.1 Glutamato e Excitotoxicidade.....	8
1.2 Isquemia Cerebral.....	10
1.3 Agentes Neuroprotetores.....	11
1.3.1 Guanosina.....	11
1.3.2 Atorvastatina.....	13
1.3.3 Galantamina.....	15
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivos Específicos.....	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Procedimento.....	18
4.3 Viabilidade Celular.....	19

4.4 Incorporação de Iodeto de Propídeo.....	20
4.5 Captação de glutamato.....	20
4.6 Liberação de glutamato	21
4.7 Determinação de Tióis Não-protéicos.....	22
4.8 Dosagem de Proteínas.....	22
4.9 Análise Estatística.....	22
5. Resultados.....	23
5.1 Guanosina.....	23
5.2 Atorvastatina.....	27
5.3 Galantamina.....	31
6. Discussão.....	34
6.1 Guanosina.....	35
6.2 Atorvastatina.....	37
6.3 Galantamina.....	38
7. Conclusões.....	40
8. Referências Bibliográficas.....	41

Lista de Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterase

AMPA: Ácido α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolepropiónico

AVC: Acidente vascular cerebral

DG: Derivados da guanina

GUO: Guanosina

HBSS: Solução de sal balanceada de Hank

HMG-CoA: Enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A

i.c.v.: Intracerebroventricular

KA: Ácido Caínico

KRB: Krebs-Ringer bicarbonato

MEK: Proteína Cinase regulada por sinal extracelular

MTT: 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NPSH: Tióis não-protéicos

PGO: Privação de glicose e oxigênio

PI: Iodeto de propídeo

PI3K: Fosfatidil-inositol-3 Cinase

PKA: Proteína Cinase dependente de AMP cíclico

PKC: Proteína Cinase C

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema nervoso central

Lista de Figuras

Figura 1. Avaliação da neuroproteção promovida pela guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	24
Figura 2. Avaliação do efeito da guanosina sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	26
Figura 3. Avaliação da neuroproteção promovida pela atorvastatina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	28
Figura 4. Avaliação do efeito da atorvastatina sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	29
Figura 5. Avaliação dos níveis de NPSH em fatias de hipocampo submetidas à PGO após o tratamento <i>in vivo</i> com atorvastatina.....	30
Figura 6. Avaliação da neuroproteção promovida pela galantamina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	32
Figura 7. Avaliação do efeito da galantamina sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	33

Resumo

A isquemia cerebral consiste na interrupção do fluxo sanguíneo cerebral que resulta em uma severa degeneração das células neurais e conseqüente perda das funções cerebrais. Quando o fluxo é restaurado, o oxigênio ofertado pode não ser totalmente reduzido, gerando radicais livres, causando peroxidação lipídica com conseqüente dano celular irreversível. A despolarização da membrana junto com o prejuízo metabólico e a perda da homeostasia iônica, pode causar uma massiva liberação de neurotransmissores excitatórios como o aminoácido L-glutamato, que em excesso na fenda sináptica pode se tornar uma potente neurotoxina. Este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos envolvidos no dano celular provocado pela privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de roedores e a utilização de possíveis agentes neuroprotetores: guanosina, galantamina e atorvastatina. Para a atorvastatina, os animais foram tratados *in vivo* via oral durante sete dias e mortos por decapitação no oitavo. A guanosina e a galantamina foram adicionadas *in vitro* durante a PGO ou reperfusão. Na PGO as fatias foram incubadas com tampão isquêmico por 15 min seguida ou não de 2h de reperfusão, onde o tampão isquêmico é substituído por KRB. A GUO promoveu diminuição do dano celular induzido pela PGO seguida de reperfusão. Foi observado que a GUO reverte o aumento da liberação de glutamato provocada pela PGO e reperfusão. No pré-tratamento com atorvastatina observamos que esta apresenta ação neuroprotetora durante a reperfusão reduzindo o estresse oxidativo e prevenindo a redução da captação glutamatérgica. A galantamina não apresentou neuroproteção em nosso modelo isquêmico, porém na captação de glutamato, parece haver uma tendência a aumentar essa captação, que é diminuída significativamente durante o insulto isquêmico.

1 - Introdução

1.1 – Glutamato e Excitotoxicidade

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e desempenha importante papel na manutenção da atividade nervosa central e fenômenos plásticos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória (Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). O glutamato é sintetizado e estocado em neurônios especializados denominados glutamatérgicos e liberado sob diferentes estímulos na fenda sináptica, onde se une a uma série de receptores situados nas membranas pré e pós-sinápticas e também na astrogliia (Gegelashvili & Schousboe, 1997). Existem dois tipos de receptores de glutamato: ionotrópicos, que formam canais iônicos e são subdivididos de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas, como os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido cáinico (KA) e os sensíveis ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA) (Michaelis, 1998), e metabotrópicos, ligados às proteínas G. Aos receptores AMPA e kainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio (Ca^{+2}). Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória. Os receptores metabotrópicos agem através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (Obrenovitch &

Urenjak, 1997).

O glutamato liberado extracelularmente é inativado através da recaptação principalmente pelas células gliais, por um processo mediado por transportadores de alta afinidade (EAAT) (Struzynska et al, 2005), o que pode ser modulado pelo estado redox da célula (Trotti et al, 1998). Assim, a captação de glutamato é essencial para a finalização da transmissão sináptica durante condições fisiológicas (Danbolt, 2001; Bonde *et al.*, 2003), pois quando em excesso na fenda sináptica, o glutamato pode se tornar uma potente neurotoxina. As células neurais afetadas por essa excitotoxicidade glutamatérgica podem liberar glutamato em grandes quantidades através de processos não controlados que envolvem a liberação vesicular e/ou a reversão dos carreadores de membrana (Lipton et al, 1994; Hunter et al, 1998). Quando ocorre essa reversão dos carreadores, o glutamato em vez de ser captado é liberado para o meio, aumentando a sua concentração na fenda sináptica e conseqüentemente aumentando o dano celular (Rossi et al., 2000; Camacho & Massieu, 2006). Assim, o funcionamento adequado dos transportadores é essencial para manter os níveis extracelulares deste neurotransmissor suficientemente baixos e dessa forma restringir a superestimulação dos receptores glutamatérgicos prevenindo o dano neuronal. A disfunção desses transportadores resulta em um acúmulo de glutamato na fenda sináptica induzindo um aumento no influxo de íons cálcio, o qual ativa processos intracelulares como hidrólise protéica, formação de radicais livres e peroxidação lipídica, desencadeando assim, a formação de uma “onda excitotóxica” que leva à morte das células neurais circundantes (Sharkey et al, 1997).

1.2 – Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral consiste na interrupção do fluxo sanguíneo cerebral que resulta em uma severa degeneração das células neurais e conseqüente perda das funções cerebrais (Mattson, 2000). Quando o fluxo sanguíneo é restaurado (reperfusão), o oxigênio ofertado pode não ser totalmente reduzido, gerando radicais livres e assim causando peroxidação lipídica com conseqüente dano celular irreversível (Halliwell et al, 1999). Esse dano cerebral resultante é caracterizado por infarto com um centro necrótico, onde todas as células morrem rapidamente e uma área ou zona de penumbra adjacente à área isquêmica onde as células morrem em dias ou semanas após o insulto (Camacho & Massieu, 2006).

Durante o evento isquêmico ocorre uma rápida diminuição dos níveis de ATP nas células podendo resultar em um colapso das bombas iônicas, como a Na^+/K^+ -ATPase, já que estas são responsáveis por grande parte do consumo de ATP no cérebro (Doyle et al., 2008). As bombas iônicas Na^+/K^+ -ATPase são necessárias para manter o gradiente iônico de membrana, mantendo elevadas as concentrações de potássio (K^+) e baixas as concentrações de sódio (Na^+) no interior da célula. A despolarização da membrana juntamente com o prejuízo metabólico e a perda da homeostasia iônica tem como conseqüência uma massiva liberação de neurotransmissores excitatórios como o aminoácido L-glutamato (Camacho & Massieu, 2006). Este evento é bem caracterizado em alterações agudas (hipóxia, encefalopatias isquêmicas, traumatismo craniano) ou alterações crônicas (epilepsia, esquizofrenia, alcoolismo, doenças neurodegenerativas como as de Parkinson, Huntington, Alzheimer), onde as células neurais afetadas podem liberar glutamato e desencadear a

excitotoxicidade glutamatérgica já descrita anteriormente. Em fatias de hipocampo submetidas a um modelo de isquemia *in vitro* e posterior reperfusão, já foi observada uma redução nos níveis de glutathione, um importante antioxidante endógeno no SNC, e também uma redução na captação de glutamato do meio extracelular (Brongholi et al., 2006). Sendo assim, é fundamental que sejam estudadas drogas que possam agir reduzindo os efeitos deletérios da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo.

1.3 – Agentes Neuroprotetores

Em decorrência da diversidade de eventos intracelulares que ocorrem em um insulto isquêmico, trauma ou convulsão, diversos trabalhos estão sendo realizados com o intuito de identificar novas estratégias neuroprotetoras para auxiliar no tratamento dessas situações. Neste trabalho direcionamos o estudo para a guanosina, a galantamina e a atorvastatina, três substâncias que vêm demonstrando progresso durante as pesquisas em seus efeitos neuroprotetores diante de diversas condições patológicas.

1.3.1 – Guanosina

Um dos agentes neuroprotetores utilizados foi o nucleosídeo guanosina (GUO), um derivado da guanina (DG) que atua como molécula de sinalização intercelular (Neary et al., 1996; Ciccarelli et al., 2001; Decker et al., 2007). Diversas são as funções intracelulares descritas para os DG, como na síntese de proteínas, na sinalização transmembrana, translocação de proteínas no retículo endoplasmático, controle do

movimento vesicular nas células, diferenciação e proliferação celular (Bourne et al., 1990).

Para entender e conhecer melhor as funções extracelulares dos DG, estudos feitos mostraram que os DG modulam a transmissão glutamatérgica pela inibição da união de glutamato aos seus receptores e inibição de respostas celulares induzidas pelo glutamato (Tasca et al., 1995; 1998; 1999), protegendo contra a neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos (Oliveira et al., 2002; Molz et al., 2005; 2008). Também já foi demonstrado que a GUO aumenta a captação glutamatérgica em cultura de astrócitos (Frizzo et al., 2001).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de privação de glicose e oxigênio seguidas de 2 horas de reperfusão apresentam uma melhora da viabilidade celular quando a GUO é adicionada ao meio (Oleskovicz et al., 2008). Neste mesmo estudo, observou-se que o papel neuroprotetor da GUO é dependente da ativação de canais de K^+ . Este dado corrobora os estudos feitos por Benfenati, et al. (2006), onde a GUO estimulou a expressão funcional de canais iônicos de K^+ em cultura de astrócitos, sugerindo que seu efeito neuroprotetor possa estar relacionado com a habilidade de regular a homeostase do K^+ por astrócitos. Estes últimos, quando submetidos à hipóxia ou hipoglicemia liberam DG para o meio extracelular (Cicarelli et al., 1999), sendo que os níveis desses DG permanecem altos durante e após a hipóxia ou hipoglicemia, em especial a GUO que é obtida da hidrólise de nucleotídeos.

Com o objetivo de verificar como a GUO exerce seu papel neuroprotetor frente à privação de glicose e oxigênio, Oleskovicz et al., 2008 também demonstrou que esse efeito neuroprotetor da GUO é dependente dos níveis de Ca^{+2} extracelular. Através da

utilização de inibidores de algumas vias de sinalização verificou a participação da via da proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), proteína cinase regulada por sinal extracelular (MEK) e da Fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K).

Ainda em estudos realizados em nosso laboratório, experimentos realizados por Dal-Cim (2008) verificaram quais os possíveis subtipos de canais de potássio poderiam estar envolvidos na neuroproteção promovida pela GUO. Com esse estudo foi demonstrado que a caribdotoxina (inibidor de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2}) é capaz de inibir a neuroproteção e reverter o aumento da captação de glutamato promovida pela GUO em fatias de hipocampus de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio, demonstrando assim, que esses subtipos de canais de K^{+} estão envolvidos no processo de neuroproteção promovido pela GUO. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o aumento de captação de glutamato promovido pela GUO após a PGO é revertido na presença de inibidor da via da PI3K, além disso a GUO pode modular os níveis de fosforilação da proteína AKT, sugerindo um importante papel da via da PI3K na neuroproteção promovida pela GUO.

1.3.2 – Atorvastatina

A atorvastatina é um fármaco da família das estatinas, inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima marca-passo da biossíntese do colesterol, tendo papel de reduzir HMG-CoA a mevalonato (Nelson & Cox, 2000). É utilizada clinicamente no tratamento da hipercolesterolemia, reconhecida como fator de risco para doença coronariana, mas com poucas evidências apontando para uma relação de risco para um acidente vascular cerebral (AVC). Apesar disso, estudos

clínicos recentes indicam que o tratamento com estatinas reduz significativamente o risco de AVC entre pacientes com doença vascular já estabelecida (Vaughan, 2003) e que a prevalência da doença de Alzheimer e demência vascular é menor entre pacientes quando em uso de estatinas (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000).

Alguns estudos sugerem que as estatinas podem ter efeito direto na redução dos danos causados por radicais livres e oxidação de lipoproteínas. Elas reduzem a oxidação do LDL induzida por leucócitos, e podem ter efeitos mais amplos, como a preservação da atividade da enzima superóxido dismutase (Chen et al., 1997). Recentemente foi demonstrado efeito neuroprotetor da atorvastatina em modelo animal de traumatismo crânio encefálico, reduzindo o déficit neurológico e aumentando a sinaptogênese, angiogênese e sobrevivência neuronal nos animais tratados por sete dias após o trauma (Lu et al., 2004).

Além dos efeitos em modelo de traumatismo crânio encefálico, as ações neuroprotetoras das estatinas também foram observadas em um modelo de epilepsia com cainato, onde o pré-tratamento com atorvastatina reduziu a atividade epilética e a morte neuronal no hipocampo de ratos (Lee et al., 2008). Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que o tratamento de camundongos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) por sete dias reduziu o número de animais convulsionados após a administração i.c.v. de ácido quinolínico, bem como, apresentou efeito neuroprotetor sobre a morte celular avaliada no hipocampo induzida por este agente glutamatérgico (Piermartiri et al., 2009).

1.3.3 – Galantamina

A galantamina é um alcalóide obtido através do extrato de algumas espécies de plantas ou sinteticamente. Atualmente é utilizada como um fármaco no tratamento da doença de Alzheimer de grau leve ou moderado e tem demonstrado benefícios nas funções cognitivas e globais de pacientes. A galantamina atua como um inibidor da acetilcolinesterase (AChE) e como um ligante potencializador alostérico, aumentando a sensibilidade de receptores nicotínicos de neurônios colinérgicos, aumentando conseqüentemente a liberação de neurotransmissores (Geerts, 2005; Coyle et al., 2007). Estudos prévios mostram que a galantamina previne a perda sináptica em um modelo de doença de Alzheimer em camundongos (Unger et al., 2006), reduz a morte neuronal apoptótica induzida por peptídeo β -amilóide (Arias et al., 2004) através da prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio (Melo et al., 2009) e possui papel modulador no processamento da proteína precursora amilóide em uma linhagem de célula neuronal (Lenzken et al., 2007).

2 - Justificativa

Muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar compostos capazes de proteger as células após um insulto isquêmico, porém ainda há muitas informações sobre tais compostos que permanecem desconhecidas. Em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio e posterior reperfusão, já foi observada uma redução nos níveis de glutathione, um importante antioxidante endógeno no SNC, e também uma redução na captação de glutamato do meio extracelular (Brongholi et al., 2006).

A GUO tem apresentado neuroproteção em diversos modelos de excitotoxicidade (Schmidt et al., 2007) e foi observado que ela promove aumento na captação glutamatérgica após insulto isquêmico (Dal-Cim, 2008). As estatinas e a galantamina apresentaram efeitos neuroprotetores frente à privação de glicose e oxigênio, podendo também prevenir o dano oxidativo (Sobrado et al., 2004; Lim et al., 2006; Melo et al., 2009).

Assim, tendo em vista a importância do dano excitotóxico causado pelo excesso de glutamato na fenda sináptica em casos como a isquemia cerebral e a falta de agentes neuroprotetores eficazes contra a toxicidade induzida por glutamato, é de grande importância o estudo de novas drogas que possam agir reduzindo os efeitos deletérios da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo.

3 - Objetivos

Este trabalho teve como objetivo estudar o dano celular em fatias de hipocampo de roedores submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e os possíveis efeitos neuroprotetores da guanosina, atorvastatina e galantamina.

3.1 – Objetivos Específicos

Avaliar a morte celular e a liberação de glutamato durante um insulto isquêmico e reperfusão;

Verificar se a guanosina, galantamina e atorvastatina desempenham papel neuroprotetor revertendo os danos celulares induzidos pela PGO e reperfusão em fatias hipocâmpais de roedores;

Avaliar a liberação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e tratadas com GUO;

Avaliar a captação de glutamato em fatias de hipocampo de roedores submetidas à PGO e tratadas com atorvastatina ou galantamina;

Verificar os níveis de glutamato em fatias de hipocampo de camundongos submetidas à PGO após o tratamento *in vivo* com atorvastatina;

4 - Materiais e Métodos

4.1 – Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos (30-40 g) e ratos Wistar machos adultos, provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Os protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolos aprovados pela CEUA/UFSC).

4.2 – Procedimento

Nos tratamentos *in vitro* com GUO e Galantamina os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C, sendo gaseificadas com carbogênio. Fatias controle foram incubadas por 15 minutos no tampão KRB e gaseificadas com carbogênio.

Para a obtenção do modelo de privação de glicose e oxigênio (PGO), a glicose do tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não

utilizável da glicose) e o tampão gaseificado com nitrogênio (Pocock & Nichols, 1998). As fatias foram incubadas neste tampão em PGO por 15 minutos. Em seguida, o tampão da PGO foi substituído por tampão KRB gaseificado com carbogênio (fisiológico) e as fatias mantidas por um período de 2 horas de reperfusão na presença ou ausência de GUO (100 μ M) ou Galantamina (15 μ M). A incubação é terminada colocando-se as fatias em banho de gelo (4 °C).

Para a atorvastatina, os animais foram tratados *in vivo* via oral durante sete dias com 10mg/kg de atorvastatina (Lu et al., 2004) ou veículo (salina 0,9%) e mortos por decapitação no oitavo dia após o início do tratamento, em seguida os hipocampus foram removidos e mantidos em KRB, seguindo-se então, o mesmo protocolo e modelo isquêmico descrito anteriormente.

4.3 – Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Mosmann,1983). Após o período de PGO e reperfusão, as fatias hipocampais foram incubadas com MTT por 20 minutos a 37 °C e o formazam reduzido é solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em um leitor de Elisa (540 nm).

4.4 – Incorporação de Iodeto de Propídeo (PI)

O iodeto de propídeo é um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o PI complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (630 nm) que é excitada por luz verde (495 nm) (Boeck et. al., 2004). Após o período de 1 hora de pré-incubação as fatias hipocâmpais foram incubadas por 30 minutos com PI (7µg/ml) à 37° C, sendo em seguida, retirado e substituído por tampão KRB para a subsequente análise em um microscópio de epifluorescência invertido (Olympus IX 71), com filtro de rodamina. As fotos foram tiradas utilizando-se uma máquina fotográfica Olympus C5060, e quantificadas por análise densitométrica com o software Scion Image beta-3 (Scion Corporation).

4.5 – Captação de glutamato

A captação L-[³H]glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al., 2005. Após a incubação, o meio contendo tampão KRB ou tampão isquêmico foi retirado e as fatias foram incubadas com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) ou HBSS colina (para tirar Na⁺, o NaCl e Na₂HPO₄ foram substituídos por Cloreto de colina (137 mM) por 15 min. A captação foi iniciada após a adição de 0,33 µCi/ml L-[³H]glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100 µM, por 7 min. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas 2 vezes com HBSS ou HBSS-colina gelados. Em seguida as fatias foram solubilizadas em uma

solução de 0,1 N NaOH/0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular de [³H]L-Glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

4.6 – Liberação de glutamato

A liberação de glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al., 2008. Após a incubação, o meio contendo tampão Krebs-Ringer ou tampão isquêmico foi retirado e as fatias incubadas com HBSS por 15 min. Em seguida foi adicionado 0,33 µCi/ml de D-[³H]Aspartato - um análogo do glutamato que não é metabolizado pelas células, fazendo com que tenhamos uma medida mais precisa da quantidade de glutamato liberado durante o processo reverso dos transportadores - (concentração final 100 µM) por 7 min iniciando a captação. Após esse período as fatias foram lavadas 3 vezes com HBSS gelado para a retirada do excesso de D-[³H]Aspartato não captado. As fatias foram novamente incubadas por 15 minutos em 300 µl de HBSS, o sobrenadante coletado foi utilizado para medir a quantidade de D-[³H]Aspartato liberado. As fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/ 0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular e extracelular de D-[³H]Aspartato foi avaliada em um contador de cintilação líquida e a porcentagem de aspartato liberado foi expresso em relação a quantidade total de D-[³H]Aspartato.

4.7 – Determinação de Tióis Não-protéicos (NPSH)

NPSH foi determinada como descrito em Ellman et al. (1959) com pequenas modificações. Os compostos dos grupos tióis não-protéicos foi avaliado através de um homogenato de fatias de hipocampo após a precipitação de proteínas, com um volume de ácido tricloroacético 10%. Uma alíquota das amostras foram adicionadas a um tampão fosfato 800mmol/l, pH 7.4, e a 5,5'-Dithiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) 500 μ mol/l. Quando em contato, a reação dos tióis e deste ácido, resultam em uma coloração que atinge seu máximo em 5 minutos e se estabiliza por cerca de 30 min. Assim, a absorbância foi lida em 412nm após 10 min, para manter um padrão para os experimentos feitos. Uma curva de glutathione reduzida foi utilizada para calcular os grupos tióis não-protéicos presentes nas amostras.

4.8 – Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas para os experimentos de captação de L- [³H]glutamato foi realizado através do método de Lowry et al. (1951).

4.9 – Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 - Resultados

5.1 – Guanosina

A guanosina é descrita como neuroprotetora em diferentes modelos de excitotoxicidade glutamatérgica (Schmidt et al., 2007). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório foi demonstrado por Oleskovicz e colaboradores (2008), através do método de redução do MTT, que a GUO apresenta efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio seguida de reperfusão.

O papel neuroprotetor da GUO frente à PGO já foi descrito e confirmado em outros trabalhos realizados em nosso laboratório (Oleskovicz et al., 2008; Dal-Cim 2008), porém, o método de viabilidade celular utilizado (redução do MTT) é inespecífico quanto ao tipo de morte celular ocorrida durante o insulto isquêmico. Sendo assim, foi utilizada a técnica da incorporação de PI, onde são visualizados os núcleos de células que tiveram sua membrana rompida ou permeabilizada, indicando principalmente o dano celular necrótico ocorrido durante lesões.

Na figura 1 observamos que com esta metodologia empregada, os grupos PGO e PGO com GUO não apresentaram resultados significativos de morte celular quando comparados ao grupo controle. Já durante uma PGO seguida de reperfusão de 2 horas (PGO R) ocorre um aumento significativo na morte celular. Esse dano é revertido quando a GUO é incubada no período de reperfusão após o período de isquemia.

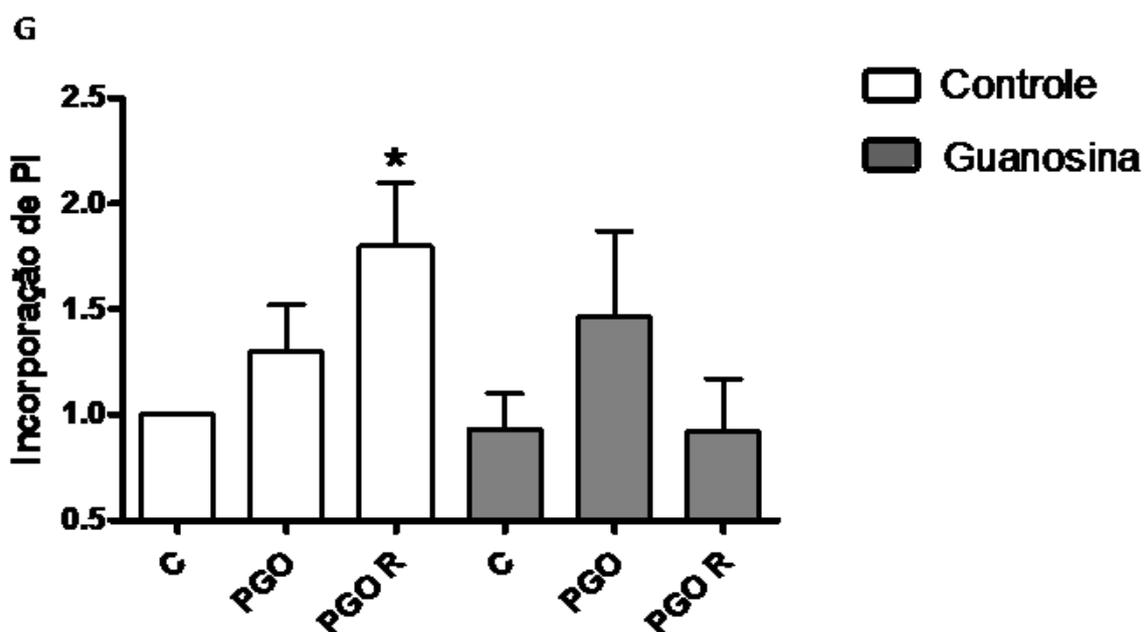
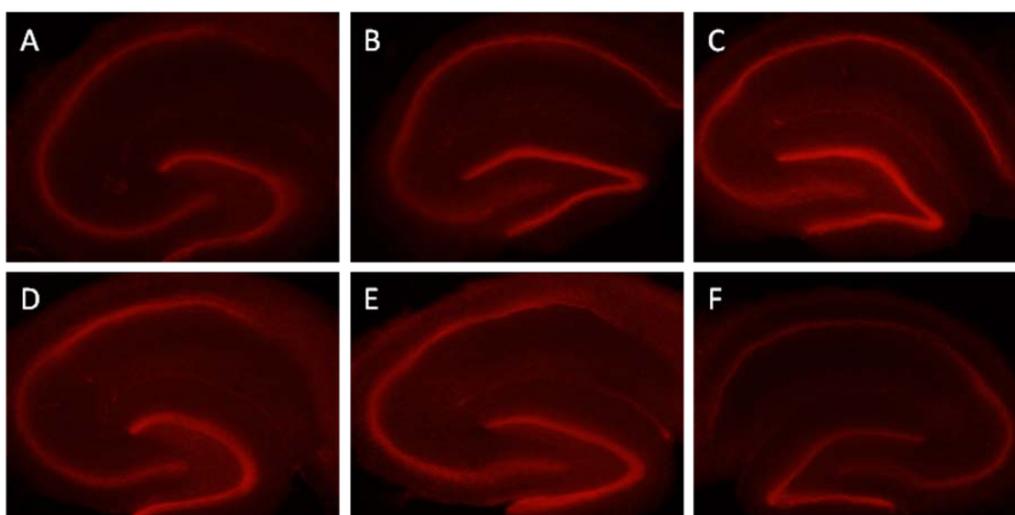


Figura 1. Avaliação da neuroproteção promovida pela guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C) (A), controle com guanosina (B), 15 minutos de PGO (PGO) (C), 15 minutos de PGO com guanosina (D) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) (E) ou presença de guanosina (F). A avaliação da morte celular foi realizada através do método de incorporação de Iodeto de Propídeo. Os valores representam a média \pm desvio padrão da quantidade de PI incorporado em relação ao grupo controle

em 3 experimentos realizados em triplicatas. * indica média diferente do controle; $p < 0,05$ (**G**). (ANOVA seguido do teste de Duncan).

A depleção energética e o desbalanço iônico que ocorrem durante um evento isquêmico podem alterar o funcionamento dos transportadores de glutamato da membrana plasmática. Os transportadores de glutamato dependem da atividade de Na^+/K^+ ATPases para manter o gradiente de concentração de íons sódio (Na^+). A retirada do glutamato da fenda sináptica através de sua captação por seus transportadores de alta afinidade e dependentes de Na^+ é importante, pois diminui os níveis extracelulares de glutamato prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001).

Em nosso laboratório foi demonstrado por Dal-Cim (2008) que a adição de GUO (100 μM) durante a PGO não altera a diminuição da captação de glutamato, mas a presença de GUO durante o período de reperfusão reverte a diminuição da captação de glutamato induzida pela PGO e reperfusão. Para verificar a ação da GUO durante o processo de transporte reverso do glutamato, foram feitos experimentos para observar se há liberação de glutamato em nosso modelo de isquemia (Fig.2). Foi então observado que as fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO apresentam um significativo aumento na liberação de glutamato quando comparadas ao grupo controle. A adição de GUO durante a PGO não altera esse aumento da liberação de glutamato. Quando as fatias são mantidas por 2 horas adicionais de reperfusão observamos que ocorre um significativo aumento na liberação de glutamato. Entretanto, a presença de GUO durante o período de reperfusão consegue reverter o aumento da liberação induzida pela PGO e reperfusão (Fig. 2).

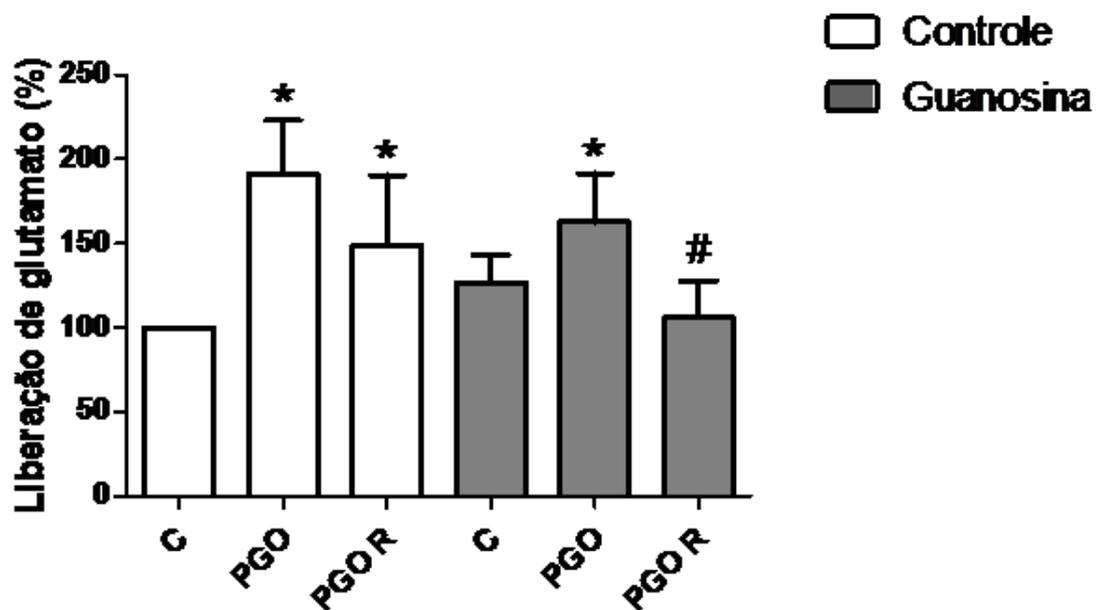


Figura 2. Avaliação do efeito da guanosina sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com guanosina, por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina. A liberação de D-[³H]Aspartato foi realizada de acordo com o protocolo descrito nos materiais e métodos. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em porcentagem de L-[³H]Glutamato em relação ao controle. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO na presença de GUO e PGO R; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

5.2 – Atorvastatina

Diversos estudos vêm sendo realizados demonstrando que as estatinas também exercem efeitos pleiotrópicos que parecem ser independentes da sua ação de diminuição dos níveis de colesterol (Miida et al., 2004), possuindo ação neuroprotetora em diversas doenças neurológicas (Stepien et al., 2005). Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que o tratamento de camundongos com atorvastatina (10 mg/kg, v.o.) por sete dias reduz o número de animais convulsionados após a administração i.c.v. de ácido quinolínico, bem como, apresentou efeito neuroprotetor sobre a morte celular avaliada no hipocampo induzida por este agente glutamatérgico (Piermartiri et al., 2009).

Com isso, fomos avaliar a neuroproteção exercida pela atorvastatina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. No ensaio de MTT mostrado na figura 3, observamos que em 15 minutos de PGO e 15 minutos de PGO com 2 horas de reperfusão diminuem significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle. O pré-tratamento *in vivo* com a atorvastatina não reverte a diminuição da viabilidade celular induzida pela PGO. No entanto, a presença da atorvastatina reverteu a diminuição da viabilidade celular quando em 15 minutos de PGO mais 2 horas de reperfusão. Já o ensaio da captação de glutamato (Fig. 4), nos mostrou que uma PGO seguida ou não por reperfusão diminuem a captação de glutamato, porém este efeito é revertido pelo pré-tratamento com atorvastatina somente após 15 min de PGO seguidos de reperfusão.

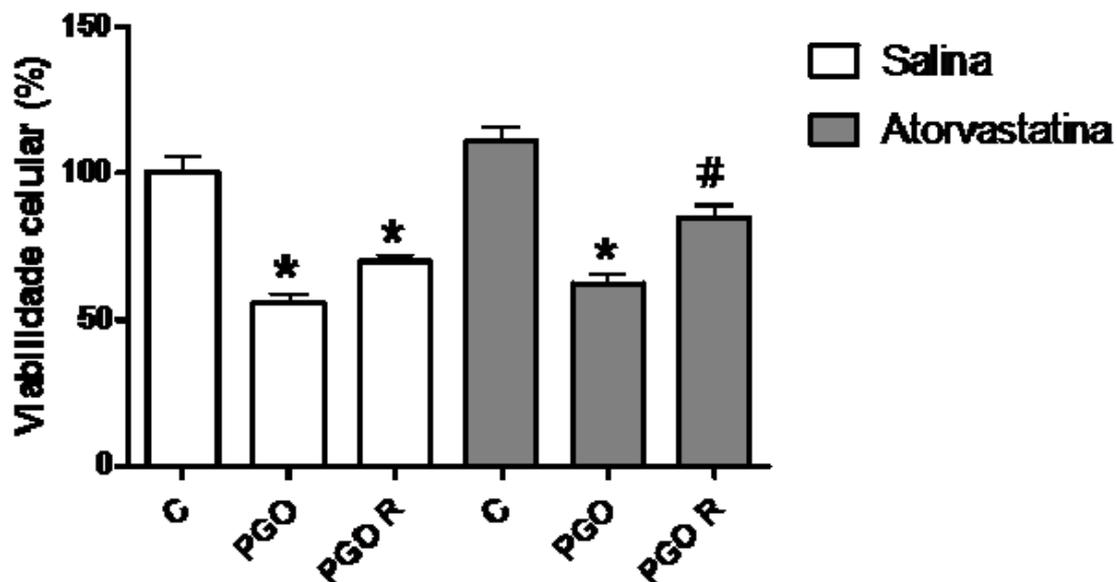


Figura 3. Avaliação da neuroproteção promovida pela atorvastatina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Camundongos foram tratados com veículo (n=6) (salina 0.9%, v.o.) ou atorvastatina (n=7) (10 mg/kg, v.o.) por sete dias. Camundongos foram decapitados 24h após o último dia de tratamento e seus hipocampos foram removidos e fatiados para o ensaio de viabilidade celular. Fatias foram incubadas por 15 min em PGO (PGO) e submetidas ou não a 2h de reperusão (PGO R) antes de avaliar a viabilidade celular através do método do MTT. Fatias controle (C) foram mantidas em tampão KRB durante o experimento. Os valores representam a média \pm SEM de experimentos realizados em triplicatas. * indica média diferente do grupo controle; # indica média diferente dos grupos PGO; $p < 0.05$ (ANOVA seguido do teste de Duncan).

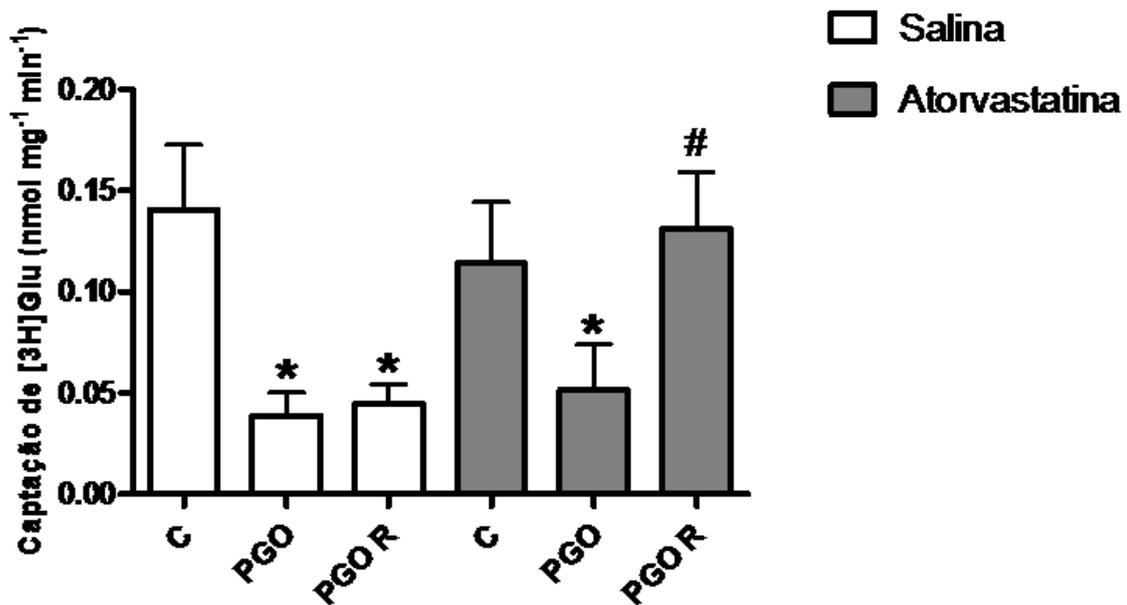


Figura 4. Avaliação do efeito da atorvastatina sobre a captação de L-[³H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Camundongos foram tratados com veículo (salina 0.9%, v.o.) ou atorvastatina (n=5 por grupo) (10 mg/kg, v.o.) por sete dias. Camundongos foram decapitados 24h após o último dia de tratamento e seus hipocampos foram removidos e fatiados para o ensaio de captação de *in vitro* como descrito nos materiais e métodos. Fatias foram incubadas por 15 min em PGO (PGO) e submetidas ou não a 2h de reperusão (PGO R) antes de avaliar a captação de glutamato. A captação de L-[³H]Glutamato foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]Glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média \pm SEM de experimentos realizados em triplicatas. * indica média diferente do grupo controle; # indica média diferente dos grupos PGO e PGO R; $p < 0.05$ (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Outros dados recentes e evidências clínicas indicam que alguns dos efeitos das estatinas, independentes da redução dos níveis de colesterol, ou efeitos pleiotrópicos, envolvem a melhora ou restauração da função endotelial e redução do estresse oxidativo e inflamação vascular (Takemoto & Liao, 2001). Com base nestas evidências,

avaliamos os níveis de NPSH e observamos que com 15 minutos de PGO seguida de reperfusão, há uma diminuição significativa nos níveis de tióis não-proteicos quando comparado com o grupo controle e 15 min de PGO. Este efeito é revertido nas fatias hipocâmpais dos animais que receberam o tratamento de atorvastatina e foram submetidas a 15 min de PGO seguida por 2h de reperfusão (Fig.5).

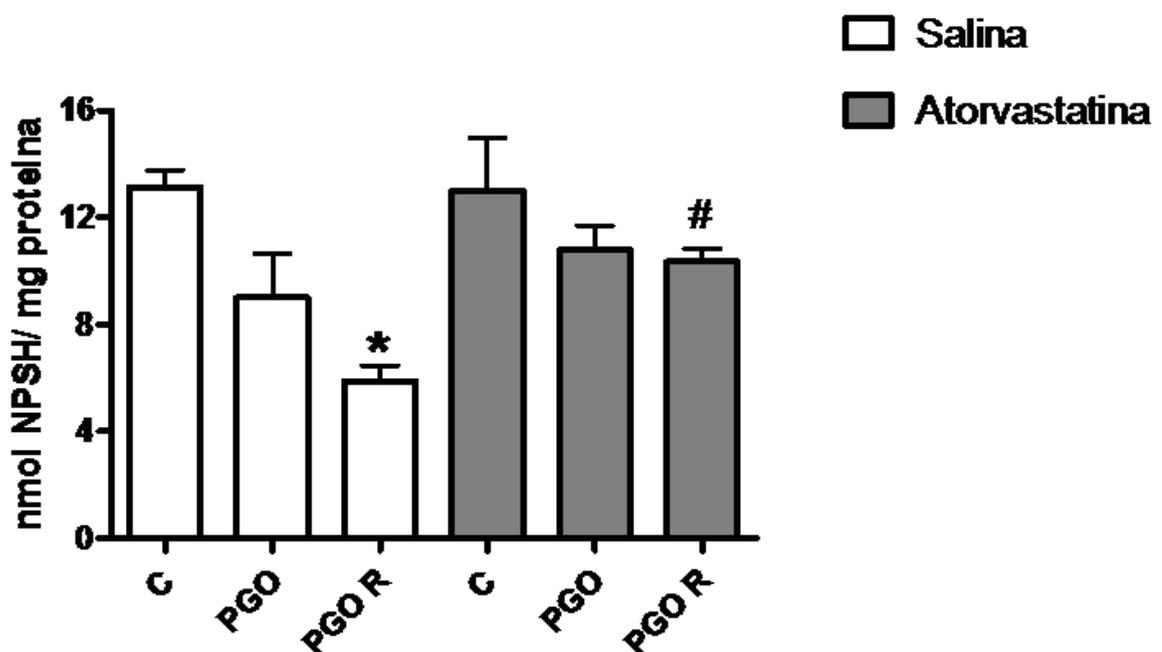


Figura 5. Avaliação dos níveis de NPSH em fatias de hipocampo submetidas à PGO após o tratamento *in vivo* com atorvastatina. Camundongos foram tratados com veículo (salina 0.9%, v.o.) ou atorvastatina (n=7 por grupo) (10 mg/kg, v.o.) por sete dias. Camundongos foram decapitados 24h após o último dia de tratamento e seus hipocâmpos foram removidos e fatiados para a determinação de NPSH. Fatias foram incubadas por 15 min em PGO (PGO) e submetidas ou não a 2h de reperfusão (PGO R) antes de calcular a quantidade de NPSH. Fatias controle (C) foram mantidas em tampão KRB durante o experimento. Os valores representam a média \pm SEM de experimentos realizados em triplicatas. * indica média diferente do grupo controle; # indica média diferente do grupo PGO R; $p < 0.05$ (ANOVA seguido do teste de Duncan).

5.3 – Galantamina

Muitos trabalhos têm demonstrado um grande potencial neuroprotetor em diferentes tipos de modelos de doenças neurodegenerativas para a galantamina, principalmente em se tratando do Mal de Alzheimer. Assim, fomos avaliar se esse fármaco também exerceria seu papel neuroprotetor em nosso modelo de isquemia hipocampal. Observamos que em 15 min de PGO e 15 min de PGO seguido de 2 horas de reperfusão, ocorre uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle. O tratamento com a galantamina não alterou a diminuição da viabilidade celular induzida pela PGO submetidas ou não à 2h de reperfusão (Fig.6).

Quando observado os resultados da captação de glutamato, vemos que os grupos com 15 min de PGO na presença ou ausência de galantamina e 15 min de PGO seguido de reperfusão apresentam uma diminuição significativa da captação de glutamato. Porém, na presença de galantamina observou-se uma reversão parcial na diminuição de captação de glutamato no grupo de 15 min de PGO seguido de reperfusão (Fig.7).

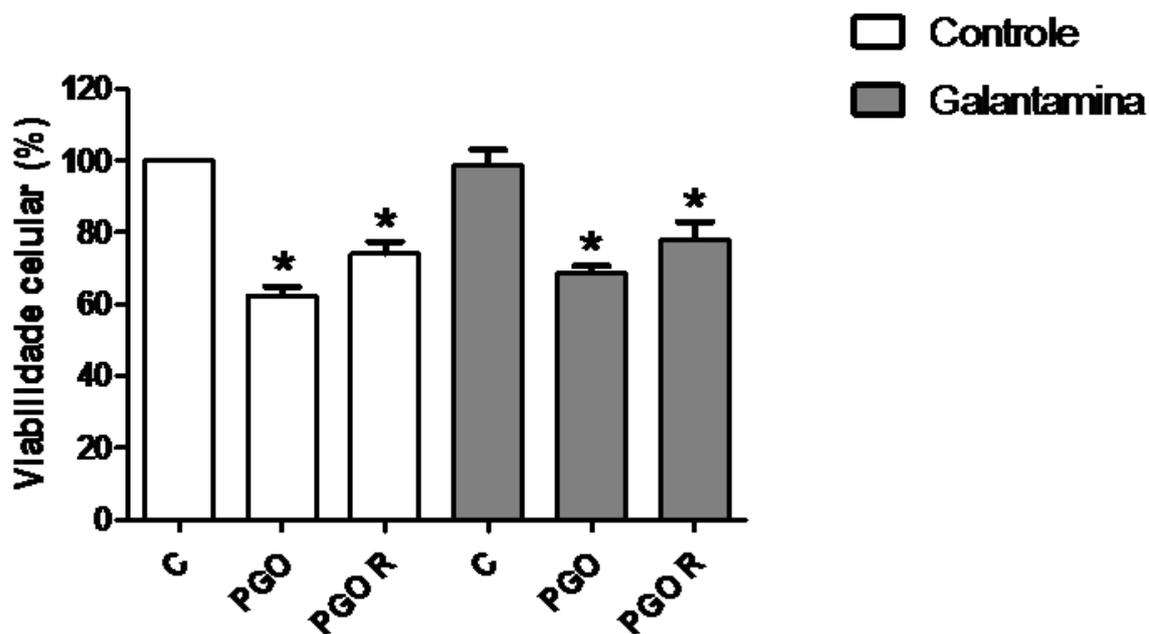


Figura 6. Avaliação da neuroproteção promovida pela galantamina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com galantamina por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de galantamina. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm SEM de 5 experimentos realizados em triplicatas. * indica média diferente do grupo controle (ANOVA seguido do teste de Duncan).

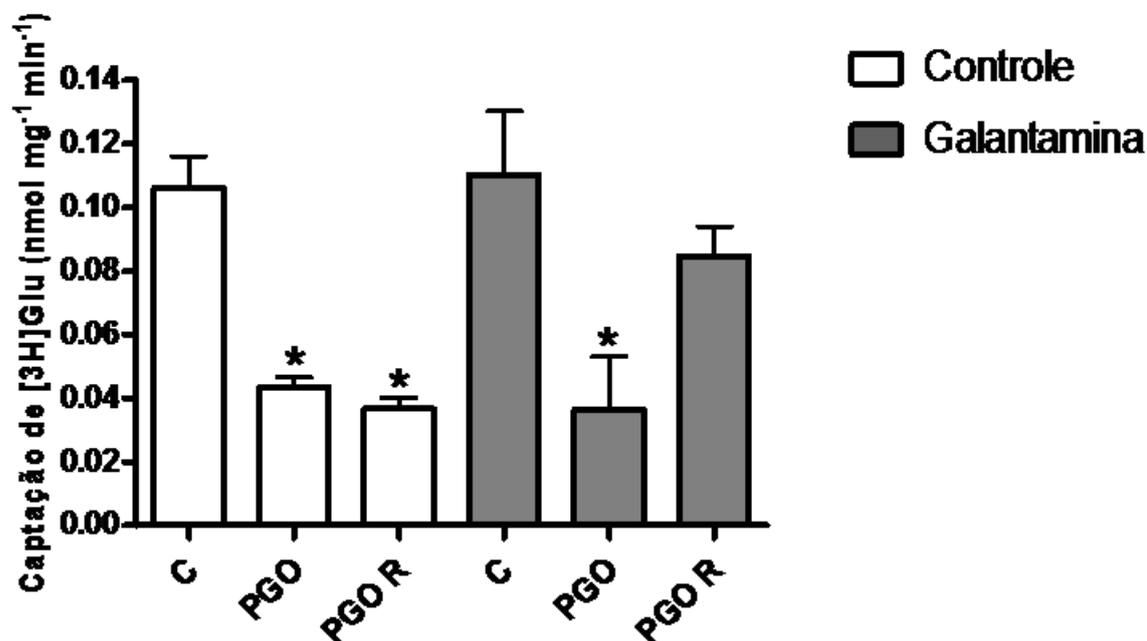


Figura 7. Avaliação do efeito da galantamina sobre a captação de L-[³H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com galantamina por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de galantamina. A captação de L-[³H]Glutamato foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]Glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

6 - Discussão

O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio e glicose, isso se deve ao fato de que os neurônios dependem quase que exclusivamente da glicólise aeróbica para obter ATP (Doyle et al., 2008). Quando o fluxo sanguíneo cerebral é interrompido há uma diminuição da oferta de glicose e oxigênio no cérebro o que resulta em uma rápida disfunção metabólica, especialmente em células neuronais. Este evento é denominado isquemia cerebral e é caracterizado por uma severa degeneração das células e conseqüente perda das funções cerebrais (Mattson, 2000).

Neste estudo utilizamos como modelo de isquemia a privação de glicose e oxigênio em fatias de hipocampo. Neste tipo de preparação, a citoarquitetura e a organização da matriz extracelular são mantidas, criando um microambiente *in vitro* onde as conexões entre células neuronais e gliais são conservadas (Gong et al., 2001; Molz et al., 2008). Além disso, o hipocampo é utilizado por ser a área mais susceptível do sistema nervoso central à isquemia, sendo que os neurônios da área CA1 são os mais vulneráveis (Schmidt-Kastner & Freund, 1991).

O estudo de compostos que possam minimizar os efeitos da isquemia cerebral é de grande relevância, sabendo-se que essa patologia é uma das principais causas de morte no mundo. Neste estudo utilizamos três possíveis agentes neuroprotetores frente a um modelo de isquemia, o nucleosídeo guanosina, a atorvastatina e a galantamina.

6.1 – Guanosina

Evidências na literatura têm demonstrado o papel neuroprotetor dos DG e da guanosina frente a insultos excitotóxicos (Schmidt et al., 2007). A administração crônica de guanosina (GUO) *in vivo* previne o aparecimento de crises convulsivas e morte celular em modelos de excitotoxicidade glutamatérgica (Lara et al, 2001; Vinadé et al, 2003). Em estudos *in vitro* já é demonstrado o papel neuroprotetor da GUO frente à PGO em fatias de córtex e fatias de hipocampo (Frizzo et al, 2002; Oleskovicz et al., 2008). Em modelo de isquemia *in vivo* a GUO é capaz de diminuir o volume de infarto induzido pela oclusão da artéria média cerebral (Chang et al., 2008).

Com isso, nosso primeiro passo neste estudo foi avaliar o potencial neuroprotetor da GUO e o tipo de dano celular presente durante a PGO e reperfusão. Avaliamos a incorporação de iodeto de propídeo em células com membrana danificada ou permeabilizada, como um indicativo de ocorrência de morte celular necrótica durante nosso modelo de isquemia *in vitro*. As fatias de hipocampo que foram submetidas à PGO junto com uma reperfusão de 2 horas apresentam aumento significativo no dano celular. Este dano é revertido quando a GUO é incubada no período de reperfusão após a privação de glicose e oxigênio. Porém neste estudo e com esta metodologia empregada, os grupos com 15 min de PGO na presença ou ausência de GUO, apesar de aumentarem os níveis de morte celular, não apresentaram resultados significativos diferentes em relação ao controle (Fig.1). Esses dados corroboram com o que já foi demonstrado na literatura em respeito da reperfusão, que após insultos isquêmicos pode ser mais danosa às células neurais (Sharkey et al., 1997) pois nesse período ocorre uma grande oferta de oxigênio às células, causando um desequilíbrio

energético intracelular e este pode não ser totalmente reduzido ocorrendo produção de espécies reativas de oxigênio.

Através de experimentos realizados em nosso laboratório foi demonstrado por Dal-Cim e colaboradores (2008) que a GUO pode aumentar a captação de glutamato em fatias de hipocampo quando submetidas à PGO seguida de reperfusão. Além disso, a GUO é capaz de prevenir a diminuição de captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos neonatos expostos a hipóxia (Moretto et al., 2005). Como havia então a possibilidade de que a GUO estivesse participando de mecanismos de redução da liberação de glutamato, seja pela atividade reversa de seus transportadores induzida pela isquemia (Bonde et al., 2003), ou pela redução da liberação vesicular (Tasca et al., 2004), verificamos a quantidade de glutamato liberado durante um evento isquêmico. Com os resultados obtidos, podemos ver que as fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO apresentam um significativo aumento na liberação de glutamato quando comparadas ao grupo controle e que a GUO não altera esse aumento da liberação de glutamato. Já quando as fatias são mantidas por 2 horas adicionais de reperfusão observamos que ocorre um significativo aumento na liberação de glutamato, mas a presença de GUO durante o período de reperfusão consegue reverter essa liberação induzida pela PGO seguida de reperfusão. Este efeito apresentado pela GUO é de grande relevância, visto que, a massiva liberação de glutamato, e conseqüentemente seu acúmulo na fenda sináptica que ocorre na isquemia, é uma das principais causas de morte celular decorrente deste evento (White et al., 2000; Camacho & Massieu, 2006).

6.2 – Atorvastatina

No tratamento *in vivo* com atorvastatina iniciamos o estudo avaliando o potencial neuroprotetor dessa estatina frente à PGO, já que diversos estudos vêm sugerindo que as estatinas podem exercer um amplo efeito neuroprotetor diante de diversas condições patológicas. Em nosso laboratório, foi mostrado que a atorvastatina (10 mg/kg, v.o.) administrada por sete dias reduz o número de animais convulsionados após a administração i.c.v. de ácido quinolínico e apresenta efeito neuroprotetor sobre a morte celular avaliada no hipocampo induzida por este agente glutamatérgico (Piermartiri et al., 2009). Assim, quando os animais são pré-tratados com atorvastatina e as fatias de hipocampo obtidas dos mesmos são submetidas à PGO, a atorvastatina não altera a diminuição da viabilidade celular induzida pela PGO. No entanto, a presença da atorvastatina reverteu a diminuição da viabilidade celular após 15 min de PGO seguido de 2 horas de reperfusão (Fig.3).

O próximo passo foi avaliar como a atorvastatina estaria exercendo essa neuroproteção. Sabendo que a retirada de glutamato da fenda sináptica através da captação desse neurotransmissor é um processo crucial para manter as concentrações de glutamato abaixo do seu nível tóxico (Danbolt, 2001), fomos verificar o efeito da atorvastatina sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.

Os transportadores de glutamato são vulneráveis ao aumento das espécies reativas de oxigênio que ocorrem no período de reperfusão (Trotti et al., 1998), causando uma diminuição na captação de glutamato (Brongholi et al., 2006). Nós observamos que as fatias que foram submetidas à PGO, ou à PGO seguida de

reperfusão, apresentam significativa diminuição na captação de glutamato e isso corrobora com os dados de viabilidade celular, onde esses mesmos grupos apresentam diminuição de viabilidade em relação ao controle. A atorvastatina é capaz de promover neuroproteção e aumento da captação de glutamato nas fatias submetidas à PGO e reperfusão (Fig. 4). Pode-se dizer então, que a proteção promovida pela atorvastatina está relacionada com sua capacidade de aumentar a captação de glutamato. Além disso, nos estudos de avaliação dos níveis de NPSH em fatias de hipocampo submetidas à PGO após o tratamento *in vivo* com atorvastatina, vimos que na PGO e reperfusão ocorre uma diminuição significativa nos níveis de glutatona quando comparado com o grupo controle, sendo que este efeito é revertido nas fatias hipocampais dos animais que receberam o tratamento de atorvastatina (Fig.5). A glutatona é o mais abundante tiol não-protéico em neurônios e astrócitos de mamíferos, possuindo função de um importante antioxidante (Cooper & Kristal, 1997; Dringen, 2000). Deste modo, pode-se inferir que a atorvastatina exerce neuroproteção também por prevenir a redução nos níveis desse antioxidante, ajudando no combate às espécies reativas de oxigênio.

6.3 – Galantamina

A galantamina foi utilizada pela primeira vez em nosso laboratório, porém outros estudos vinham demonstrando alguns efeitos neuroprotetores deste fármaco, inclusive em modelos de privação de glicose e oxigênio (Sobrado et al., 2004). Mesmo com estudos confirmando uma ação neuroprotetora da galantamina, no ensaio de MTT, seguindo nosso protocolo, observamos que após a PGO e PGO com reperfusão, ocorre uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle.

Entretanto, o tratamento com a galantamina não reverteu a diminuição da viabilidade celular induzida pela PGO e reperfusão nas fatias de hipocampo (Fig.6). Ainda que tenha ocorrido uma pequena melhora na viabilidade celular durante a reperfusão quando a galantamina está presente, não foi obtido resultados estatisticamente significantes em relação aos outros grupos PGO.

Quando observado os resultados da captação de glutamato, vemos que os grupos com 15 min de PGO na presença ou ausência de galantamina e 15 min de PGO seguido de reperfusão apresentam uma diminuição significativa da captação de glutamato em relação ao controle. É possível observar também um aumento na captação de glutamato nas fatias submetidas à 15 min de PGO seguido de reperfusão e tratadas com galantamina. Entretanto, esses valores não foram estatisticamente significantes em relação aos outros grupos PGO, sugerindo apenas uma reversão parcial da diminuição dessa captação de glutamato (Fig.7). Estudos adicionais serão realizados para confirmar o efeito da galantamina sobre o transporte de glutamato, bem como sobre o mecanismo de ação deste fármaco.

7 - Conclusões

- Durante um evento isquêmico e reperfusão ocorre morte celular necrótica e liberação de glutamato. A guanosina consegue reverter tanto o dano celular, como o aumento da liberação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO seguida de reperfusão;

- A atorvastatina previne a morte celular induzida por PGO e reperfusão através do aumento da captação glutamatérgica e da prevenção da redução dos níveis de antioxidantes presentes nas células. Assim, a atorvastatina pode ser uma estratégia útil na prevenção de danos cerebrais causados por doenças cerebrovasculares, como a isquemia;

- A galantamina não desempenhou um papel neuroprotetor em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao nosso modelo de isquemia *in vitro* mas apresenta um efeito parcial na reversão da redução da captação de glutamato.

8 - Referências Bibliográficas

- ARIAS, E., ALÉS, E., GABILAN, N.H., CANO-ABAD, M.F., VILLARROYA, M., GARCIA, A.G. & LÓPEZ, M.G. “Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors”. *Neuropharmacology*, 46, 103–114, 2004.
- BENFENATI V., CAPRINI M., NOBILE M., RAPISARDA C., FERRONI S. “Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes”. *J Neurochem*. 98(2):430-45, 2006.
- BOECK C.R., GANZELLA M., LOTTERMANN A., VENDITE D.. “NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice”. *Epilepsia*. 45(7):745-50, 2004.
- BONDE, C., SARUP, A., SCHOUSBOE, A., GEGELASHVILI, G., ZIMMER, J., NORABERG, J.. “Neurotoxic and Neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions”. *Neurochem. Int*. 43:371-380, 2003.
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., McCORMICK, F. “The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions”. *Nature* 348: 125-131, 1990.
- BRONGHOLI K., SOUZA D.G., BAINY A.C., DAFRE A.L., TASCA C.I. “Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices”. *Brain Res*. 1083(1):211-8, 2006.

- CAMACHO, A. & MASSIEU, L. "Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia its relation to neuronal death". Arch. Med. Research. 37: 11-18, 2006.
- CHANG, R., ALGIRD, A., BAU, C., RATHBONE, M.P., JIANG, S. "Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo". Neurosci Lett. 431:101-5, 2008.
- CHEN, L.; HAUGHT, W. H.; YANG, B.; SALDEEN, T. G. P.; PARTHASARATHY, S.; MEHTA, J.L. "Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine". J. Am. Coll. Cardiol. 30: 569-575, 1997.
- CICCARELLI, R., DI IORIO, P., GIULIANI, P. , D'ALIMONTE, I., BALLERINI, P., CACIAGLI, F., RATHBONE, M.P. "Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia." Glia 25: 93-8, 1999.
- CICCARELLI, R., BALLERINI, P., SABATINO, G., RATHBONE, M.P., D'ONOFRIO, M., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. "Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain". Int. J. Dev. Neurosci. 19: 395-414, 2001.
- COOPER, A.J., KRISTAL, B.S. "Multiple roles of glutathione in the central nervous system". Biol. Chem. 378, 793–802, 1997.
- COYLE, J.T., GEERTS, H., SORRA, K. & AMATNIEK, J. " Beyond in vitro data: a review of in vivo evidence regarding the allosteric potentiating effect of galantamine on nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's neuropathology". J. Alzheimers Dis., 11, 491–507, 2007.

- DAL-CIM, T. “Estudo dos mecanismos de neuroproteção promovida pela guanosina em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio”
Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008
- DANBOLT, N.C. “Glutamate uptake”. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.
- DECKER H, FRANCISCO S.S., MENDES-DE-AGUIAR C.B., ROMÃO L.F.,
BOECK C.R., TRENTIN A.G., MOURA-NETO V, TASCA C.I. “Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture”. *J Neurosci Res.* 85(9):1943-51, 2007.
- DOYLE, K.P, SIMON R.P., STENZEL-POORE M.P. “ Mechanisms of ischemic damage”. *Neuropharmacology* 55: 310-318, 2008.
- DRINGEN, R. “Metabolism and functions of glutathione in brain”. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671, 2000.
- ELLMAN, G. L. “Tissue sulfhydryl groups”. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77, 1959.
- FRIZZO, M.E.S., LARA D.R., DAHM, K.C.S., PROKOPIUK, A.S., SWANSON R.,
SOUZA, DO. “Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures”. *Neuroreport* 12: 1-3, 2001.
- FRIZZO, M.E.S., LARA, D.R., PROKOPIUK, A.S., VARGAS, C.R., SALBEGO, C.G.,
WAJNER, M., SOUZA, D.O. “Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions”. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 353-363, 2002.
- GEGELASHVILI, G., SCHOUSBOE, A. “High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity”. *Mol. Pharmacol.* 52:6-15, 1997.
- GEERTS, H. “Indicators of neuroprotection with galantamine”. *Brain Res. Bull.*, 64, 519–524, 2005.

- GONG, C.X., LIDSKY, T., WEGIEL, J., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K.
“Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain”. *Brain Res Brain Res Protoc.* 6:134-40, 2001.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. “Free radicals in biology and medicine”.
Oxford University Press, New York, 1999.
- HUNTER, A.J., MACKAY, K.B., ROGERS, D.C. “To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents?” *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 59–66, 1998.
- JICK, H.; ZORNBERG, G. L.; JICK, S. S.; SESHADRI, S.; DRACHMAN, D. A.
“Statins and the risk of dementia”. *Lancet* 356: 1627-1631, 2000.
- LARA, D.R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E.S., BURGOS, J.S., RAMIREZ, G., SOUZA, D.O. “Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents”. *Brain Res.* 912: 176-180, 2001.
- LEE, Jin-Koo; WON, Je-Seong; SINGH, Avtar K.; SINGH, Inderjit. “Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death”. *Neuroscience Letters* 440, 260–264, 2008.
- LENZKEN, S.C., LANNI, C., GOVONI, S., LUCCHELLI, A., SCETTINI, G. & RACCHI, M. “Nicotinic component of galantamine in the regulation of amyloid precursor protein processing”. *Chem. Biol. Interact.*, 165, 138–145, 2007.
- LIM, J.H., LEE, J-C., LEE, Y.H., Choi, I.Y., Oh, Y-K., Kim, H-S., PARK, J-S., Kim, W-K. “Simvastatin prevents oxygen and glucose deprivation/reoxygenation-induced death of cortical neurons by reducing the production and toxicity of 4-hydroxy-2E-nonenal”. *Journal of Neurochemistry*, 97, 140–150, 2006.

- LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders". *The New Engl. J. Med.* 330: 613-622, 1994.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-275, 1951.
- LU, D.; GOUSSEV, A.; CHEN, J.; PANNU, P.; LI, Y.; MAHMOD, A.; CHOPP, M. "Atorvastatin Reduces Neurological Deficit and Increases Synaptogenesis, Angiogenesis, and Neuronal Survival in Rats Subjected to Traumatic Brain Injury". *J Neurotrauma.* 21(1): 21-32, 2004.
- MATTSON, M.P. "Apoptosis in neurodegenerative disorders". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:120-129, 2000.
- MELDRUM, B.S. "Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology". *Journal of Nutrition.* 130: 1007S-1015S, 2000.
- MELO, J.B., SOUSA, C., GARÇÃO, P., OLIVEIRA, C.R., AGOSTINHO, P. "Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons". *European Journal of Neuroscience*, Vol. 29, pp. 455–464, 2009.
- MICHAELIS, E.K. "Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their Role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging". *Progress in Neurobiology* 54: 369-415, 1998.
- MIIDA, T., HIRAYAMA, S., NAKAMURA, Y. "Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia". *J. Atheroscler Thromb*, 11:253-264, 2004.
- MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J.L., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. "Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevent by GMP". *Neurochem. Res.* 30:83-89, 2005.

- MOLZ, S., DAL-CIM, T., DECKER, H., TASCA, C.I. "GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices". *Brain Res.* Jul 11, 2008.
- MORETTO, M.B., ARTENI, N.S., LAVINSKY, D., NETTO, C.A., ROCHA, J.B.T., SOUZA, D.O., WOLFCHUK, S. "Hipoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: Prevention by guanosine". *Exper. Neurobiol.* 195: 400-406, 2005.
- MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods.* 16;65(1-2):55-63, 1983.
- NEARY, J.T., RATHBONE, M.P., CATTABENI, F., ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G. "Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells." *Trends Neurosci.* 19: 13-8,1996.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry – 3rd Ed.* New York, Worth Publishers, p 799-814, 2000.
- OBRENOVITCH, T. P. & URENJAK, J. "Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessiva Synaptic Efficacy". *Progr. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.
- OLESKOVICZ S.P, MARTINS W.C, LEAL R.B, TASCA C.I. "Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation". *Neurochem Int.* v. 52 (issue 3), p. 411-8, 2008.
- OLIVEIRA, I.J., MOLZ, S., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. "Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia". *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:335-344, 2002.

- PIERMARTIRI, T.C., VANDRESEN-FILHO, S., HERCULANO, B., MARTINS, W.C., DALL'AGNOLO, D., STROEH, E., CARQUEJA, C.L., BOECK, C.R., TASCA, C.I. "Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death due to Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice by Increasing Akt Phosphorylation and Glutamate Uptake". *Neurotox. Res.* 16:106–115, 2009.
- POCOCK, J.M., NICHOLLS, D.G. "Exocytotic and nonexocytotic models of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischemia". *J. Neurochem.* 70: 806-813, 1998.
- ROSSI, DJ., OSHIMA, T., ATTWELL, D. "Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake". *Nature* 403: 316-321, 2000.
- SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., SOUZA, D.O. "Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system". *Pharmacol Ther.* 116:401-16, 2007.
- SCHMIDT-KASTNER, R. & FREUND, T.F. "Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia". *Neuroscience.* 40:599-636, 1991.
- SHARKEY, K., KELLY, J. S., BUTCHER, S.P. "Inflammatory Responses to Cerebral Ischemia: Implications for Stroke Treatment" In: *Clinical Pharmacology in Cerebral Ischemia* (Ter Horst, G.J., Korf, J., eds) 235-263, Human Press, 1997.
- SOBRADO, M., RODA, J.M., LÓPEZ, M.G., EGEA, J., GARCÍA, A.G. "Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen–glucose deprivation". *Neuroscience Letters* 365, 132–136, 2004.
- STEPIEN, K., TOMASZEWSKI, M. & CZUCZWAR, S. J. "Neuroprotective properties of states". *Pharmacol. Rep.* 57, 561-569, 2005.

- STRUZYNSKA, L., CHALIMONIUK, M., SULKOWSKI, G. "Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain". *Neurochem. Int.* 47:326-333, 2005.
- TAKEMOTO, M. & LIAO, J. K. "Pleiotrophic Effects of 3-Hydroxi-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1712-1719, 2001.
- TASCA, C.I., WOFCHUK, S.T., SOUZA, D.O., RAMÍREZ, G., RODNIGHT, R. "Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate". *Neuroreport* 6: 249-252, 1995.
- TASCA, C.I., CARDOSO, L.F., MARTINI, L.H., RAMÍREZ, G., SOUZA, D.O. "Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation". *Neurochem. Res.* 23: 183 -188, 1998.
- TASCA, C.I., CARDOSO, L.F., SOUZA, D.O. "Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks." *Neurochem. Int.* 34:13-220, 1999.
- TASCA, C.I., SANTOS, T.G., TAVARES, R.G., BATTASTINI, A.M.O., ROCHA, J.B.T., SOUZA, D.O. "Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles". *Neurochem. Inter.* 44:423-431, 2004.
- TROTTI, D., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. "Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?" *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 328-334, 1998.

- UNGER, C., SYEDBERG, M.M., YU, W.F., HEDBERG, M.M. & NORDBERG, A.
“Effect of subchronic treatment of memantine, galantamine, and nicotine in the brain of Tg2576 (APP^{swe}) transgenic mice”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317, 30–36, 2006.
- VAUGHAN, C. J. “Prevention of Stroke and Dementia with Statins: Effects Beyond Lipid Lowering” . *Am. J. Cardiol.* 91(suppl): 23B-29B, 2003.
- VINADÉ, E.R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E.S., PORTELA, L.V., SOARES, F.A., SCHWALM, F.D., ELISABETSKY, E., IZQUIERDO, I., SOUZA, D.O.
“Chronically administered guanosine is anticonvulsivant, amnesic and anxiolytic in mice”. *Brain Res.* 977: 97-102, 2003.
- WHITE, B.C., SULLIVAN, J.M., DEGRACIA, D.J., O'NEIL, B.J., NEUMAR, R.W., GROSSMAN, L.I., RAFOLS, J.A., KRAUSE, G.S. “Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury”. *J. Neurol. Sci.* 179:1-33, 2000.
- WOLOZIN, B.; KELLMAN, W.; RUOSSEAU, P.; CELESIA, G. G.; SIEGEL, G.
“Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors”. *Arch. Neurol.* 57: 1439-1443, 2000.