

Fabiana Kalyne Ludka

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
NEUROPROTETOR E TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA  
ATORVASTATINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Carla Inês Tasca

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ludka, Fabiana Kalyne  
ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
NEUROPROTETOR E TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA /  
Fabiana Kalyne Ludka ; orientadora, Carla Inês Tasca -  
Florianópolis, SC, 2016.  
206 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

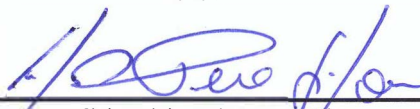
1. Bioquímica. 2. Atorvastatina. 3. Efeito tipo  
antidepressivo. 4. Efeito neuroprotetor. 5. Neuroproteção.  
I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

**"Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina"**

Por

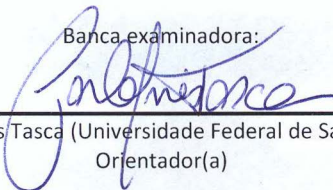
**Fabiana Kalyne Ludka**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (007/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

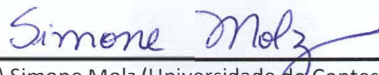


Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

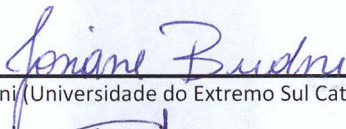
Banca examinadora:



Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



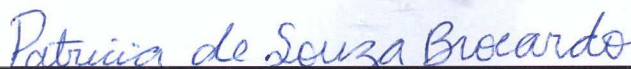
Dr(a) Simone Molz (Universidade do Contestado)



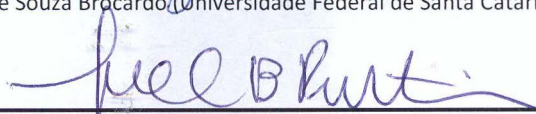
Dr(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr(a) Rodrigo Bainy Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Patrícia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Tetsadê Camboim Bizerra Piermartiri (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a professora orientadora, Dra Carla I. Tasca, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e experiência repassada, pela paciência, dedicação e confiança;

Aos professores do colegiado do PPG/BQA UFSC, em especial a professora Dra Ana Lúcia Severo Rodrigues, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência e principalmente por toda discussão científica que auxiliou na execução deste trabalho;

A minha primeira orientadora e incentivadora prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Simone Molz. Obrigada por abrir as portas desse mundo tão instigante e por ser o exemplo de pesquisadora que me fez almejar seguir avidamente por este caminho;

A minha família! Minha mãe, Salete Adur Ludka pela disposição, pela companhia e pelo amor inesgotável. Sem você eu não teria conseguido! Ao meu pai Orestes Silvio Ludka que sempre acreditou no meu sucesso e sabiamente soube me guiar e incentivar a tomar decisões certas; e a minha irmã Flávia Rafaela Ludka, pela companhia agradável, por ser cúmplice da minha jornada e acima de tudo por me apoiar, ajudar e ser minha amiga. Ao meu noivo Roberto Fernando Olsen pela paciência, compreensão e apoio;

A todos os pesquisadores do Laboratório de Neuroquímica 4, em especial aqueles que auxiliaram diretamente na execução deste trabalho. A minha amiga Leandra Celso Constantino. Muitos foram os experimentos, as conversas, os seminários, e as experiências trocadas. Muito, muito obrigada pela tua companhia e tua amizade! A Tharine Dal-Cim, pela amizade, pela ajuda e pelos ensinamentos repassados. Obrigada por acreditar que no final tudo daria certo! A Luisa Binder e ao Caio Massari pela disponibilidade para auxiliar na realização dos experimentos;

Aos pesquisadores do Laboratório de Neurobiologia da depressão, em especial ao Dr. Maurício P. Cunha, pela disponibilidade em ajudar na execução deste trabalho, pelos grandes momentos de convívio e por todos os ensinamentos repassados;

As minhas amigas e companheiras de apartamento Gislaine Kuminek e Gislaine Olescowicz. Obrigada pela companhia, por toda a ajuda, pelo incentivo, pelas horas de conversas intermináveis e por compartilharem comigo as dúvidas e angústias dessa vida acadêmica!

A Universidade do Contestado, especialmente ao colegiado do curso de Farmácia pelo incentivo e pela torcida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento da pesquisa com bolsa auxílio (Chamada Pública FAPESC n.01/2012. Projeto: “Estudo dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina”;

Aos animais experimentais. Obrigada por terem sido a ferramenta para o meu aperfeiçoamento;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“O importante é não parar de questionar”  
(Albert Einstein)





## RESUMO

A atorvastatina é um fármaco da classe das estatinas, utilizado na clínica médica há algumas décadas para o tratamento dos altos níveis de colesterol sérico. Estudos têm demonstrado que além deste efeito primário, a atorvastatina desencadeia efeitos pleiotrópicos. Os efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina têm sido demonstrados, no entanto, os mecanismos celulares e moleculares, a participação de vias de sinalização e neurotransmissores, bem como a associação entre esses eventos ainda precisam ser elucidados. Desta forma, investigou-se: i) o envolvimento dos sistemas adenosinérgico, serotoninérgico e da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina e ii) o efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor do tratamento repetido com atorvastatina frente as alterações induzidas pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, bem como pela toxicidade induzida por glutamato. Os resultados demonstraram que a atorvastatina desencadeia efeito tipo-antidepressivo que depende da modulação dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina, mas não dos receptores A<sub>2A</sub> ou dos níveis de adenosina. O efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina também depende da modulação dos receptores de serotonina (5-HT) dos subtipos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/C</sub> e dos níveis encefálicos de 5-HT. Demonstrou-se que a via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR é crucial para o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, através de testes comportamentais e pelo aumento da fosforilação hipocampal das proteínas Akt, GSK-3 $\beta$  e mTOR. O efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina frente às alterações comportamentais e neurotóxicas induzidas pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> dependem do aumento da razão mBDNF/pró-BDNF ocasionado pela clivagem induzida pelas proteases tPA e p11. A atorvastatina previne ainda o aumento hipocampal de óxido nítrico, de espécies reativas de oxigênio, bem como a alteração do potencial de membrana mitocondrial e a perda de viabilidade celular ocasionada pela toxicidade induzida por glutamato *in vitro*. Resultado similar foi observado para o tratamento com fluoxetina. A associação entre o efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor do tratamento repetido com atorvastatina foi evidenciado, e demonstrou-se que o tratamento agudo com atorvastatina não exerce efeito neuroprotetor frente à toxicidade glutamatérgica. Desta forma, esta tese contribui para demonstrar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina.



## ABSTRACT

Atorvastatin is a drug that belongs to statins group and that is largely used in clinical medicine for the treatment of high serum cholesterol levels. Studies have shown that in addition to this primary effect, atorvastatin also triggers pleiotropic effects. The neuroprotective and antidepressant-like effects of atorvastatin have been demonstrated, however cellular and molecular mechanisms, the involvement of signaling pathways and neurotransmitters, as well as the association between these events remain to be elucidated. Thus we investigated: i) the involvement of adenosinergic and serotonergic systems and the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR signaling pathway in the antidepressant-like effect of atorvastatin, and ii) the neuroprotective and antidepressant-like effect provided by repeated atorvastatin treatment against A $\beta$ <sub>1-40</sub>-induced alterations or glutamate-induced toxicity. Atorvastatin exerts antidepressant-like effect that depends on the adenosine A<sub>1</sub> receptors, but not on adenosine levels or A<sub>2A</sub> receptors. The atorvastatin antidepressant-like effect also depends on serotonin (5-HT) levels and 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors subtypes. We also demonstrated that PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR signaling pathway is critical for atorvastatin antidepressant-like effect, by behavioral tests and increased phosphorylation of Akt, GSK-3 $\beta$  and mTOR in mice hippocampus. The neuroprotective and antidepressant-like effect of atorvastatin against A $\beta$ <sub>1-40</sub>-induced toxicity depends on the increase in mBDNF/pro-BDNF ratio promoted by tPA and p11 proteases. Atorvastatin also prevents hippocampal increase of nitric oxide, reactive oxygen species and the alteration of mitochondrial membrane potential and cell viability induced by in vitro glutamate challenge. Similar results were observed for fluoxetine treatment. The association between the antidepressant-like and neuroprotective effect of atorvastatin-repeated treatment was shown and acute atorvastatin treatment showed no effect on glutamate-induced toxicity. This study contributed to unravel the cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective and antidepressant-like effects of atorvastatin.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> - Esquema da neurotransmissão serotoninérgica .....	23
<b>Figura 2</b> - Transmissão glutamatérgica.....	26
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo do mecanismo de ação rápido da cetamina .....	33
<b>Figura 4</b> - Estrutura química das estatinas .....	35
<b>Figura 5</b> - Diagrama da via de biossíntese do colesterol mostrando a inibição da HMG - CoA redutase pelas estatinas .....	36

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo da escala de tratamento dos animais para avaliação da participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. ....	55
<b>Figura 2</b> - Avaliação da participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina .....	57
<b>Figura 3</b> - Avaliação da participação dos receptores de adenosina do subtipo A <sub>1</sub> no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.....	58
<b>Figura 4</b> - Avaliação da participação dos receptores de adenosina do subtipo A <sub>2A</sub> no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.....	59
<b>Figura 5</b> - Avaliação da participação do transporte de adenosina no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina .....	60

### ANEXO A

<b>Figure 1</b> - <i>Time table of treatments and schedule of behavioral and biochemical tests</i> .....	63
<b>Figure 2</b> - <i>Effect of pretreatment with PCPA on atorvastatin-induced anti-immobility effect in the TST (A) and on the number of crossings in the OFT (B) in mice</i> .....	65
<b>Figure 3</b> - <i>Effect of pretreatment with WAY100635 on atorvastatin-induced anti-immobility effect in the TST (A) and on the number of crossings in the OFT (B) in mice</i> .....	66
<b>Figure 4</b> - <i>Effect of pretreatment with ketanserin on atorvastatin-induced anti-immobility effect and on the number of crossings in the OFT (B) in mice...</i>	66
<b>Figure 5</b> - <i>Effect of co-administration of sub-effective doses of fluoxetine, paroxetine or sertraline with atorvastatin in the TST (A,C,E) and on the number of crossings in the OFT (B,D,F)</i> .....	67

### ANEXO B

<b>Figure 1</b> - <i>Effect of treatment of mice with LY294002 on the anti-immobility effect of atorvastatin</i> .....	79
<b>Figure 2</b> - <i>Effect of combined sub-effective doses of GSK-3<math>\beta</math> inhibitors and atorvastatin</i> .....	80
<b>Figure 3</b> - <i>Effect of the treatment of mice with rapamycin on the anti-immobility effect of atorvastatin</i> .....	81
<b>Figure 4</b> - <i>Effect of atorvastatin treatment on hippocampal Akt, GSK-3<math>\beta</math> and mTOR phosphorylation</i> .....	82

**Figure 5** - Schematic view of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR signaling pathway involvement in atorvastatin antidepressant-like effect in mice ..... 83

## CAPÍTULO II

### ANEXO A

<b>Figure 1</b> - Overview of experimental procedure protocol.....	100
<b>Figure 2</b> - Effect of atorvastatin on A $\beta$ <sub>1-40</sub> -induced depressive-like or anhedonic-like behavior.....	106
<b>Figure 3</b> - Effect of atorvastatin on A $\beta$ <sub>1-40</sub> -induced hippocampal cell death.....	107
<b>Figure 4</b> - Effect of atorvastatin on A $\beta$ <sub>1-40</sub> -induced impairment in glutamate uptake and on GS activity.....	108
<b>Figure 5</b> - Effect of atorvastatin and A $\beta$ <sub>1-40</sub> on BDNF levels.....	109
<b>Figure 6</b> - Effect of atorvastatin and A $\beta$ <sub>1-40</sub> on BDNF, tPA and p11 mRNA expression.....	110
<b>Figure 7</b> - Correlation between m-BDNF/proBDNF ratio, depressive-like behavior and cell death.....	111
<b>Figure 8</b> - Schematic view of neuroprotective and antidepressant-like effect of atorvastatin against A $\beta$ <sub>1-40</sub> toxicity.....	116

### ANEXO B

<b>Figure 1</b> -Participation of NO and ROS production in the mechanism of cellular damage induced by glu in hippocampal slices .....	129
<b>Figure 2</b> - Time course of glu incubation for NO and ROS production and $\Delta\Psi_m$ impairment.....	130
<b>Figure 3</b> - Effect of acute or repeated Atorvastatin or Fluoxetine treatment to mice hippocampal slices subjected to glutamate toxicity ex vivo .....	131
<b>Figure 4</b> - Effect of atorvastatin or fluoxetine repeated-treatment on D-[3H] aspartate release induced by glu toxicity .....	131
<b>Figure 5</b> - Effect of atorvastatin or fluoxetine treatment on increased NO, ROS and disrupted $\Delta\Psi_m$ induced by glu incubation.....	132
<b>Figure 6</b> - Antidepressant-like effect of repeated atorvastatin or fluoxetine treatment.....	132
<b>Figure 7</b> - Schematic view of effects promoted by atorvastatin or fluoxetine repeated treatment.....	133

### DISCUSSÃO

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração aguda de atorvastatina a camundongos .....	146
<b>Figura 2</b> - Desenho representativo do efeito promovido pelo tratamento agudo ou repetido com atorvastatina.....	159

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AADC</b>	Aminoácido aromático descarboxilase
<b>A<math>\beta</math></b>	Peptídeo beta amiloide
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>Akt</b>	Proteína cinase B
<b>AMP</b>	Adenosina-5'-monofosfato
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>AR</b>	Receptor de adenosina
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>A<sub>1</sub>R</b>	Receptor de adenosina do subtipo 1
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Receptor de adenosina do subtipo 2 <sup>a</sup>
<b>AII<sub>t</sub></b>	Tetrâmero de anexina II
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
<b>CCPA</b>	2-cloro-N6-ciclopentil-adenosina
<b>CCVD</b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>CHA</b>	Ciclohexiladenosina
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CYP</b>	Citocromo P
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DPCPX</b>	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
<b>DPMA</b>	N-6-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(metal-fenil)etil]adenosine
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DSM-V</b>	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais
<b>EAAT</b>	Transportadores de aminoácidos excitatórios
<b>eEF2</b>	Fator de alongamento eucariótico 2
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GLAST</b>	Transportador de glutamato/aspartato
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	L-Glutamato
<b>GLT-1</b>	Transportador de glutamato-1
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclica
<b>GS</b>	Glutamina sintetase
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glicogênio sintase cinase 3-B

<b>HDL-c</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HMG</b>	Hidróxi-metil-glutaril
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>iGluR</b>	Receptores ionotrópicos de glutamato
<b>iMAO</b>	Inibidores da monoamina oxidase
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>ISRS</b>	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
<b>IRN</b>	Inibidores da recaptção de noradrenalina
<b>IRSN</b>	Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina
<b>KA</b>	Kainato
<b>LDL-c</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MAO</b>	monoamina oxidase
<b>mBDNF</b>	BDNF maduro
<b>mGluR</b>	Receptores metabotrópicos de glutamato
<b>MPTP</b>	1-metil-1,4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NMDAR</b>	Receptor de N-metil-D-aspartato
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PAI-1</b>	Inibidor do ativador de plasminogênio 1
<b>PDK1</b>	Fosfoinositídeo-cinase 1-dependente
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-1,4,5-bifosfato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinase
<b>PKB</b>	Proteína cinase B
<b>p.o.</b>	Via oral
<b>PPAR-gama</b>	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais
<b>pró-BDNF</b>	Proteína precursora de Mdbnf
<b>PSD95</b>	Proteína de densidade pós-sináptica
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TCA</b>	Antidepressivos tricíclicos
<b>TCA</b>	Teste do campo aberto
<b>TCAn</b>	Ciclo do ácido cítrico
<b>TH</b>	triptofano hidroxilase
<b>TNF</b>	Teste do nado forçado
<b>tPA</b>	Ativador de plasminogênio tecidual
<b>TrkB</b>	Tropomiosina cinase B



<b>TRYP</b>	Triptofano
<b>TSC</b>	Teste de suspensão pela cauda
<b>WAY100635</b>	Ciclohexanocarboxamida
<b>ZM241385</b>	4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo-{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)-fenol
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>4E-BP</b>	Proteína ligante de 4E
<b>5-HIAA</b>	Ácido 5-hidróxi-indol-acético
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina ou serotonina
<b>5-HTP</b>	5-hidroxitriptofano
<b>5-HTR</b>	receptor de serotonina



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1.1 Depressão: Considerações gerais</b> .....	21
1.1.1 Bases biológicas da depressão .....	22
1.1.2 Sistema glutamatérgico.....	25
1.1.3 Comorbidade depressão e Doença de Alzheimer.....	29
1.1.4 Fármacos antidepressivos e neuroproteção.....	31
<b>1.2 Estatinas</b> .....	<b>34</b>
1.2.1 Efeito neuroprotetor e antidepressivo .....	38
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	45
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	45
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	45
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
<b>5 RESULTADOS</b> .....	49
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1 Material e Métodos</b> .....	53
5.1.1 Animais.....	53
5.1.2 Drogas e tratamento .....	53
5.1.3 Administração i.c.v. ....	53
5.1.4 Desenho Experimental .....	54
5.1.5 Ensaio Comportamentais.....	55
5.1.5.1 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC).....	55
5.1.5.2 Teste do Campo Aberto (TCA).....	56
5.1.6 Análise Estatística.....	56
<b>5.2 Resultados</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXO A: Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice</b> .....	61
<b>ANEXO B: Involvement of PI3K/Akt/GSK-3<math>\beta</math> and mTOR in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice</b> .....	71
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXO A: Atorvastatin protects from A<math>\beta</math><sub>1-40</sub>-induced cell death and depressive-like behavior via BDNF cleavage</b> .....	95
<b>ANEXO B: Atorvastatin and Fluoxetine prevent oxidative stress and mitochondrial dysfunction evoked by glutamate toxicity in hippocampal slices</b> .....	123
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	139
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	161
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	163
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	165
<b>ANEXO A: Trabalhos realizados em colaboração durante o período de execução do doutorado</b> .....	205



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Depressão: Considerações Gerais

A depressão é um transtorno mental crônico e recorrente associado à diminuição da qualidade de vida e ao aumento da morbidade e mortalidade (Spijker et al., 2004; Üstün et al., 2000), de forma que promove sofrimento incalculável, prejuízos funcionais que limitam a vida social do paciente e acarretam altos custos financeiros (McIntyre et al., 2006; Picchini et al., 2004; Prince et al., 2007). É caracterizada por humor deprimido, anedonia, irritabilidade, sentimento de desvalia ou culpa, dificuldade de concentração e anormalidades do apetite e sono, fadiga e pensamentos recorrentes de morte e suicídio (Nestler et al., 2002).

O diagnóstico de depressão maior pode ser realizado de acordo com o Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais (DSM-V), que propõe como principais critérios: i) a presença de humor deprimido ou anedonia por um período superior a duas semanas; ii) prejuízo das funções sociais, ocupacionais e educacionais; iii) presença de sintomas específicos como humor deprimido e irritação; diminuição do interesse e prazer pela maioria das atividades; mudanças significativas de peso corpóreo, apetite e sono; fadiga e sentimentos de inutilidade; culpa excessiva, diminuição da concentração e tentativa de suicídio (Compare et al., 2014).

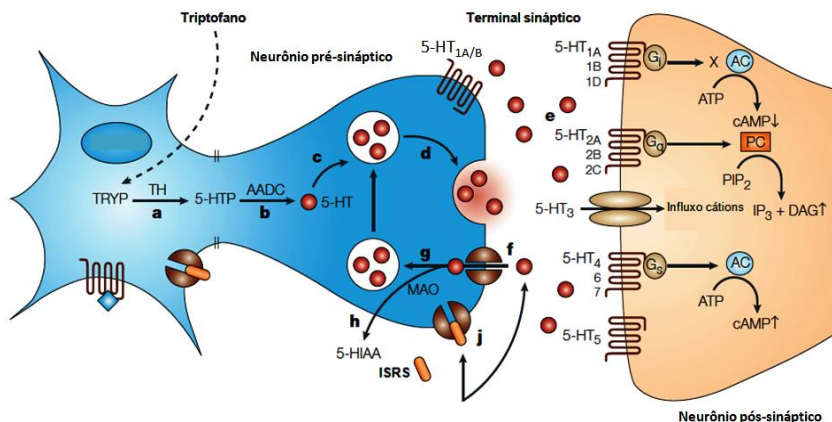
A Organização Mundial da Saúde apontou a depressão como a quarta causa de incapacidade em 1990 e acredita que em 2020, este transtorno de humor venha a ser o segundo causador de incapacidades em todo o mundo (Murray e Lopez, 1996). O transtorno acomete duas vezes mais mulheres do que homens (Van de Velde; Bracke; Levecque, 2010), e estima-se que um a cada seis indivíduos nos Estados Unidos da América irá desenvolver depressão durante a vida, com o primeiro episódio na infância ou adolescência (Kessler et al., 2005). No Brasil a prevalência de depressão ao longo da vida é de 18,4 %, uma das mais altas do mundo (Bromet et al., 2011).

Apesar da alta incidência mundial, não existe um claro consenso acerca da neuropatologia da depressão (Krishnan e Nestler, 2010). Já se sabe que fatores genéticos e ambientais contribuem para a vulnerabilidade de um indivíduo ao desenvolvimento desta doença (Ansorge et al., 2007), e várias teorias tem sido propostas para tentar explicar a etiologia e a neurobiologia deste transtorno (Shaltiel; Chen; Manji, 2007).

### 1.1.1 Bases biológicas da depressão

Uma das mais antigas e bem aceitas teorias propostas para explicar as bases biológicas e neuroanatômicas da depressão é a teoria monoaminérgica (Hirschfeld, 2000). Proposta há mais de 40 anos atrás, esta teoria baseou-se na observação de que os sintomas clínicos dos pacientes com depressão são influenciados pela manipulação farmacológica do sistema monoaminérgico. Desta forma, a teoria monoaminérgica da depressão postula que uma deficiência funcional ou quantitativa das monoaminas, em especial da 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT) e/ou da noradrenalina (NA) em regiões cerebrais (Coppen, 1967; Schildkraut, 1965), seria o fator responsável pelas alterações encefálicas e pela sintomatologia clínica dos pacientes com depressão.

Alterações na neurotransmissão serotoninérgica têm sido apontadas como um fator comum nas doenças psiquiátricas, em especial na depressão. A 5-HT é um neurotransmissor sintetizado a partir do aminoácido triptofano (TRYP) por ação das enzimas triptofano hidroxilase (TH) e L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC). A 5-HT atua por interagir com múltiplos receptores divididos em 7 subtipos (5-HT<sub>1R</sub> – 5-HT<sub>7R</sub>) (Figura 1) (Kriegebaum et al., 2010; Owens e Nemeroff, 1994). Dentre os subtipos de receptores, os 5-HT<sub>1AR</sub> e 5-HTR<sub>2A/C</sub>R encontram-se entre os mais bem estudados e parecem estar envolvidos na etiologia da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos respectivamente (Artigas, 2012; Blier e Abbott, 2001). Apesar de ambos serem receptores acoplados a proteínas-G (Kriegebaum et al., 2010) e estarem localizados nos terminais pós-sinápticos, os 5-HT<sub>1AR</sub> podem também estar localizados nos terminais pré-sinápticos e atuar como auto-receptores inibitórios, sendo que o aumento da expressão desses auto-receptores já foi demonstrado em pacientes com depressão (Boldrini et al., 2008; Parsey et al., 2002; Stockmeier et al., 1998).



**Figura 1. Esquema da neurotransmissão serotoninérgica.** a) Triptofano hidroxilase (TH) cataliza a conversão do triptofano (TRYP) a 5-hidroxitriptofano (5-HTP). b) Aminoácido aromático descarboxilase (AADC) catalisa a conversão de 5-HTP a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT). c) 5-HT é estocado em vesículas e d) liberado para a fenda sináptica. e) 5-HT pode ativar subtipos de receptores da família 5-HT (1-7) e ativar ou inibir vias de transdução de sinal no neurônio pós-sináptico. f) 5-HT é captada no neurônio pré-sináptico pelos transportadores de 5-HT. g/h) nos terminais pré-sinápticos 5-HT pode ser estocado em vesículas ou degradado pela monoamina-oxidase (MAO). i) 5-HT ativa o auto-receptor pré-sináptico 5-HT<sub>1A</sub>, que pode ser bloqueado por antagonistas seletivos de receptor de 5-HT<sub>1A</sub>. j) Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina inibem o transporte de 5-HT. 5-HIAA, ácido 5-hidroxi-indol-acético; AC, adenilato ciclase; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5 trifosfato; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Adaptado de Wong; Perry; Bymaster, 2005).

Uma das mais convincentes evidências da participação do sistema serotoninérgico na etiologia da depressão envolve o alívio dos sintomas depressivos por antidepressivos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) (Elhwuegi, 2004). Além disso, o fato de que uma concentração reduzida de 5-HT, bem como de seu principal metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) ter sido encontrada no tecido encefálico de pacientes com depressão (em análises *postmortem*) (Asberg et al., 1976; Roy et al., 1989) reforçam a importância da participação do sistema serotoninérgico na etiologia desta doença. Desta forma, os tratamentos baseados na teoria monoaminérgica resultaram em importantes descobertas clínicas e impulsionaram o entendimento

acerca dos mecanismos fisiopatológicos deste transtorno do humor, melhorando as opções de tratamento (Niciu; Kelmendi; Sanacora, 2012).

Classicamente os antidepressivos podem ser divididos em: i) inibidores da monoamina oxidase (iMAO); ii) tricíclicos (TCA); iii) inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS); iv) inibidores da recaptação de 5-HT e noradrenalina (IRSN), v) inibidores da recaptação de noradrenalina (IRN), dentre outros antidepressivos com mecanismos de ação diferenciados (Racagni e Popoli, 2008). Dentre os antidepressivos clássicos, os ISRS estão entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo para o tratamento da depressão, transtorno obsessivo compulsivo, bulimia e pânico (Kroeze; Zhou; Homberg, 2012), por apresentarem melhor tolerância e menores índices de abandono de tratamento do que observado com o uso de outras classes de antidepressivos (Anderson, 2000; Montgomery e Kasper, 1995).

A fluoxetina foi o primeiro medicamento da classe dos ISRS aprovado para uso pelas autoridades reguladoras na Europa e nos Estados Unidos da América, sendo considerado o medicamento de escolha para o tratamento da depressão (Brambilla et al., 2005; Sghendo e Mifsud, 2011). Apesar do mecanismo de ação inicial deste fármaco já estar elucidado, avanços acerca dos mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia e tratamento da depressão apontam para o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores e outras moléculas no mecanismo de ação não apenas da fluoxetina, mas dos antidepressivos em geral (Duman, 2014; Maletic et al., 2007).

Desta forma, a teoria monoaminérgica por si só torna-se incompleta quando se tenta explicar a neuropsicofarmacologia da depressão e/ou o mecanismo de ação dos antidepressivos clássicos (Sanacora; Treccani; Popoli, 2012), e algumas inconsistências nesta teoria têm sido apontadas. Os antidepressivos utilizados na clínica aumentam os níveis das monoaminas em minutos ou horas, enquanto o efeito terapêutico só é observado depois de algumas semanas de tratamento (Racagni e Popoli, 2008). Em concordância, apenas cerca de 50-60% dos pacientes com depressão atingem a remissão completa dos sintomas clínicos com o primeiro antidepressivo clássico utilizado (Trivedi et al., 2006). Ainda, o fato de que nem todas as drogas que aumentam os níveis de monoaminas são necessariamente efetivas no tratamento da depressão dá consistência à ideia da participação de outros



sistemas de neurotransmissores na neurobiologia da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos (Lanni et al., 2009).

Neste contexto, na década de 90, a observação de que os antagonistas dos receptores de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) possuem efeito tipo-antidepressivo trouxe a “hipótese glutamatérgica da depressão” (Trullas e Skolnick, 1990). Esta teoria vem sendo reforçada por estudos clínicos que trazem evidências de anormalidades na transmissão glutamatérgica em áreas límbicas e corticais do encéfalo de pacientes com depressão (Lan et al., 2009; Sanacora e Saricicek, 2007). Além disso, o rápido efeito farmacológico de substâncias como a cetamina, um antagonista dos receptores NMDA que, em baixas doses, apresenta efeito antidepressivo rápido e sustentado, corrobora a existência da relação entre disfunção glutamatérgica e depressão (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006). Este efeito rápido, ocasionado por uma droga com mecanismo de ação completamente diferente dos clássicos inibidores da recaptção de monoaminas, representa um dos mais importantes achados para o tratamento da depressão nos últimos 60 anos (Duman, 2014).

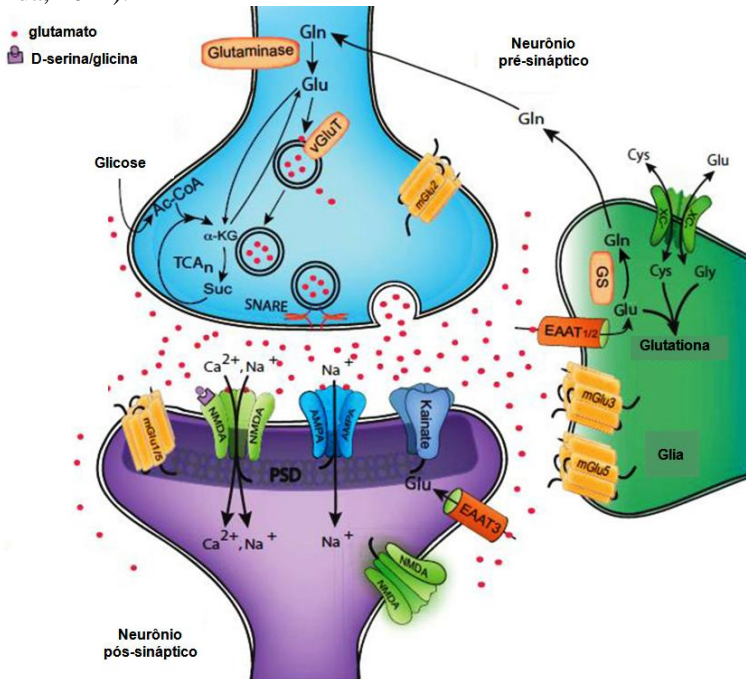
### 1.1.2 Sistema glutamatérgico

O aminoácido L-glutamato (Glu) é um neurotransmissor excitatório presente na vasta maioria dos neurônios, sendo a transmissão glutamatérgica envolvida na cognição e emoção, duas funções cerebrais que parecem estar intimamente relacionadas (Danbolt, 2001; Pessoa, 2008). O Glu é armazenado em vesículas nos neurônios pré-sinápticos e em resposta ao aumento da concentração de íons cálcio a vesícula funde-se à membrana neuronal liberando o Glu para a fenda sináptica, que pode por sua vez interagir com receptores pré ou pós-sinápticos (Figura 2) (Kew e Kemp, 2005; Takamori, 2006).

Existem basicamente dois tipos de receptores glutamatérgicos: i) metabotrópicos (mGluR), representados por 8 diferentes subtipos de receptores protéicos com sete domínios transmembrana acoplados às proteínas-G e ii) ionotrópicos (iGluR), que são canais iônicos, representados pelos receptores NMDA, receptor do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e kainato (KA) (Kenny e Markou, 2004; Kew e Kemp, 2005). Enquanto a informação rápida no Sistema Nervoso Central (SNC) é mediada por receptores AMPA, os receptores NMDA tendem a manterem-se abertos por um período de tempo maior do que os receptores AMPA e KA, permitindo uma intensa entrada de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que inicia uma cascata de sinalização

intracelular cálcio-dependente que leva a alterações na expressão gênica e na força sináptica (Whitlock et al., 2006).

Dentre os iGluRs, o subtipo NMDAR possui a maior afinidade pelo Glu (Niciu, Kelmendi, Sanacora, 2012) e é constituído de complexos heteroméricos compostos por quatro subunidades, cada uma contendo uma isoforma diferente: GluN1, GluN2 e GluN3 (Paoletti; Bellone; Zhou, 2013). Os receptores NMDA são predominantemente formados pela subunidade GluN1, que é essencial para funcionalidade do receptor, em combinação com pelo menos um tipo da subunidade GluN2 (Cull-Candy; Brickley; Farrant, 2001; Hardingham, 2009). A diferente composição das subunidades dos receptores NMDA apresenta distribuição, características funcionais e farmacológicas distintas (Gonda, 2012).



**Figura 2. Transmissão glutamatergica.** O aminoácido L-glutamato (Glu), sintetizado a partir do ciclo do ácido cítrico (TCA) é encontrado em vesículas no neurônio pré-sináptico. A fusão das vesículas e a liberação de glutamato em resposta a um potencial de ação é um mecanismo cálcio-dependente que envolve o complexo de proteínas SNARE. Uma vez na fenda sináptica, o Glu liga-se aos receptores pós-sinápticos modulando vias de sinalização intracelulares. O Glu difunde-se da fenda sináptica e é captado por

transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) presentes na célula da glia. Grande parte do Glu captado pelas células da glia é convertido a glutamina (Gln), que sofre difusão passiva novamente para os neurônios, onde é convertida a Glu pela enzima glutaminase (Adaptado de Pittenger; Bloch; Williams 2011).

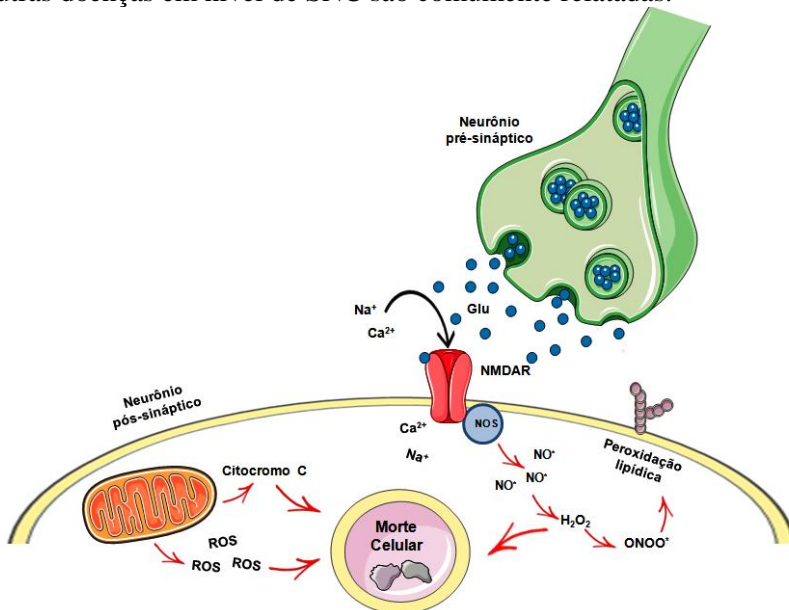
Uma vez que pouca ou nenhuma conversão do Glu é realizada a nível extracelular, este interage com seus receptores até que seja difundido ou captado da fenda sináptica por ação dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT), que são dependentes de sódio e mantém os níveis fisiológicos desse aminoácido excitatório (Danbolt, 2001; Featherstone, 2010). A maior parte dos EAAT está presente nos astrócitos próximos às sinapses glutamatérgicas, o que sugere que uma vez captado, o Glu é convertido à glutamina (Gln) por ação da enzima glutamina sintetase (GS). A Gln é então liberada para o espaço extracelular e é captada por transportadores neuronais. Por ação das glutaminases, a Gln é novamente convertida a Glu, mantendo a funcionalidade do “ciclo glutamato-glutamina” (Danbolt, 2001; Tani et al., 2014).

A retirada do Glu da fenda sináptica é um importante mecanismo de prevenção da toxicidade glutamatérgica (Phillis e O’regan, 2002). A excitotoxicidade é o termo utilizado para referir-se aos eventos tóxicos decorrentes da ativação prolongada ou excessiva de receptores de aminoácidos excitatórios (Lipton, 2007) (Figura 3). Apesar dos mecanismos intracelulares responsáveis pela injúria neuronal da toxicidade glutamatérgica não estarem ainda totalmente elucidados, alguns pontos já estão bem estabelecidos (Lau e Tymianski, 2010).

A toxicidade induzida por Glu é dependente da interação deste com os receptores AMPA ou KA, que ao induzirem despolarização da membrana, liberam o bloqueio por magnésio dos receptores NMDA. Estes receptores permeiam uma intensa entrada de  $Ca^{2+}$  capaz de interagir com calmodulina e formar o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que por sua vez ativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) promovendo o aumento de óxido nítrico (NO) (Esplugues, 2002; Siegel et al., 2006). Uma vez formado, o NO pode formar peroxinitrito por interação com as espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical superóxido, que pode levar à nitração e à oxidação de proteínas, além de acarretar em peroxidação lipídica e danos ao DNA (Radi et al., 2001; Stamler; Lamas; Fang, 2001) culminando em morte celular (Brown e Borutaite, 2004). A estimulação excessiva dos receptores NMDA bem como o influxo maciço de  $Ca^{2+}$  pode acarretar em alterações do potencial de

membrana mitocondrial o que ocasiona modificações da funcionalidade desta organela (Abramov e Duchon, 2008; Keelan; Vergun; Duchon, 1999) e produção exacerbada de ROS (Nicholls e Ward, 2000; Wang e Qin, 2010).

Desta forma, os mecanismos celulares envolvidos na excitotoxicidade são pelo menos em parte responsáveis pelo desenvolvimento de diversas patologias neurodegenerativas (Maragakis e Rothstein, 2006). Além disto, a excitotoxicidade tem sido proposta como um mecanismo importante no desenvolvimento de depressão e de morte celular encefálica (Hashimoto; Sawa; Iyo, 2007; Lanni et al., 2009). A atrofia neuronal e a morte celular em regiões encefálicas responsáveis pelo controle do humor e emoção resultam em perda da função cerebral (Duman e Monteggia, 2006; Krishnan e Nestler, 2008), de forma que em pacientes com depressão outras doenças em nível de SNC são comumente relatadas.



**Figura 2.** Eventos celulares induzidos por excitotoxicidade. Na excitotoxicidade o glutamato (Glu) acumula na fenda sináptica e promove a super estimulação de receptores do subtipo NMDA (NMDAR). Uma vez super ativados NMDAR permitem um influxo intenso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  o que por sua vez estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bem como espécies reativas de nitrogênio (RNS) como óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Altas concentrações

intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS e RNS induzem morte celular em decorrência: da ativação de proteases, peroxidação lipídica, produção de fatores citotóxicos pela microglia, alteração da função mitocondrial e condensação da cromatina. NOS, óxido nítrico sintase.

### 1.1.3 Comorbidade depressão e doença de Alzheimer

A depressão é uma doença associada com o aumento do risco de declínio cognitivo e demência (Barnes et al., 2006), e apesar dos mecanismos envolvidos não estarem completamente elucidados, já foi demonstrado que o desenvolvimento de depressão está relacionado com o aumento de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, dois achados patológicos da doença de Alzheimer (DA) (Rapp et al., 2006; Sun et al., 2009).

A prevalência de depressão varia entre 20 a 50% nos pacientes com DA de forma que a depressão parece preceder o prejuízo cognitivo característico da DA (Enache; Winblad; Aarsland, 2011). De fato, os sintomas neuropsiquiátricos não são apenas uma reação emocional frente à percepção da DA, sendo ocasionados por mudanças neurobiológicas em regiões encefálicas específicas (Andersen et al., 2005).

Interessante é o fato de que depressão e DA compartilham não apenas o acúmulo de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (Metti et al., 2013; Rapp et al., 2006), mas também aumento da morte neuronal e glial (Goedert e Spillantini, 2006; Smialowska et al., 2013) alteração na homeostase da neurotransmissão glutamatérgica (Lan et al. 2009; Paula-Lima; Brito-Moreira; Ferreira, 2013; Sanacora e Saricicek, 2007) e diminuição na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Duman, 2002; Gonul et al., 2005; Karege et al., 2002; Peng et al., 2005), um dos mecanismos envolvidos na diminuição do volume hipocampal e na perda de neurônios em pacientes com depressão e DA.

O BDNF é uma neurotrofina largamente distribuída no SNC de mamíferos cuja expressão e liberação é afetada por estímulos provenientes da neurotransmissão glutamatérgica (Aid et al., 2007, Balaratnasingam and Janca, 2012). Esta neurotrofina é sintetizada como uma proteína precursora (pró-BDNF) que é proteoliticamente clivada para gerar a proteína madura (mBDNF). Enquanto o pró-BDNF ativa preferencialmente o receptor p75NT mediando apoptose, a forma mBDNF ativa seletivamente os receptores tropomiosina-cinase B (TrkB) promovendo sobrevivência celular (Chao; Rajagopal; Lee,

2006). Uma vez que os níveis de BDNF são importantes para a sobrevivência, função e plasticidade neuronal (Lu, 2003; Mufson et al, 2007) alterações funcionais desta proteína podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças mentais (Balaratnasingam e Janca, 2012).

O acúmulo de fibrilas e agregados amorfos do peptídeo beta-amilóide ( $A\beta$ ) é um achado comum em pacientes com DA. Um maior acúmulo do peptídeo  $A\beta$  também ocorre no hipocampo de pacientes de DA com histórico de depressão quando comparado com sujeitos controles (Rapp et al., 2006). O  $A\beta$  é um fragmento proteolítico formado a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP), uma glicoproteína transmembrânica, através de enzimas proteolíticas chamadas  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase (Haass, 2007). Quando essa clivagem é feita pela  $\alpha$ -secretase, a resultante é uma proteína com cerca de 654 a 670 aminoácidos, que pode exercer neuroproteção e neuroplasticidade. Por outro lado, quando a clivagem da APP pode ocorrer pela  $\beta$ -secretase e em seguida pela  $\gamma$ -secretase, Quando a clivagem por uma secretase do subtipo gama acontece no retículo endoplasmático, ocorre a produção de  $A\beta_{1-42}$ , enquanto a produção de  $A\beta_{1-40}$  ocorre na rede trans-Golgi (Tang e Liou, 2007).  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  são os peptídeos amiloidogênicos, predominantemente encontrados no encéfalo de pacientes com DA, uma vez que sofrem agregação e deposição nos neurônios.

Neste sentido, estudos têm demonstrado que um comportamento tipo-depressivo pode ser observado em roedores submetidos à infusão intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) de oligômeros de peptídeo  $A\beta$  (Ledo et al., 2012) tanto em relação aos peptídeos  $A\beta_{1-42}$  (Colaianna et al., 2010) quanto ao  $A\beta_{1-40}$  (dos Santos et al., 2013). Além de promover um comportamento tipo-depressivo em roedores, os peptídeos  $A\beta$  estão também associados à morte celular e neurotoxicidade (Piermartiri et al., 2010; Xu et al., 2014), de forma que a infusão i.c.v. do peptídeo pode ser utilizada para estudar alterações comportamentais e bioquímicas, bem como o efeito de drogas com potencial ação neuroprotetora e antidepressiva. Além disso, a infusão i.c.v. do peptídeo  $A\beta$  pode ser utilizado para o estudo da comorbidade entre depressão e DA, uma vez que desencadeia alterações comportamentais comuns as duas doenças.

O tratamento da depressão fica ainda menos efetivo quando existe uma comorbidade associada e é agravada com a idade em função do prognóstico menos positivo (Beekman et al., 2002). Comumente, o tratamento da depressão se dá pelo uso de antidepressivos de uso oral, porém evidências apontam para o fato de que os antidepressivos

clássicos são ineficazes no tratamento de depressão em pacientes com DA (Banerjee et al., 2013; Rosenberg et al., 2010). Desta forma, a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento dessas patologias, bem como o entendimento do mecanismo de ação dos antidepressivos têm sido impulsionado e representa uma importante estratégia na busca de tratamentos efetivos para estas enfermidades.

#### 1.1.4 Fármacos antidepressivos e neuroproteção

As doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas são problemas médicos extremamente complexos e limitados pelo tratamento farmacológico pouco efetivo. Alguns transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão, podem preceder uma doença neurodegenerativa, como a DA e compartilhar mecanismos neuropatológicos (Tizabi, 2015).

Indivíduos com doenças neuropsiquiátricas como depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia apresentam características consistentes com neurodegeneração. Essas características incluem alterações morfológicas em estruturas encefálicas, alterações na plasticidade celular e diminuição de neurotrofinas que podem estar relacionados ao aparecimento de declínio cognitivo, bem como a baixa responsividade ao tratamento farmacológico e aumento da vulnerabilidade a episódios recorrentes (Dodd et al., 2013). Esses processos neurotóxicos que originam alterações morfológicas comuns a doenças do SNC podem ter início antes do aparecimento da sintomatologia clínica e continuar gerando a progressão da doença (Sanchez et al., 2008).

Para o tratamento da depressão, antidepressivos clássicos, disponíveis na clínica a cerca de 50 anos, tem sido utilizados, enquanto que para o tratamento das doenças neurodegenerativas, a utilização de fármacos neuroprotetores tem sido proposta. Uma vez que doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas compartilham mecanismos comuns, a utilização de fármacos antidepressivos tem sido proposta para o tratamento de doenças neurodegenerativas e vice-versa (Dodd et al., 2013; Jamwal e Kumar, 2015; Tizabi, 2015).

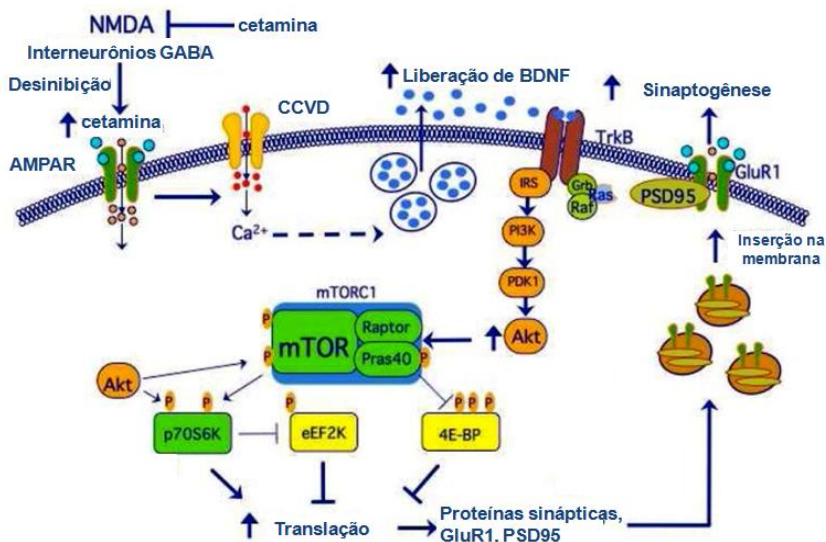
Estudos têm demonstrado que as substâncias que apresentam efeito antidepressivo podem desencadeá-lo através de diferentes mecanismos. Apesar dos antidepressivos clássicos exercem seu efeito, pelo menos em parte, via modulação do sistema monoaminérgico, esta não é mais a explicação definitiva. A modificação da transmissão

sináptica (plasticidade sináptica), a neurogênese, a modificação da expressão gênica, e ainda a modulação de outros sistemas neurotransmissores, exemplificam a extensa variedade de alvos farmacológicos dos antidepressivos (Racagni e Popoli, 2008). Desta forma, alguns antidepressivos apresentam além de efeito na melhora do humor e bem estar, um efeito neuroprotetor (Lin et al., 2012; Paulzen; Veselinovic; Gründer, 2014; Taler et al., 2013).

Por definição, a neuroproteção pode ser entendida como um efeito que resulta em prevenção, recuperação ou regeneração da estrutura ou função celular no sistema nervoso (Vajda, 2002). Estudos utilizando fluoxetina, exemplificam que antidepressivos podem desencadear efeito neuroprotetor frente a modelos animais de isquemia cerebral (Lim et al., 2009), de dano oxidativo induzido pelo estresse crônico (Moretti et al., 2012) ou por administração de lipopolissacarídeo (Chung et al., 2010). Vale também ressaltar que o efeito neuroprotetor desencadeado pela fluoxetina é dependente do antagonismo da subunidade GluN2B do receptor NMDA (Kiss et., 2012), e que a modulação deste sistema parece ser um importante mecanismo no efeito farmacológico de outros antidepressivos (Duman, 2014; Sanacora; Treccani; Popoli, 2012).

Um dos antidepressivos mais promissores para o tratamento da depressão não responsiva a antidepressivos clássicos é a cetamina. Este fármaco, antagonista de receptores NMDA, apresenta efeito antidepressivo rápido e sustentado, sendo tratamento bastante interessante para pacientes com ideação suicida. A cetamina atua aumentando a sinaptogênese dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal de roedores, bem como, a nível molecular, estimula rapidamente a via de sinalização de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e proteína cinase B (PKB ou Akt). Essas proteínas ativam a via relacionada à proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), levando à produção de proteínas sinápticas, que estão em parte, relacionadas com o aumento do número e da maturidade de espinhas dendríticas (Figura 3) (Li et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que a inibição da proteína GSK-3 $\beta$ , bem como a rápida indução de BDNF hipocampal, estão envolvidas no efeito rápido da cetamina (Autry et al., 2011). Desta forma, hipotetiza-se que fármacos que atuem modulando diretamente o receptor NMDA possam desencadear efeito antidepressivo rápido e sustentado (Hashimoto, 2011; Sanacora et al., 2008, 2012).





**Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de ação rápido da cetamina.** Inicialmente a cetamina antagoniza o receptor NMDA, promovendo a desinibição de interneurônios GABAérgicos e ativando receptores AMPA. Esta estimulação regula a função sináptica, uma vez que ativa canais de cálcio dependentes de voltagem (CCVD), levando a liberação de BDNF. O BDNF interage com receptor TrkB, levando a ativação da via de sinalização de Akt que leva a estimulação de mTOR e a síntese de proteínas sinápticas. 4E-BP: proteína ligante de 4E; PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase; PDK1: fosfoinositídeo-cinase 1-dependente; eEF2: fator de alongamento eucariótico 2; PSD95: proteína de densidade pós-sináptica (Adaptado de Duman et al., 2012).

Além do efeito antidepressivo, evidências recentes demonstraram o efeito neuroprotetor da cetamina frente: i) ao dano induzido pela privação de glicose e oxigênio (Emnett et al., 2013), ii) aos danos gerados pelo modelo de oclusão da artéria cerebral média (Shu et al., 2012) e iii) frente ao estado epilético induzido por organofosforados (Dhote et al., 2012), ou frente a outros protocolos de indução de epilepsia (Dorandeu et al., 2013).

É de grande importância ressaltar que os antidepressivos que agem por antagonizar o receptor NMDA, como a cetamina, compartilham vias de sinalização que podem ser também moduladas por antidepressivos clássicos. A diferença recai sobre o tempo necessário de tratamento para que ambos atinjam o mesmo resultado final. Enquanto os antidepressivos clássicos requerem uso crônico para que possam

regular a plasticidade sináptica, bem como a expressão gênica, antidepressivos como a cetamina requerem apenas horas. Desta forma, parece existir um mecanismo de comunicação entre os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico, e esta parece ser a via final de modulação utilizada por antidepressivos clássicos (Duman e Voleti, 2012).

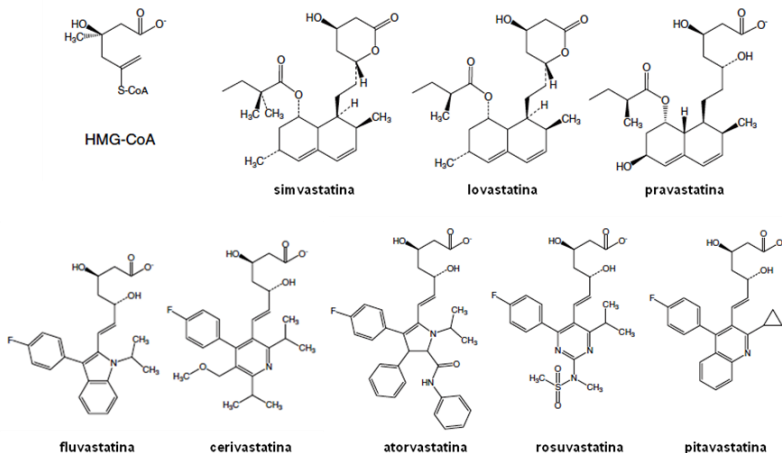
Considerando que o exato mecanismo de interação entre os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico não está elucidado e que ambos podem ser modulados por ação do nucleosídeo adenosina, muitos estudos têm focado no papel do sistema adenosinérgico frente a patofisiologia da depressão e ao mecanismo de ação dos antidepressivos. A adenosina é um produto do metabolismo da adenosina-5'-trifosfato (ATP) que exerce efeito neuromodulador, além de manter a homeostase dos circuitos encefálicos (Fredholm et al., 2005 a,b). A adenosina pode afetar a eficiência da transmissão sináptica e da liberação de neurotransmissores (Cunha et al., 2008a) através da interação com seus receptores. Existem quatro receptores de adenosina ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  e  $A_3R$ ), porém estudos têm demonstrado que os receptores dos subtipos  $A_1$  e  $A_{2A}$  são os que se apresentam em maior densidade no encéfalo (Ortiz et al., 2015) e aqueles que apresentam maior potencial de modulação por drogas antidepressivas (El Yacoubi et al., 2003, Zlomuzica et al., 2013). Antidepressivos clássicos como o citalopram e os tricíclicos em geral, bem como antidepressivos atípicos como a cetamina parecem modular o sistema adenosinérgico, fato este que reforça a ideia da importância desse sistema no entendimento do mecanismo de ação de fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Blardi et al., 2005; Cunha et al., 2015a; Deckert e Gleiter, 1989).

Diante do exposto, apesar da lacuna existente entre o desenvolvimento dos primeiros antidepressivos e a proposta de novas drogas para uso em psiquiatria (Racagni e Popoli, 2008), sugere-se que substâncias que apresentem tanto efeito antidepressivo como efeito neuroprotetor possam ser promissoras candidatas ao uso no tratamento da depressão.

## 1.2 Estatinas

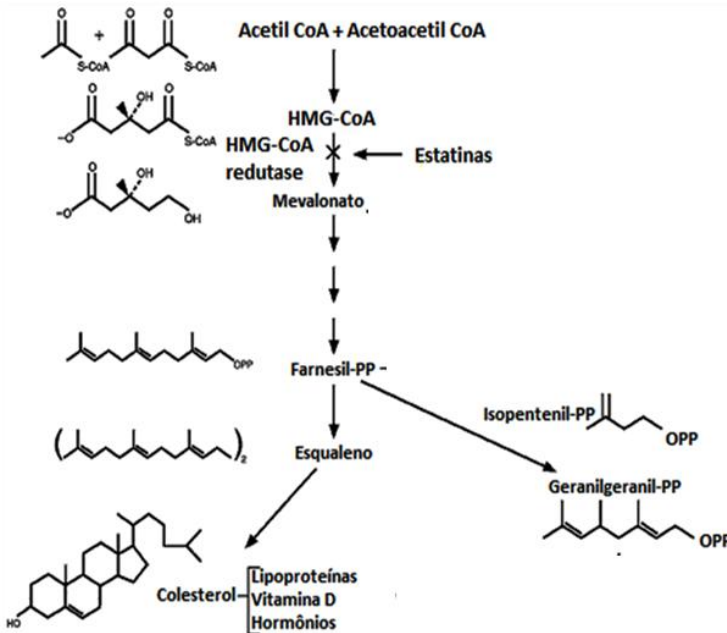
As estatinas constituem um grupo de fármacos, naturais ou sintéticos, utilizados no tratamento das dislipidemias e na prevenção de doenças cardiovasculares (Liao e Laufs, 2005). Foram originalmente identificadas como metabólitos secundários de fungos, sendo a

mevastatina a primeira estatina a ser descoberta, e a lovastatina, a primeira a ser aprovada para uso em humanos. Desde então, um número significativo de estatinas, tornou-se comercialmente disponível, incluindo: pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina e rosuvastatina (Figura 4), tornando essa classe de fármacos, uma das mais efetivas e utilizadas para a redução dos níveis séricos de colesterol (Shitara e Sugiyama, 2006).



**Figura 5. Estrutura química das estatinas.** Dentre as estatinas, simvastatina, lovastatina e pravastatina são derivados de fungos, enquanto as demais são completamente sintéticas. Simvastatina e lovastatina são administradas como pró-fármacos, em virtude da presença do anel lactona em sua estrutura, já as demais estatinas são administradas como fármacos e possuem uma fração hidróxi-metil-glutaril “(HMG)-like” (Adaptado de Shitara e Sugiyama, 2006)

O mecanismo de ação das estatinas baseia-se na inibição reversível da atividade da enzima marcapasso da via de biossíntese do colesterol: a hidróxi-metil-glutaril (HMG)-CoA redutase (Kannel et al., 1971), que catalisa a conversão de HMG-CoA a mevalonato (Figura 6).



**Figura 6.** Diagrama da via de biossíntese do colesterol mostrando a inibição da HMG-CoA redutase pelas estatinas (Adaptado de Liao e Laufs, 2005).

Além disso, as estatinas diminuem a circulação sanguínea de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), uma vez que aumentam a atividade dos receptores de LDL-c. Também apresentam efeitos benéficos em outros parâmetros lipídicos, como: aumento da concentração sérica de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e diminuição de triglicérides (Schachter, 2005).

Em geral, as estatinas são bem toleradas, e o efeito adverso mais sério associado ao uso dessa classe de fármacos é a miopatia, que pode progredir para a rabdomiólise. A incidência de miopatia é baixa (1 para cada 1000 usuários), dependente de dose e aumenta quando as estatinas são administradas juntamente com medicamentos que compartilham a mesma via de metabolização das estatinas (Ballantyne e Davidson 2003).

Além do efeito farmacológico primário, as estatinas desencadeiam efeitos independentes da sua capacidade em diminuir os altos níveis de colesterol, efeitos estes, ditos pleiotrópicos (Liao e Laufs, 2005). Diferenças nos grupamentos laterais da estrutura química das estatinas conferem maior ou menor lipofilicidade e mudanças na

permeabilidade destas aos tecidos, de forma que as estatinas podem ser classificadas em lipofílicas ou hidrofílicas (Gaw e Packard, 2000; Germershausen et al., 1989). Estatinas lipofílicas como a lovastatina, simvastatina, fluvastatina e atorvastatina, atravessam a barreira hematoencefálica de forma mais eficiente do que as estatinas hidrossolúveis (Wang et al., 2011), tornando-se teoricamente mais interessantes quando doenças do SNC são consideradas. Diante dessa propriedade, as estatinas lipofílicas têm sido apontadas como fármacos que podem atuar no manejo de doenças neurodegenerativas (Hernández-Romero et al., 2008; Li et al., 2007; Ovbiagele et al., 2007; Wang et al., 2011).

Dentre as estatinas lipofílicas, a atorvastatina é uma estatina sintética cujos efeitos colaterais são bem tolerados (Schachter, 2004). Além disso, dados clínicos tem demonstrado a segurança da utilização de altas doses dessa estatina (Koren e Hunninghake, 2004; Schwartz et al., 2001), tornando-a foco de estudo deste trabalho.

A atorvastatina é um membro das estatinas sintéticas de terceira geração, que apresenta potência de inibição enzimática maior do que os derivados da mevastatina. Demonstra grande efetividade na diminuição dos níveis séricos de colesterol, o que se deve em partes ao fato de possuir elevada afinidade pela enzima HMG-CoA redutase, o que a torna a estatina mais prescrita para o tratamento da hipercolesterolemia (Gu et al., 2014; Liao e Laufs, 2005).

Entre os anos de 2011-2012, um em cada quatro adultos norte-americanos fizeram uso de estatinas, sendo que destes, 20,2% fizeram uso exclusivo de atorvastatina (Gu et al., 2014) no combate a hipercolesterolemia. No Brasil a distribuição do fármaco na rede pública para prevenção de doenças cardiovasculares e tratamento de dislipidemias é preconizada pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2015).

A farmacocinética da atorvastatina já foi bem estabelecida, de forma que após administração por via oral, atinge concentração plasmática máxima em 1-2h. É metabolizada a derivados hidroxilados e produtos de beta-oxidação ativos por ação do citocromo P (CYP) dos subtipos 3A4 e 3A5. Apresenta tempo de meia-vida de cerca de 14h que pode ser aumentado a 20-30 h em função dos metabólitos ativos. Sua eliminação é quase que exclusivamente biliar, sendo apenas cerca de 2% da eliminação por via renal (Drug Bank, 2015).

Além dos dados acerca do efeito hipocolesterolemiantes da atorvastatina, diversos estudos já demonstraram os efeitos pleiotrópicos

desta estatina (Birnbbaum et al., 2012; Citraro et al., 2014; Liao e Laufs, 2005; Van der Most et al., 2009). O efeito neuroprotetor da atorvastatina frente a modelos animais de isquemia cerebral (Hong et al., 2006; Vandresen-Filho et al., 2013), de DA (Barone et al., 2014; Kurata et al., 2012; Piermartiri et al., 2010; Zhang et al., 2013) e da Doença de Parkinson (Castro et al., 2013; Kumar et al., 2012), já foram demonstrados. Além disso, evidências de melhora no bem-estar psicológico de pacientes com depressão (Liao e Laufs, 2005) e ansiedade (Young-Xu et al., 2003) pelo uso de estatinas já foram relatadas. Neste trabalho os efeitos neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina são de interesse e serão relatados com maiores detalhes na sessão que segue.

### 1.2.1 Efeito antidepressivo e neuroprotetor

O efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina foi demonstrado pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa, utilizando os testes preditivos de suspensão pela cauda (TSC) e nado forçado (TNF) (Ludka et al., 2013). Neste estudo foi demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo decorrente da administração aguda desta estatina depende do antagonismo do receptor NMDA e da modulação da via de sinalização de L-arginina-NO - guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O efeito tipo-antidepressivo foi confirmado em estudo subsequente, que utilizando o TNF demonstrou a participação dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR-gama) e reforçou o papel da via do NO (Shahsavarian et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a administração de atorvastatina (10 mg/kg, p.o.) durante 7 dias consecutivos foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo em um modelo animal de doença de Parkinson (Castro et al., 2013). Outro grupo de pesquisa, demonstrou que o tratamento crônico com atorvastatina (10 mg/kg, p.o.) por 17 dias consecutivos também foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo de ratos geneticamente modificados para expressar a comorbidade epilepsia e depressão moderada (Citraro et al., 2014).

Este efeito tipo-antidepressivo em animais, não parece ser um efeito peculiar da atorvastatina, mas comum a outras estatinas. Ratos mantidos em dieta enriquecida com lovastatina (2.0 mg/ dia) durante 30 dias, tornaram-se mais sensíveis a baixas doses de fluoxetina (Renshaw et al., 2009). Ainda, o tratamento de ratos diabéticos com simvastatina, foi capaz de diminuir o comportamento tipo-depressivo dos animais no

TNF (ElBatsh, 2015). O comportamento depressivo e anedônico em ratos submetidos ao estresse crônico moderado de 4 semanas foram revertidos pelo tratamento com simvastatina (5 ou 10 mg/kg/dia) durante 14 dias, de forma semelhante ao observado utilizando imipramina pelo mesmo período de tempo (Lin; Chang; Lin, 2014).

Apesar do número de estudos publicados demonstrando a relação entre estatinas e efeito tipo-depressivo ser relativamente pequeno, a primeira evidência de que o uso prolongado de estatinas em geral poderia diminuir o risco de depressão em humanos foi descrita por Young-Xu e colaboradores no ano de 2004. Os pesquisadores demonstraram que o uso de estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina ou simvastatina) diminui em 30-40% o risco de desenvolvimento de depressão. Apesar do exato mecanismo pelo qual as estatinas desencadeiam este efeito ainda não estar elucidado sugeriu-se que esta poderia estar relacionada ao efeito anti-inflamatório ou ainda a capacidade das estatinas em aumentar as concentrações de triptofano (aminoácido precursor da serotonina) (Wirleitner; Sperner-Unterweger; Fuchs, 2004).

Este estudo impulsionou diversos ensaios clínicos subsequentes. Um ensaio clínico controlado demonstrou aumento da resposta clínica ao citalopram (40 mg/dia), quando este foi administrado juntamente com atorvastatina (20 mg/dia), sugerindo a utilização desta estatina como adjuvante no tratamento desta doença (Haghighi et al., 2014). O efeito adjuvante da lovastatina (30 mg/dia) no tratamento da depressão também foi demonstrado, uma vez que seu uso melhorou a resposta clínica de pacientes a fluoxetina (40 mg/dia) (Ghanizadeh e Hedayati, 2013), sem nenhum efeito colateral importante. O mesmo efeito adjuvante foi observado com o uso de simvastatina (20 mg/dia por duas semanas consecutivas, seguido de 40 mg/dia por mais duas semanas consecutivas) e fluoxetina no mesmo esquema de tratamento (Gougol et al., 2015). Apesar de algumas interações medicamentosas entre estatinas e outros fármacos indutores de CYP3A4/5 levarem ao aparecimento de miopatias, em teoria, o uso combinado de ISRS e estatinas parece ser seguro (Andrade, 2014).

Já um estudo realizado em pacientes com depressão e doença coronariana aguda, demonstrou que o uso de estatinas lipofílicas em geral foi capaz de diminuir a severidade da depressão usando a escala Hamilton de avaliação (Kim et al., 2015), sugerindo que as estatinas lipofílicas podem ser efetivas no tratamento da depressão independentemente da associação com antidepressivos clássicos.

Apesar dessas evidências, um número considerável de publicações aponta para uma possível associação entre o uso de estatinas e o aumento da probabilidade de desenvolvimento de depressão (Kang et al., 2015; Kasller-Taub; Woodward; Markowitz, 1993; Mansi et al., 2013; Tuccori et al., 2008; You et al., 2013.). Vale ressaltar que muitas vezes essas evidências são baseadas em informações fragmentadas e estudos de pequena escala com amostras selecionadas (Pae, 2013). Em concordância, um trabalho recente que realizou a avaliação de 59 artigos científicos e 7 estudos de meta-análise cujo objetivo era relacionar o uso de estatinas e depressão, demonstrou que usuários de estatinas são cerca de 32% menos propensos a desenvolver depressão quando comparados com não usuários (Parsaik et al., 2014).

Mais evidente do que os estudos relacionando o uso de estatinas e o bem-estar psicológico de pacientes com depressão, são os estudos que relatam os efeitos neuroprotetores deste grupo de fármacos (Van der Most et al., 2009; Wang et al., 2011).

Estudos *in vitro*, já demonstraram que a atorvastatina pode desencadear efeito neuroprotetor frente a diversos indutores de danos celulares, tais como NMDA e Glu (Bösel et al., 2005; Zacco et al., 2003), proteína  $\beta$ -amilóide (Barone et al., 2014; Hosaka et al., 2013; Roensch et al., 2007), e privação de glicose e oxigênio (Vandresen-Filho et al., 2013). Estudos *in vivo*, reforçam estes achados utilizando modelos animais de isquemia cerebral (Fang et al., 2015; Gutierrez-Vargas et al., 2014; Song et al., 2014), de DA (Kurata et al., 2013; Martins et al., 2015; Piermartiri et al., 2009, 2010; Zhang et al., 2013;), e Parkinson (Castro et al., 2013; Kumar et al., 2012).

Diversos mecanismos já foram descritos para explicar o efeito neuroprotetor desencadeado por uso de atorvastatina frente a diferentes situações neurotóxicas. Dentre estes mecanismos, vale ressaltar o envolvimento de interleucinas e o efeito anti-inflamatório (Berger et al., 2008; Cui et al., 2009; Mayanagi et al., 2008), antioxidante (Koladiya et al., 2008; Piermartiri et al., 2010), modulador da produção de NO (Gong et al., 2014; de Oliveira et al., 2013) e do sistema glutamatérgico (Bösel et al., 2005; Piermartiri et al., 2009 e 2010; Vandresen-Filho et al., 2013). Além disso, utilizando um protocolo de oclusão das artérias cerebral média, Chen e colaboradores apontaram o papel do BDNF no efeito neuroprotetor da atorvastatina frente à isquemia cerebral (Chen et al., 2005).

Estudos clínicos corroboram os estudos em animais, demonstrando o efeito neuroprotetor das estatinas em geral. Ensaios têm evidenciado o benefício do uso de estatinas frente à isquemia cerebral,



bem como hemorragia intracerebral e subaracnóide (Amarenco et al., 2006; Goldstein, 2011; Hackam et al., 2011; Kotlega et al., 2015; Leker et al., 2009). A redução da isquemia cerebral em ensaios clínicos com 20.000 participantes em uso de estatinas mostrou uma redução do dano isquêmico em 28% dos casos (Collins et al., 2004; Crouse; Byington; Furberg, 1998). Uma alta dose de atorvastatina (80 mg/dia) reduziu completamente a re-incidência de evento isquêmico em pacientes com histórico recente de isquemia sem doença cardiovascular conhecida (Amarenco et al., 2006).

Efeito positivo proveniente do tratamento com atorvastatina por 12 meses, também foi observado em pacientes com DA de baixa ou moderada severidade (Sparks et al., 2006). A administração de atorvastatina parece diminuir os níveis séricos de colesterol total, bem como desacelerar a progressão da DA (Sparks et al., 2005). Estudo randomizado com 1.000.000 de adultos com idade superior a 65 anos iniciaram tratamento com estatinas e apresentaram redução no diagnóstico de demência. Neste estudo a atorvastatina e a rosuvastatina foram as estatinas mais potentes, mostrando-se particularmente efetivas na prevenção de demência (Wu et al., 2015).

De forma semelhante ao que acontece com o efeito antidepressivo da atorvastatina, o efeito da mesma frente a DA ou demência é bastante controverso e diversos estudos demonstram dados inconclusivos ou negativos (Daneschvar; Aronson; Smetana, 2015; Liang; Li; Cheng, 2015; McGuinness et al., 2016; Opie, 2014) impulsionando novos estudos frente a esta temática.



## 2 JUSTIFICATIVA

As doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas vem crescendo com o aumento da expectativa de vida da população. Estratégias neuroprotetoras que previnam, retardem ou tratem os mecanismos envolvidos no aparecimento dessas neuropatologias são de urgente e importante desenvolvimento.

Uma das doenças neuropsiquiátricas mais frequentes no mundo é a depressão (Olesen e Leonardi 2003) com prevalência de 17% na população ao longo da vida (Nestler et al., 2002). No Brasil 5,5 milhões de pessoas apresentam risco de desenvolvimento de depressão, sendo a prevalência de 18,4% (Bromet et al., 2011). Na população brasileira, a depressão é mais comum em mulheres com idade entre 40-59 anos, vivendo em áreas urbanas e com baixo nível educacional (Munhoz et al., 2016). A depressão é uma doença altamente incapacitante com grandes implicações sociais, uma vez que limita as atividades diárias dos pacientes e leva a maior utilização de serviços de saúde, aumentando os gastos públicos (Nemeroff, 2007). Além disso, a depressão é um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças neurodegenerativas, trazendo quadros de comorbidade de difícil tratamento.

A farmacoterapia disponível para o tratamento da depressão muitas vezes não é capaz de reverter o quadro clínico do paciente, podendo ainda desencadear baixa tolerabilidade e efeitos colaterais consideráveis. Neste contexto, compostos com atividade antidepressiva que possam ser utilizados como adjuvantes no tratamento da depressão são de grande interesse. Além disso, o entendimento dos mecanismos envolvidos no efeito dos antidepressivos disponíveis na clínica é de grande importância a fim de estabelecer vias cruciais na remissão da sintomatologia clínica.

A atorvastatina, é um fármaco hipocolesterolêmico que apresenta segurança de utilização quando em altas doses, é bem tolerada, apresenta efeitos colaterais conhecidos e já está no mercado há alguns anos, o que sustenta a sua utilização e viabiliza o estudo da mesma. Além do efeito primário em diminuir os altos níveis de colesterol, a atorvastatina apresenta efeitos pleiotrópicos bastante distintos, dentre eles o efeito antidepressivo e neuroprotetor. Uma vez que os mecanismos envolvidos nesses efeitos pleiotrópicos dessa estatina tenham sido estabelecidos a possível associação desta estatina com outros medicamentos a fim de potencializar seus efeitos e desencadear uma melhora rápida e efetiva das doenças do SNC torna-se uma realidade mais próxima.

Assim, este trabalho pode ser justificado pela importância dos efeitos pleiotrópicos desencadeados pela atorvastatina, bem como, pela necessidade do melhor entendimento dos mecanismos tipo-antidepressivo e neuroprotetor por ela desencadeados o que por sua vez tornará mais viável a possibilidade de associação desta atorvastatina com outros fármacos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos;
- II. Determinar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo decorrente da administração aguda de atorvastatina em camundongos;
- III. Investigar o envolvimento da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR no efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração aguda de atorvastatina em camundongos;
- IV. Compreender os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo provenientes da administração repetida de atorvastatina em camundongos submetidos à infusão do peptídeo beta amilóide (A $\beta$ <sub>1-40</sub>).
- V. Avaliar os mecanismos celulares envolvido na proteção promovida pela administração repetida de atorvastatina ou de fluoxetina a camundongos frente à toxicidade glutamatérgica *in vitro*;



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Os materiais e métodos utilizados para realização dos experimentos contidos nesta tese encontram-se nos respectivos capítulos da mesma, descritos na sessão dos resultados.





## **5 RESULTADOS**

Os resultados desta tese estão divididos na forma de capítulos, seguindo a distribuição abaixo:

- Capítulo I: Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.
- Capítulo II: Estudo dos mecanismos de neuroproteção desencadeados pela atorvastatina e a relação com o efeito tipo-antidepressivo.



## CAPÍTULO I

---

### *Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina*

---

Este capítulo apresenta os resultados relacionados aos objetivos específicos I, II e III desta tese. Os resultados relativos à participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos está apresentado a seguir. Os demais dados referentes à participação do sistema serotoninérgico e a via de sinalização de PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos estão apresentados como anexos (Anexos A e B do Capítulo I, respectivamente).

O anexo A apresenta o artigo científico intitulado: “*Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice*” publicado no periódico *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*.

O anexo B apresenta o manuscrito intitulado: “*Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  and mTOR in the Antidepressant-like effect of Atorvastatin in mice*”, submetido ao periódico *Journal of Psychiatric Research*.



## 5.1 Material e Métodos

### 5.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (60-90 dias de idade pós-natal), mantidos em temperatura de  $22\pm 1^\circ\text{C}$  em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas (15 animais por caixa) com água e ração disponíveis. Toda manipulação animal e os experimentos foram realizados entre às 9:00 – 16:00 horas, sendo que cada animal foi utilizado uma única vez. Os experimentos foram realizados após aprovação do pelo Comitê de Ética Institucional local para Pesquisa Animal (CEUA/UFSC PP0559). Os protocolos para experimentação animais foram projetados de maneira que o animal tivesse o mínimo sofrimento possível.

### 5.1.2 Drogas e tratamento

As seguintes drogas foram utilizadas: comprimidos de Atorvastatina (Pfizer®), ciclohexiladenosina (CHA), cafeína, adenosina, 4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo-{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)-fenol (ZM241385), 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) (Sigma®), e dipiridamol (Tocris®). Atorvastatina foi dissolvida no momento do uso em água destilada. Adenosina, cafeína e CHA foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). ZM241385, DPCPX e dipiridamol foram dissolvidos em 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO). As drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), com exceção da atorvastatina que foi administrada por via oral (p.o.) e do dipiridamol que foi administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.). Todas as drogas com exceção do dipiridamol foram administradas em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal.

### 5.1.3 Administração i.c.v.

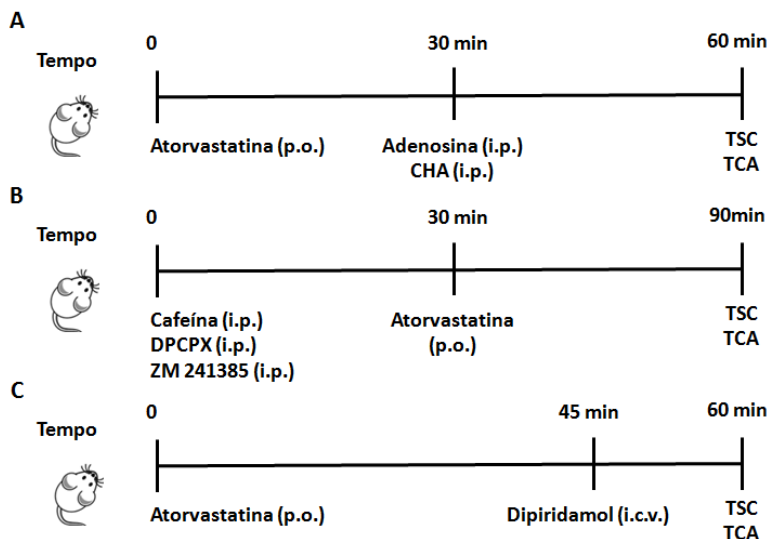
A administração i.c.v. foi realizada pela técnica à mão livre. Uma agulha hipodérmica com 0,4 mm de diâmetro externo, conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25  $\mu\text{L}$ , foi inserida perpendicularmente através do crânio, não mais de 2 mm para o interior do cérebro de cada camundongo, diretamente no ventrículo lateral. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano, durante aproximadamente 15 s apenas para que houvesse perda do reflexo

postural. A assepsia do local da injeção foi realizada utilizando uma gaze com etanol a 70%. A agulha foi inserida unilateralmente 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de uma linha traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). Um volume de 3  $\mu$ L da droga foi injetado diretamente no ventrículo lateral. A injeção foi administrada durante 30 s, e a agulha permaneceu no local por mais 30 s, a fim de evitar o refluxo das substâncias injetadas. Os camundongos exibiam comportamento normal após 1 min da injeção (Cunha et al., 2015a). Para assegurar que as drogas foram administradas exatamente no ventrículo, os cérebros foram dissecados e examinados macroscopicamente após o teste. Camundongos que apresentassem quaisquer sinais de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística.

#### 5.1.4 Desenho experimental

Para investigar o envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, os animais foram tratados com uma dose subativa de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e 30 minutos após receberam adenosina (0,1 mg/kg, i.p.), CHA (0,05 mg/kg, i.p. agonista seletivo para receptor de adenosina  $A_1$ ) ou veículo. Um intervalo de tempo de 30 minutos após a última administração foi realizado antes de submeter os animais aos testes comportamentais (Figura 1A) (Kaster et al., 2013).

A fim de investigar o envolvimento dos receptores de adenosina dos sub-tipos  $A_1$  e  $A_{2A}$ , os animais foram pré-tratados com cafeína (1 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo de receptores de adenosina), DPCPX (2 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores de adenosina  $A_1$ ), ZM241385 (1 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores de adenosina  $A_{2A}$ ) ou veículo apropriado. Decorridos 30 minutos, os animais receberam atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) e foram submetidos aos testes comportamentais após 60 minutos (Figura 1B). Em outra série de experimentos os camundongos foram pré-tratados com atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) e 45 minutos após, receberam dipiridamol (0,1  $\mu$ g/ camundongo, por via i.c.v., um inibidor do transporte de adenosina. Decorridos 15 minutos os animais foram submetidos aos testes comportamentais (Figura 1C).



**Figura 1.** Esquema representativo da escala de tratamento dos animais para avaliação da participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.

As doses de atorvastatina, adenosina, CHA, DPCPX, ZM241385 e dipiridamol utilizadas foram selecionadas com base na literatura ou nos dados do nosso grupo de pesquisa (Cunha et al., 2015a; Kaster et al., 2013; Ludka et al., 2013)

### 5.1.5 Ensaios comportamentais

#### 5.1.5.1 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)

O TSC é um dos mais utilizados testes preditivos para avaliar a atividade tipo-antidepressiva de substâncias em camundongos. O teste é baseado na exposição de animais a um estresse inescapável. Animais acústica e visualmente isolados foram suspensos pela cauda, a 50 cm acima do chão utilizando fita adesiva. O tempo de imobilidade dos animais foi cronometrado em um período de 6 minutos (Steru et al., 1985). Os animais foram considerados imóveis quando apresentaram comportamento passivo e completamente parado.

### 5.1.5.2 Teste do Campo Aberto (TCA)

A fim de avaliar o efeito locomotor das drogas utilizadas os camundongos foram submetidos a uma sessão no TCA como previamente descrito (Rodrigues et al., 1996). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) foi registrado em uma sessão de 6 minutos. O chão do campo aberto foi higienizado utilizando solução de etanol a 10%.

### 5.1.6 Análise Estatística

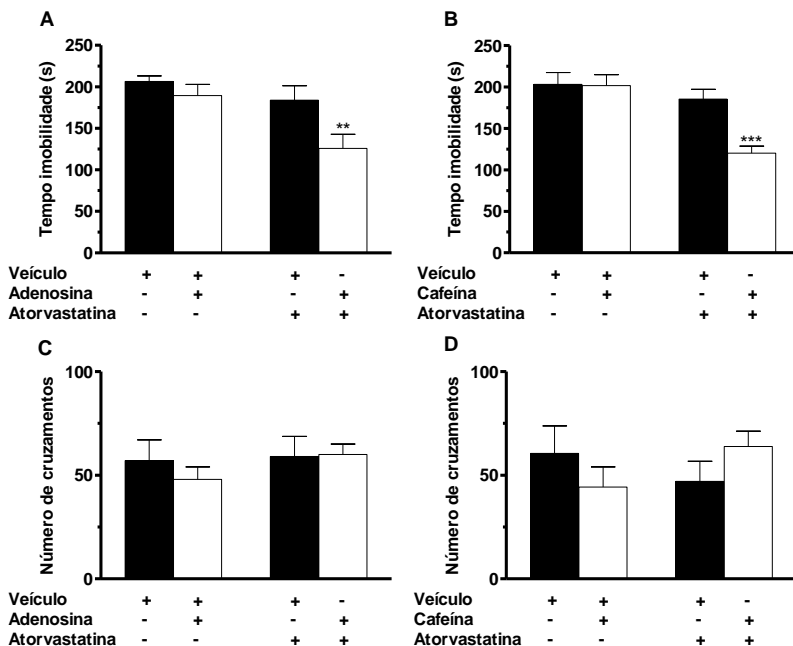
A comparação entre os grupos controle e tratado foram realizados através da análise de variância ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey HSD. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5.2 Resultados

A fim de investigar a participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos, os animais foram tratados com atorvastatina em dose subativa (0,01 mg/kg, p.o.) e decorridos 30 minutos receberam adenosina (0,1 mg/kg, i.p.). Os resultados demonstrados na Fig. 2A mostram o efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração de doses subativas de adenosina e atorvastatina no TSC. A análise estatística revelou um resultado significativo para o tratamento com adenosina [ $F(1,27)=9,02$   $p=0,005$ ], atorvastatina [ $F(1,27)=6,75$   $p=0,01$ ] e interação adenosina x atorvastatina [ $F(1,27)=2,00$   $p=0,16$ ], sem alteração na atividade locomotora dos animais (Fig. 2C).

O pré-tratamento dos camundongos com uma dose subativa de cafeína (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de desencadear um efeito tipo-antidepressivo quando administrado com uma dose subativa de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC (Fig. 2B). ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo para o tratamento com cafeína [ $F(1,32)=7,53$   $p=0,009$ ], atorvastatina [ $F(1,32)=16,65$   $p=0,0002$ ] e para a interação cafeína x atorvastatina [ $F(1,32)=6,89$   $p=0,013$ ], sem nenhuma alteração na atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 2D).

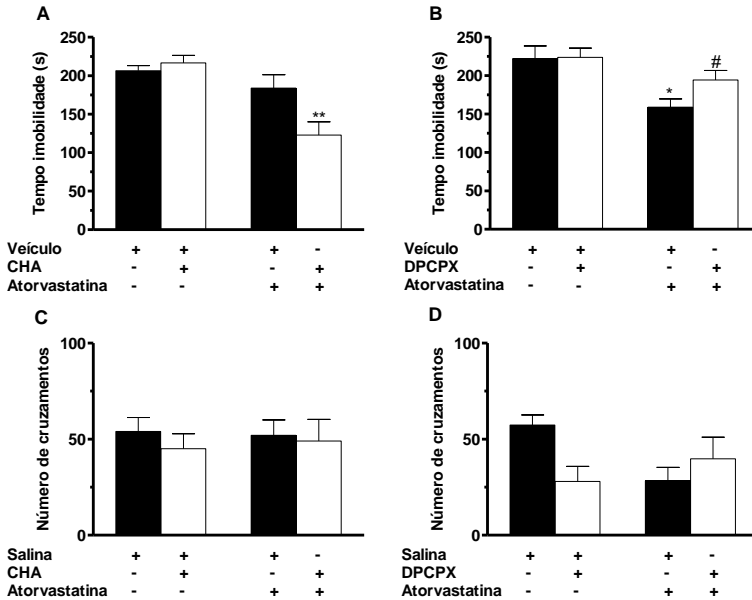




**Figura 2. Avaliação da participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.** Efeito da administração de adenosina (0,1 mg/kg, i.p.) e atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (C). Os gráficos B e D mostram o efeito proveniente do pré-tratamento dos camundongos com cafeína (1 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo de receptores de adenosina) no tempo de imobilidade e no número de cruzamentos (respectivamente) dos animais tratados com atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.). Resultados representam a média  $\pm$  S.E.M. (n=7-10). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo control tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey HSD).

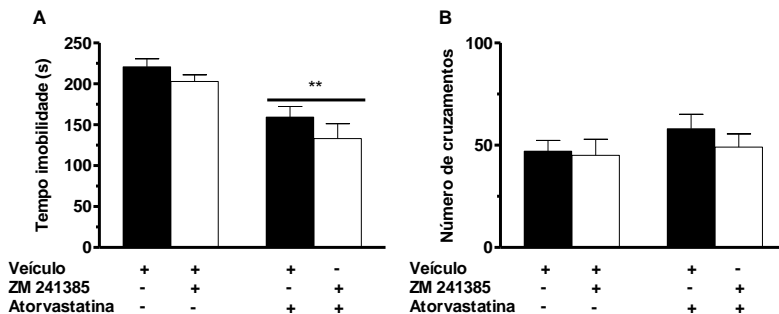
A participação dos receptores de adenosina do subtipo  $A_1$  foi avaliada através da utilização de um agonista e um antagonista desses receptores. A administração de dose subativa de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) juntamente com uma dose subativa de CHA (0,05 mg/kg, i.p. agonista seletivo para receptor  $A_1$  de adenosina) foi capaz de desencadear um efeito tipo-antidepressivo, uma vez que diminuiu o tempo de imobilidade dos animais no TSC (Fig. 3A) (atorvastatina [F(1,27)=17,55  $p=0,0002$ ], CHA [F(1,27)=0,080  $p=0,080$ ] e interação atorvastatina x CHA [F(1,27)=6,50  $p=0,016$ ]). O pré-tratamento com

DPCPX (2 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores  $A_1$  de adenosina), aboliu o efeito tipo-antidepressivo desencadeado pelo tratamento com atorvastatina (Fig. 3B). A análise estatística revelou os seguintes parâmetros: DPCPX [F(1,28)=1,86 p=0,18], atorvastatina [F(1,28)=11,72 p=0,002] e interação DPCPX x atorvastatina [F(1,28)=1,53 p=0,22]. Nenhum dos tratamentos sozinhos ou combinados alterou a atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 3C e D).



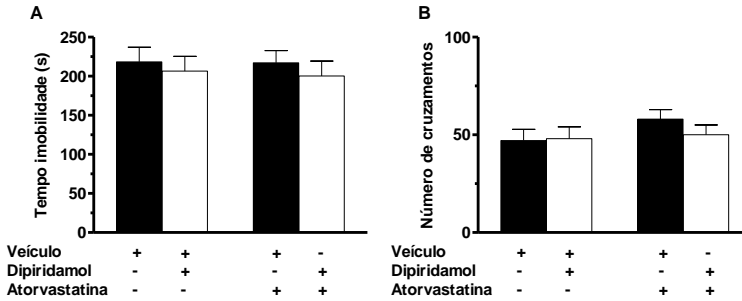
**Figura 3. Avaliação da participação dos receptores de adenosina do subtipo  $A_1$  no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.** Efeito da administração de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o) e CHA(0,05 mg/kg, i.p. agonista seletivo para receptor de adenosina  $A_1$ ) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (C) dos animais. O efeito proveniente do pré-tratamento dos camundongos com DPCPX (2 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores de adenosina  $A_1$ ) no efeito anti-imobilidade da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (B) e no número de cruzamentos dos animais no TCA (D). Resultados representam a média  $\pm$  S.E.M. (n=7-10). \* p<0,05; \*\* p<0,01; quando comparado com o grupo control tratado com veículo. #p<0,05 quando comparado com o grupo controle atorvastatina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey HSD).

O pré-tratamento dos animais com um antagonista seletivo de receptores de adenosina do subtipo  $A_{2A}$  (ZM 241385, 1 mg/kg, i.p.), não alterou o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC (Fig. 4A) (ZM 241385 [F(1,36)=2,88 p=0,09], atorvastatina [F(1,36)=25,57 p=0,000013], interação ZM 241385 x atorvastatina [F(1,36)=0,10 p=0,75]. A atividade locomotora dos animais avaliada pelo número de cruzamentos no TCA, não foi alterada por nenhum tratamento sozinho ou combinado (Fig. 4B).



**Figura 4. Avaliação da participação dos receptores de adenosina do subtipo  $A_{2A}$  no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.** Efeito do pré-tratamento com ZM 241385 (1 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores de adenosina do subtipo  $A_{2A}$ ) no efeito anti-imobilidade da atorvastatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B). Resultados representam a média  $\pm$  S.E.M. (n=). \*\* p<0,01; quando comparado com o grupo controle tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey HSD).

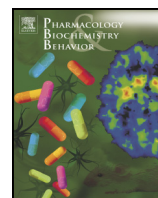
A participação do transportador de adenosina no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, foi avaliado pela administração de doses subativas de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) com doses subativas de dipiridamol (0,1  $\mu$ g/ camundongo, i.c.v., um inibidor de transporte de adenosina). A análise estatística revelou não haver efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração de atorvastatina e dipiridamol no TSC (Fig. 5A) (atorvastatina [F(1,28)=0,62 p=0,43], dipiridamol [F(1,28)=0,04 p=0,83], atorvastatina x dipiridamol [F(1,28)=0,01 p=0,89]. Nenhum tratamento sozinho ou combinado alterou significativamente a atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 5B).



**Figura 5. Avaliação da participação do transporte de adenosina no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.** Efeito do tratamento com doses subativas de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) e dipiridamol (0,1 µg/camundongo, i.c.v., um inibidor de transporte) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B). Resultados representam a média ± S.E.M. (n=) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey HSD).

O efeito da atorvastatina em modelos animais preditivos para atividade antidepressiva foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores e aponta para a participação do receptor NMDA de glutamato e da via L-arginina-NO-GMPc (Ludka et al., 2013), bem como dos receptores de serotonina dos subtipos 5-HT1 e 5-HT2<sub>A/C</sub> (Capítulo I, Anexo A).

**ANEXO A – CAPÍTULO I**



## Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice



Fabiana K. Ludka<sup>a,b</sup>, Leandra Celso Constantino<sup>a</sup>, Gislaine Kuminek<sup>c</sup>, Luisa Bandeira Binder<sup>a</sup>, Andréa D.E. Zomkowski<sup>a</sup>, Maurício P. Cunha<sup>a</sup>, Tharine Dal-Cim<sup>a</sup>, Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>a</sup>, Carla I. Tasca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, 89460-000 Canoinhas, SC, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 February 2014

Received in revised form 5 April 2014

Accepted 12 April 2014

Available online 21 April 2014

#### Keywords:

Statin

Atorvastatin

Antidepressant-like effect

Tail suspension test

Serotonergic system

Serotonin

### ABSTRACT

Atorvastatin is a statin largely used in the treatment of hypercholesterolemia and recently revealed as a neuroprotective agent. The antidepressant-like effect of acute atorvastatin treatment in mice has been previously demonstrated by our laboratory. The purpose of this study was to explore the contribution of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice. Data demonstrate that the serotonin (5-HT) depleting agent p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg, i.p.) completely abolished atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) antidepressant-like effect. Besides atorvastatin, fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), a serotonin selective reuptake inhibitor (SSRI) was able to exert an antidepressant-like effect, but any of them changed 5-HT content in the hippocampus or frontal cortex. The 5H-T1A (WAY100635, 0.1 mg/kg, s.c) or the 5-HT<sub>2A/2C</sub> (ketanserin, 5 mg/kg, s.c.) receptor antagonists prevented atorvastatin antidepressant-like effect. In addition, a combinatory antidepressant-like effect was observed when mice received the co-administration of sub-effective doses of atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.) and the SSRI fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.). Taken together, these results indicate that the antidepressant-like effect of atorvastatin depends on the serotonergic system modulation.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Atorvastatin is a lipophilic and synthetic statin, largely used for the treatment of hypercholesterolemia. The mechanism of action is based on the inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting enzyme in the cholesterol synthesis (Wang et al., 2008). Beyond this primary effect, lipid-lowering independent or pleiotropic effects have been attributed to statin treatment (Liao and Laufs, 2005). Clinical trials have shown that the use of statins reduces the incidence of stroke (Di Napoli et al., 2002; Heeschen et al., 2002) and dementia (Stêpieň et al., 2002). Animal models (Ouk et al., 2013) and cell culture studies (Posada-Duque et al., 2013; Xu et al., 2013) have also been used to demonstrate the neuroprotective effect of statins. In our laboratory, the protective effect of atorvastatin have been already established against seizures induced by quinolinic acid, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist (Piermartiri et al., 2009), amyloid-beta-induced toxicity (Piermartiri et al., 2010) and cognitive and motor impairments induced by an experimental model of Parkinson's disease (Castro et al., 2013).

An antidepressant-like effect evoked by atorvastatin in mice has recently been demonstrated. In that study, we showed that atorvastatin antidepressant-like effect is at least partially dependent on the modulation of the glutamatergic system (Ludka et al., 2013). The observation that ketamine, a selective NMDA receptor antagonist, exhibits a rapid and sustained relief of depressive symptoms has brought to the fore the glutamatergic hypothesis of depression (Irwin and Iglewicz, 2010; Li et al., 2010). Although findings support that excitatory transmission plays a central role in mediating the emotional and cognitive changes associated with depression (Pralong et al., 2002; Robbins and Arnsten, 2009), it is well established that drugs that act by modulating monoamines in the brain are largely used in the treatment of depression (Nutt, 2006).

Abnormalities in the serotonergic neurotransmission have been specifically pointed out as a common factor in mental illness, particularly in depression (Woolley and Shaw, 1954). It can be highlighted by studies that showed a reduced cerebrospinal fluid concentration of 5-HT and its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in postmortem brain tissue of depressed or suicidal patients (Asberg et al., 1976; Roy et al., 1989). 5-HT can interact with multiple receptors, and to date seven families have been characterized (5HT<sub>1R</sub>–5HT<sub>7R</sub>), and with exception to 5HT<sub>3R</sub> that is a ligand-gated ion channel, they are all

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5046; fax: +55 48 3721 9672.  
E-mail address: [carla.tasca@ufsc.br](mailto:carla.tasca@ufsc.br) (C.I. Tasca).

G-protein-coupled receptors (Barnes and Sharp, 1999; Hoyer, 1988; Kriegebaum et al., 2010).

The 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype is the best studied (Glennon and Dukat, 1991; Pessoa-Mahana et al., 2003), and it is generally accepted to be involved in psychiatric disorders such as anxiety and depression (Blier and Abbott, 2001). 5-HT<sub>1A</sub> receptors are localized dendritically as inhibitory autoreceptors on serotonergic cells or in postsynaptic sites that are enriched in corticolimbic structures as the hippocampus and frontal cortex (Millan, 2000). Postmortem and neuroimaging studies suggest an increased density of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in major depressive patients compared with control subjects (Boldrini et al., 2008; Parsey et al., 2002; Stockmeier et al., 1998).

5HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors are of remarkable importance in the control of mood, motor behavior and appetite (Millan, 2005). 5-HT<sub>2A</sub>R is a postsynaptic receptor localized on cortical GABAergic interneurons as well as on glutamatergic projections in humans and rodents (De Almeida and Mengod, 2007; Santana et al., 2004). Cumulative evidence indicates that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor plays a role in depression, based on the fact that atypical antipsychotic drugs (Carvalho et al., 2008) and the antidepressant mirtazapine have the ability to specifically block 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated responses (Marek et al., 2003).

5-HT<sub>2C</sub> receptors are predominantly located in the choroid plexus, cerebral cortex, hippocampus, substantia nigra and cerebellum (Abramowski et al., 1995). Alterations in their functional status have been detected in anxiodepressive states (Niswender et al., 2001), and 5-HT<sub>2C</sub> receptors are known to be involved in the action of several classes of antidepressant drugs (Artigas, 2012).

It is also important to highlight that serotonergic neurons are controlled by glutamatergic inputs at forebrain areas in physiological conditions (Celada et al., 2001; Fink et al., 1995; Martin-Ruiz, et al., 2001).

Considering that atorvastatin antidepressant-like effect involves glutamatergic system modulation (Ludka et al., 2013), and the known correlation between glutamatergic and serotonergic systems, this study investigated the participation of serotonergic system in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice submitted to the tail suspension test (TST). Moreover 5-HT contents in the hippocampi and frontal cortices of mice acutely treated with atorvastatin or fluoxetine were evaluated.

## 2. Experimental procedure

### 2.1. Animals

Male Swiss mice (35–45 g) were maintained at 21–23 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All manipulations were carried out between 9:00 and 16:00 h. All procedures in this study were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23). The experiments were performed after approval of the protocol (PP559) by the Institutional Ethics Committee (CEUA/UFSC) and all efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

### 2.2. Drugs

The following drugs were used: atorvastatin, fluoxetine hydrochloride, sertraline hydrochloride, paroxetine hydrochloride (Pfizer, Brazil), ketanserin tartarate, p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA), N-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide (WAY100635) (Sigma Chemical Co, USA). All drugs were dissolved in saline. Atorvastatin, fluoxetine, sertraline and paroxetine were administered by oral route (p.o.) in a volume of 10 mL/kg body weight using the gavage technique (Brocardo et al., 2008; Cunha et al., 2013). WAY100635, ketanserin and PCPA were administered by intraperitoneal (i.p.) route in a volume of 10 mL/kg body weight (Brocardo et al., 2008; Capra et al., 2010).

### 2.3. Behavioral tests

#### 2.3.1. Tail suspension test (TST)

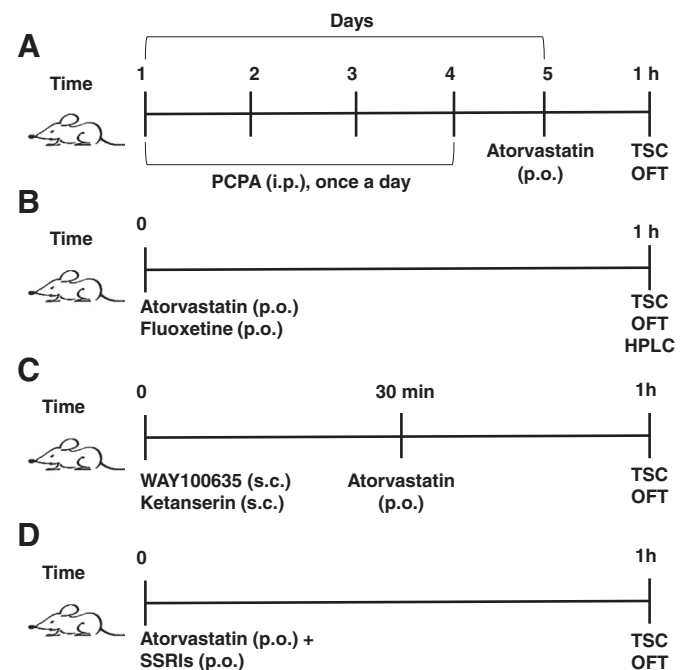
The total duration of immobility induced by tail suspension was measured according to the method described by Steru et al. (1985). Briefly, mice both acoustically and visually isolated were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape and placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded during a 6 min period (Zeni et al., 2011).

#### 2.3.2. Open-field behavior

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test as described previously (Zomkowski et al., 2010). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40 × 60 × 50 cm high. The floor of the arena was divided into 12 equal squares. The number of squares crossed with all paws (crossings) was counted in a 6-min session. The light was maintained at minimum to avoid anxiety behavior.

### 2.4. Pharmacological treatments

The participation of serotonergic system was investigated by using the 5-HT depleting agent, PCPA (100 mg/kg, i.p.) as shown in Fig. 1A. It was given during four days (Brocardo et al., 2008; Machado et al., 2008) preceding the atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or saline administration. Twenty four hours after the last administration of PCPA (Machado et al., 2008), atorvastatin or saline was given. The TST was performed 1 h after atorvastatin or saline administration (Ludka et al., 2013).



**Fig. 1.** Time table of treatments and schedule of behavioral and biochemical tests. (A) Adult male Swiss mice received PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day during four consecutive days). 24 h after the last administration of PCPA animals received atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or vehicle, and 1 hour interval before tail suspension test (TST) and open field test (OFT). (B) Adult male Swiss mice received atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), and 1 h after the treatment animals were subjected to TST/OFT. Another group of animals subjected to the same treatment schedule were killed and hippocampus and cortex were dissected to measure serotonin content by HPLC. (C) Adult male Swiss mice received WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) or ketanserin (5 mg/kg, s.c.; a preferential 5HT<sub>2A</sub> receptor antagonist), and after 30 min, atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or vehicle was administered. Animals were subjected to TST and OFT after 1 h. (D) The effect of SSRIs and atorvastatin was assessed by co-administration of fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.) with atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.) and 1 h after the administration TST and OFT was carried out.

In order to evaluate a putative effect of atorvastatin on 5-HT content in the hippocampus and frontal cortex, animals received saline or atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.). Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) was used as a positive control in order to evaluate the effect of classical SSRI antidepressant administered acutely. An hour after the administration (Ludka et al., 2013), animals were killed by decapitation and hippocampus and cortices were rapidly removed, frozen and kept in a temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  until the analysis. The behavioral tests (TST and OFT) were also performed using the same doses of atorvastatin and fluoxetine, after the same period of treatment (Fig. 1B).

The participation of 5HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of atorvastatin was evaluated by the pretreatment of mice with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; a selective 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonist). Thirty minutes after (Capra et al., 2010; Zeni et al., 2012), either atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or vehicle was administered. Sixty minutes later the TST was carried out. In a separate series of experiments, we investigated whether the antidepressant-like effect of atorvastatin in the TST is dependent on 5HT<sub>2A/2C</sub> receptors. To this end, mice were pretreated with ketanserin (5 mg/kg, s.c.; a preferential 5HT<sub>2A</sub> receptor antagonist) and 30 min after (Freitas et al., 2010; Machado et al., 2008; Zeni et al., 2012), either atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or vehicle was administered. Sixty minutes later the TST was performed (Fig. 1C).

In another set of experiments, in order to evaluate the combinatory effect of atorvastatin with SSRIs, independent groups of animals received sub-effective doses of different SSRIs, namely fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.) and a sub-effective dose of atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.) or saline. An hour after the co-administrations the TST was carried out (Cunha et al., 2013; Zeni et al., 2012) (Fig. 1D).

The effective (0.1 mg/kg) and subeffective (0.01 mg/kg) doses of atorvastatin were selected on the basis of a previous study from our laboratory (Ludka et al., 2013). The doses and time of administration of serotonergic agents (PCPA, WAY 100635, ketanserin and the SSRIs) and also the time interval to perform behavioral tests were selected on the basis of literature data and on our own group experience (Brocardo et al., 2008; Cunha et al., 2008; Kaster et al., 2005; Ludka et al., 2013; Machado et al., 2009; O'Leary et al., 2007; O'Neill and Conway, 2001; Posser et al., 2009).

## 2.5. Serotonin content measurement

### 2.5.1. Brain tissue preparation

After an acute treatment with atorvastatin (0.1 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg), mice were decapitated. The brains were quickly removed and dissected on ice into two regions: hippocampus and frontal cortex. Tissues were thawed, weighted and samples were processed as described before by Parrot et al. (2011). The weighed tissues were suspended in 10  $\mu\text{L}$ /mg of ice-cold 0.1 mol/L perchloric acid containing 1.34 mmol/L EDTA and 0.05%, w/v sodium bisulfite and sonicated for  $2 \times 15$  s. Then the homogenates were centrifuged at  $16,000 \times g$  for 20 min, and the supernatants were analyzed for monoamine content on the same day.

### 2.5.2. Standard solution

A stock solution was prepared by dissolving 1 mg of standard 5-HT (Sigma-Aldrich) exactly weighed in 10 mL of water to obtain a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The stock solution was stored at room temperature and protected from light. Working standard solutions were prepared daily by diluting to a concentration of 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with the mobile phase composed of 10 mmol/L acetate buffer (pH 4.5) and acetonitrile 94:6 v/v. The solution was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane before injection.

### 2.5.3. High performance liquid chromatography (HPLC)

Chromatographic analysis were performed on a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-10 AD pump, RF-10A

fluorescence detector (set at excitation wavelength at 278 nm and emission wavelength of 338) and an SCL-10Avp controller unit. The experiments were conducted on a reversed-phase PerkinElmer (Shelton, CT, USA) C<sub>8</sub> column (150  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) with a security guard holder (4.0 mm  $\times$  3.0 mm i.d.). The mobile phase composed of 10 mmol/L acetate buffer (pH 4.5) and acetonitrile (94:6 v/v), was eluted isocratically with a 0.6 mL/min flow rate. The injection volume was 40  $\mu\text{L}$  and the temperature of the oven was set at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Peak areas were integrated using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program.

## 2.6. Statistical analysis

Comparisons among treatment groups and controls were performed by one or two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test when appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. 5-HT is required for atorvastatin antidepressant-like effect in the TST

In order to observe the 5-HT dependence for the antidepressant-like effect elicited by the administration of atorvastatin, mice were pretreated with PCPA (100 mg/kg, i.p., a 5-HT depleting agent that acts by inhibiting tryptophan hydroxylase activity). PCPA was able to completely abolish the antidepressant-like effect of atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) in mice subjected to TST, as depicted in Fig. 2A (pretreatment:  $F(1,26) = 3.80$ ,  $p = 0.06$ ; treatment:  $F(1,26) = 3.28$ ,  $p = 0.08$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,26) = 13.66$ ,  $p = 0.001$ ). The administration of PCPA alone or in combination with atorvastatin did not affect the ambulation of mice in the open-field test (Fig. 2B) (pretreatment:  $F(1,25) = 4.38$ ,  $p = 0.04$ ; treatment:  $F(1,25) = 1.16$ ,  $p = 0.29$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,25) = 0.03$ ,  $p = 0.84$ ).

### 3.2. Acute atorvastatin treatment decreases immobility time in TST, but it does not change hippocampal or cortical 5-HT content

For the measurement of 5-HT content by HPLC, mice were acutely treated with saline, atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10.0 mg/kg, p.o.) 1 h before hippocampal and frontal cortex dissection. Neither acute atorvastatin treatment nor acute fluoxetine treatment was able to change the 5-HT content in the hippocampal as well as in the frontal cortex (Table 1).

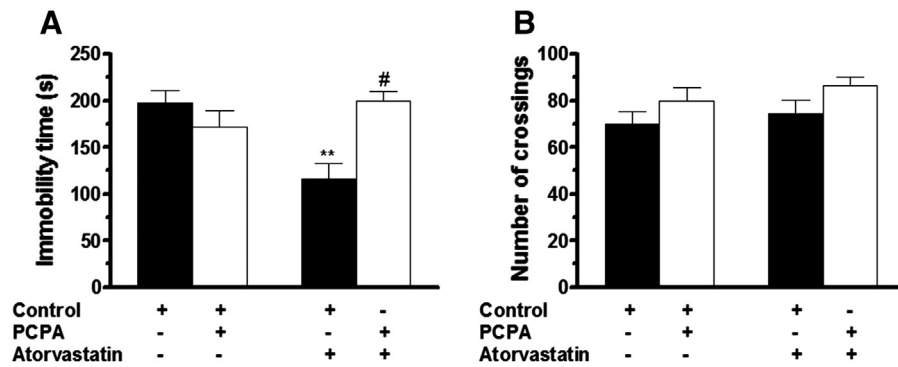
In a separate set of experiments animals were treated with atorvastatin or fluoxetine in the same doses depicted above. After 1 h animals were submitted to the behavioral tests. Both atorvastatin and fluoxetine were able to decrease the immobility time of mice submitted to the TST ( $F(1,24) = 72.894$ ,  $p < 0.01$ ) (Table 1). However, none of the treatments produced any changes in locomotor activity in the open-field test as compared to the control group ( $F(1,24) = 1.37$ ,  $p = 0.27$ ) (Table 1).

### 3.3. Involvement of 5HT<sub>1A/2A/2C</sub> receptors on atorvastatin antidepressant-like effect in TST

Pretreatment of mice with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) was able to block the atorvastatin (0.1 mg/kg, p.o.) antidepressant-like effect in the TST (pretreatment:  $F(1,20) = 14.75$ ,  $p < 0.01$ ; treatment:  $F(1,20) = 15.85$ ,  $p < 0.01$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 18.33$ ,  $p < 0.01$ ) as shown in Fig. 3A. The administration of WAY100635 alone or in combination with atorvastatin did not affect the ambulation in the open-field test (Fig. 3B) (pretreatment:  $F(1,20) = 5.09$ ,  $p = 0.03$ ; treatment:  $F(1,20) = 1.07$ ,  $p = 0.31$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 0.0009$ ,  $p = 0.97$ ).

Fig. 4A shows that the pretreatment of mice with ketanserin (5 mg/kg, s.c., a preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist) was also





**Fig. 2.** Effect of pretreatment with PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day for four days) on atorvastatin-induced antiimmobility effect (0.1 mg/kg, p.o.) in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B) in mice. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6-8$ ). \*\* $p < 0.01$  compared with the vehicle-treated control group; # $p < 0.01$  compared with the same group pretreated with vehicle (two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test).

able to prevent the atorvastatin antidepressant-like effect in the TST (pretreatment:  $F(1,20) = 7.86, p < 0.05$ ; treatment:  $F(1,20) = 5.49, p < 0.05$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 12.0, p < 0.01$ ). The administration of ketanserin alone or in combination with atorvastatin did not affect the locomotor activity of mice in the open-field test (Fig. 4B) (pretreatment:  $F(1,20) = 0.64, p = 0.43$ ; treatment:  $F(1,20) = 0.24, p = 0.62$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 0.079, p = 0.78$ )

### 3.4. Interaction of atorvastatin with SSRIs on the immobility time in the TST

In order to further evaluate the participation of the serotonergic system on the antidepressant-like effect of atorvastatin, the effect of combined administration of sub-effective doses of atorvastatin and SSRIs was assessed. We used fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.) in combination with atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.). The co-administration of sub-effective doses of fluoxetine, paroxetine or sertraline in combination with a sub-effective dose of atorvastatin exerted an antidepressant-like effect in the TST when compared to the administration of either drug alone (Fig. 5A, C and D, respectively). A two-way ANOVA revealed significant differences for atorvastatin treatment ( $F(1,20) = 6.43, p < 0.05$ ), fluoxetine treatment ( $F(1,20) = 21.33, p < 0.01$ ) and atorvastatin  $\times$  fluoxetine interaction ( $F(1,20) = 6.70, p < 0.05$ ); atorvastatin treatment ( $F(1,20) = 15.65, p < 0.01$ ), sertraline treatment ( $F(1,20) = 22.89, p < 0.01$ ) and atorvastatin  $\times$  sertraline interaction ( $F(1,20) = 5.37, p < 0.05$ ); atorvastatin treatment ( $F(1,20) = 13.87, p < 0.01$ ), paroxetine treatment ( $F(1,20) = 27.31, p < 0.01$ ) and atorvastatin  $\times$  paroxetine interaction ( $F(1,20) = 10.98, p < 0.01$ ). The administration of fluoxetine (pretreatment:  $F(1,20) = 1.32, p = 0.26$ ; treatment:  $F(1,20) = 3.01, p = 0.09$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 2.83, p = 0.10$ ); paroxetine (pretreatment:  $F(1,20) = 2.03, p = 0.17$ ; treatment:  $F(1,20) = 0.03, p = 0.85$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 1.00, p = 0.32$ ) or sertraline (pretreatment:  $F(1,20) = 0.52, p = 0.47$ ; treatment:  $F(1,20) = 0.03, p = 0.85$ ; pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,20) = 0.52, p = 0.47$ ) alone, or

in combination with atorvastatin, did not affect ( $p < 0.05$ ) the ambulation in the open-field test (Fig. 5B, D, F).

## 4. Discussion

This study shows for the first time that the antidepressant-like effect of atorvastatin, in mice subjected to TST, depends on an interaction with serotonergic system (5HT<sub>1A</sub>R and 5HT<sub>2A/C</sub>R). Moreover, the administration of sub-effective doses of atorvastatin and conventional SSRIs antidepressants (fluoxetine, paroxetine or sertraline) produced an antidepressant-like effect in the TST, suggesting that atorvastatin might improve the effectiveness of these antidepressant compounds.

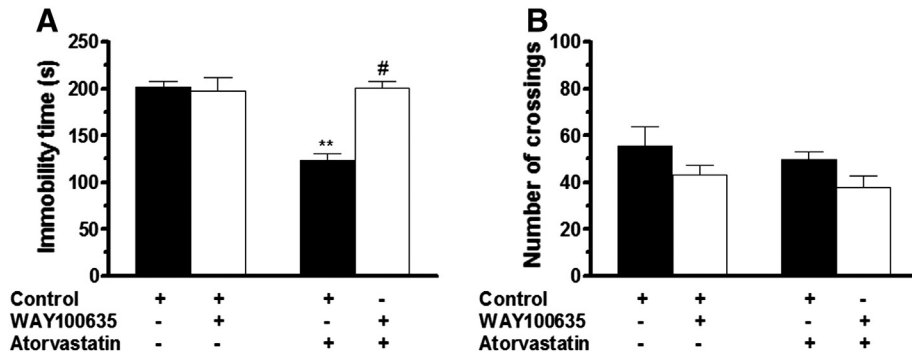
A previous demonstration from our laboratory showed that an acute administration of atorvastatin (0.1–30 mg/kg, p.o.) was able to exert antidepressant-like effect in mice subjected to TST. The antidepressant-like effect of atorvastatin depends on glutamatergic system modulation (Ludka et al., 2013). Since glutamate can modulate the activity of 5-HT transporters (Nowak et al., 1998; Skolnick et al., 1996) a putative modulation of serotonergic system in the antidepressant-like effect of atorvastatin was evaluated in this study.

Abnormalities in the serotonergic system have been pointed as a key factor in depression and other mental illness (Artigas, 2012). Clinical studies have demonstrated lower 5-HT metabolite concentrations in the CSF fluid of depressed patients which were correlated with suicide risk (Asberg et al., 1976). In agreement, most of the currently available antidepressants cause activation of serotonergic neurotransmission (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004). In the present study, the depletion of endogenous 5-HT with a tryptophan hydroxylase inhibitor, PCPA, at a dose known to decrease the content of 5-HT (Redrobe et al., 1998), abolished the antidepressant-like effect of atorvastatin. This result clearly suggests that 5-HT content plays a critical role for the atorvastatin antidepressant-like effect. PCPA was previously shown to completely prevent the antidepressant-like effect of fluoxetine (Machado et al., 2007; Rodrigues et al., 2002), and alters the response of fluoxetine or citalopram to the TST (O'Leary et al., 2007). It is also of great interest to highlight that 5-HT depletion attenuates ketamine antidepressant-like effect (Gigliucci et al., 2013).

**Table 1**  
Effect of atorvastatin or fluoxetine treatment in hippocampal and cortical 5-HT content and in behavioral parameters. Serotonin content (nmol/mg tissue) measured in the hippocampus and frontal cortex 1 h after treatment of mice with atorvastatin (0.1 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) by oral route. The immobility time in TST as also the number of crossings in the open-field test in animals treated with atorvastatin (0.1 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) are presented. Values are expressed as means  $\pm$  S.D. ( $n = 8-10$ ).

	5-HT content (nmol/mg tissue)		Behavioral parameters	
	Hippocampus	Frontal cortex	Immobility time (seconds)	Number of crossings
Control	2.01 $\pm$ 0.26	2.30 $\pm$ 0.16	192.7 $\pm$ 3.3	87.8 $\pm$ 4.2
Atorvastatin 0.1 mg/kg	1.98 $\pm$ 0.27	2.27 $\pm$ 0.28	146.2 $\pm$ 4.8**	88.5 $\pm$ 2.2
Fluoxetine 10 mg/kg	1.86 $\pm$ 0.27	2.05 $\pm$ 0.07	112.1 $\pm$ 6.1**	95.3 $\pm$ 3.2

\*\*  $p < 0.01$  when compared with the vehicle-treated control group (one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test).



**Fig. 3.** Effect of pretreatment with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) on atorvastatin-induced antiimmobility effect (0.1 mg/kg, p.o.) in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B) in mice. Values are expressed as means ± S.E.M. (n = 6–8). \*\**p* < 0.01 compared with the vehicle-treated control group; #*p* < 0.01 compared with the same group pretreated with vehicle (two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test).

Many brain regions and circuits have been implicated in the pathophysiology of depression (Krishnan and Nestler, 2010), but the circuit formed by the prefrontal cortex and the hippocampus seems to play a crucial role in the expression of affective and cognitive depressive-symptoms, as well as in antidepressant response (Bessa et al., 2009). Imaging studies have shown hippocampal volume reduction in patients with depressive disorder, which correlates with disease duration (Koolschijn et al., 2009). Additionally, low levels of monoamines in such regions, and in particular that of 5-HT, have been related to the state of depression (Blair and de Montigny, 1994). Conversely, the increases on brain 5-HT levels are thought to be closely related to the antidepressant effect (Kitaichi et al., 2010).

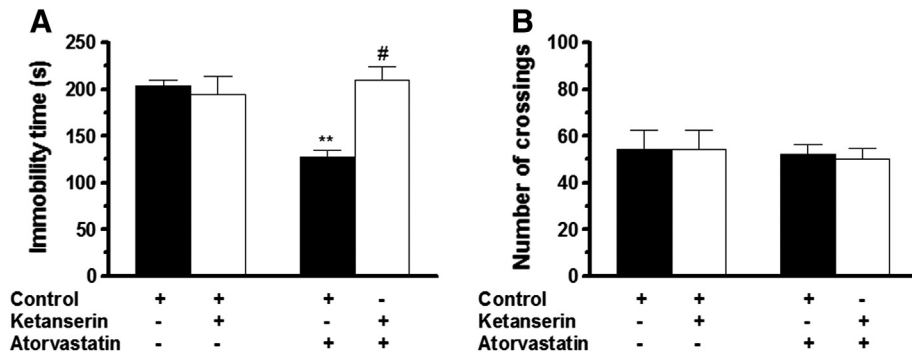
In the present study we compared the effect of acute administration of atorvastatin or fluoxetine on 5-HT content. Our results revealed that none of the treatments changed the hippocampal's or frontal cortices' 5-HT content when administered in the same doses and time that exerted the antidepressant-like effect in the TST (Table 1). These results are in accordance with Wang et al.'s (2012) finding that using a similar experimental protocol, also showed that the acute administration of fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) to rats did not change the hippocampal 5-HT content. On the other hand, a previous study showed that although an acute injection of fluoxetine (15 mg/kg, i.p.) can transiently elevate hippocampal and striatal 5-HT levels, the total 5-HT content did not change (Kreiss and Lucki, 1995). Conversely, another study demonstrated an increase in mice hippocampal 5-HT content, 45 min after an acute fluoxetine injection (10 mg/kg, i.p.) by using a colorimetric immunoassay kit (Mao et al., 2011). These differences may be due to the time of sample obtaining, which was smaller in the latest study, and also due to the methodological approach used.

Moreover, other studies have demonstrated that acute SSRI treatment can increase 5-HT levels in the frontal cortex (Hatanaka et al., 2000; Kitaichi et al., 2010) and in dorsal hippocampus (Invernizzi

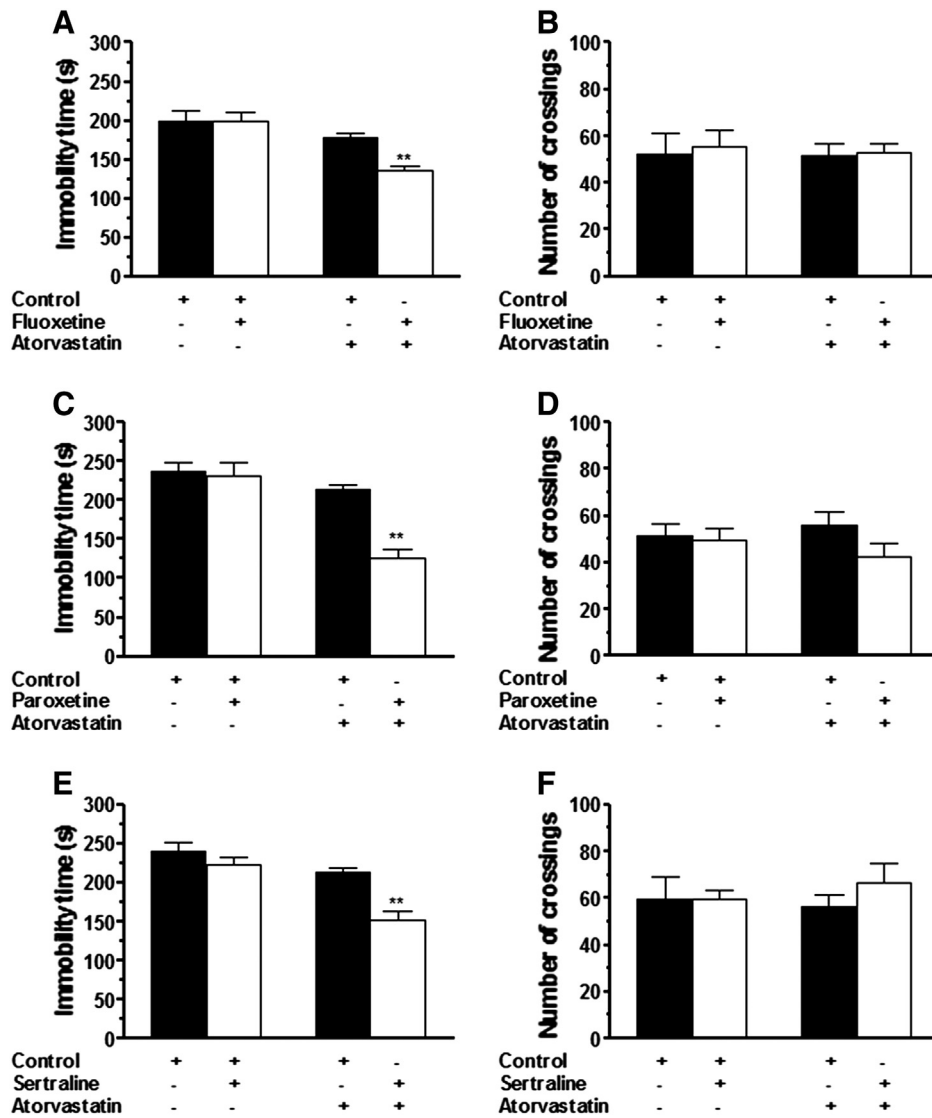
et al., 1995), whereas the 5-HT content increases only by using a chronic treatment (Amargós-Bosch et al., 2005; Kreiss and Lucki, 1995). It is important to highlight that in this study we used an ex vivo approach that does not permit to evaluate 5-HT levels in the synapses or the dynamics of the system. In this way, atorvastatin, as well as fluoxetine does not change 5-HT total content, although both exerted an antidepressant-like effect (Table 1) that depends on 5-HT levels (Fig. 2A, Machado et al., 2007; Rodrigues et al., 2002).

Regarding 5-HT receptors it is well known that the mechanism of action of several classes of antidepressant drugs, such as tricyclics, monoamine oxidase inhibitors and SSRIs occur by the participation of the 5-HT<sub>1A</sub> (Hensler, 2006), 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors (Artigas, 2012). In this study, the pre-treatment of mice with WAY100635 (a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) abolished atorvastatin antidepressant-like effect, thus demonstrating the 5-HT<sub>1A</sub> receptor participation in such effect. The involvement of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptor in the antidepressant-like effect of atorvastatin was demonstrated since the pre-treatment of mice with ketanserin (a 5-HT<sub>2A/C</sub> receptor antagonist) was able to abolish atorvastatin antiimmobility effect. Similarly, ketanserin has been reported to prevent the antidepressant-like effect of several antidepressant compounds in the TST (Binfaré et al., 2009; Capra et al., 2010; Zeni et al., 2012). Considering that ketanserin has a higher affinity for 5-HT<sub>2A</sub> than to 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtype (Glennon et al., 2002) we suggest that atorvastatin effect in the TST is mediated through an interaction with 5-HT<sub>2A</sub> although the participation of 5-HT<sub>2C</sub> cannot be ruled out.

Some of the most compelling evidence that the serotonergic system has long been implicated in the etiology of depression involve the alleviation of depression symptoms evoked by SSRIs (Elhwuegi, 2004), that are among the most widely prescribed drugs in psychiatry (Kroeze et al., 2012). They also have better tolerability and lower rates of treatment discontinuation than observed with tricyclic antidepressant use (Anderson, 2000; Montgomery and Kasper, 1995). SSRIs increase the



**Fig. 4.** Effect of pretreatment with ketanserin (5 mg/kg, s.c.; a preferential 5HT<sub>2A</sub> receptor antagonist) on atorvastatin-induced anti-immobility effect (0.1 mg/kg, p.o.) in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B) in mice. Values are expressed as means ± S.E.M. (n = 6–8). \*\**p* < 0.01 compared with the vehicle-treated control group; #*p* < 0.01 compared with the same group pretreated with vehicle (two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test).



**Fig. 5.** Effect of co-administration of sub-effective doses of fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.) with atorvastatin (0.01 mg/kg, p.o.) in the TST (A, C and E respectively) and on the number of crossings in the open-field test (B, D and F respectively) in mice. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6-8$ ).  $**p < 0.01$  compared with the vehicle-treated control group (two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test).

extracellular 5-HT levels in the synaptic cleft by blocking the 5-HT transporter located on presynaptic nerve terminals (Bel and Artigas, 1993; Ceglia et al., 2004), although the degree of selectivity for 5-HT transporter is variable. Fluoxetine, paroxetine or sertraline act on 5-HT transporter, however paroxetine and sertraline have higher affinity for 5-HT transporter (Carrasco and Sandner, 2005).

In the present study, we demonstrated that a combined treatment with SSRIs (fluoxetine, paroxetine or sertraline) and atorvastatin, at sub-effective doses was able to decrease the immobility time of mice in the TST. Previous study was also able to demonstrate that lovastatin administration to rats for 30 days, let animals more sensitive to the antidepressant-like effect of a low (sub-threshold) dose of fluoxetine evaluated in the forced swimming test (Santos et al., 2012). Comparing statin antidepressant-like effects, atorvastatin seems to be effective at lower doses and in an acute administration schedule, although different species and behavioral despair tests were used in these studies.

Reinforcing pre-clinical data, a recent 6-week randomized double-blind placebo controlled-clinical trial assessed the efficacy and safety of lovastatin, as an adjuvant agent for treating major depressive disorders.

They demonstrated that the lovastatin plus fluoxetine-treated group decreased depression scores more than the placebo group, with no serious side effects (Ghanizadeh and Hedayati, 2013). It is important to mention that the concomitant use of statins and SSRIs may be a common practice, since both hypercholesterolemia and depression are highly incident diseases especially in the elderly (Grundy et al., 2004; Jacobi et al., 2004; Mathers and Loncar, 2006). No direct evidence regarding the mechanism by which statins can boost the SSRI antidepressant effect was reported, although it is plausible to consider an involvement of antiinflammatory or antioxidant mechanisms (Piermartiri et al., 2010), and glutamatergic system modulation (Bosel et al., 2005; Castro et al., 2013; Ludka et al., 2013; Piermartiri et al., 2009, 2010), which have previously explained the pleiotropic effects of statins.

In conclusion, our results showed that atorvastatin antidepressant-like effect in the TST is dependent on the availability of 5-HT in the synaptic cleft and on the interaction with 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. Moreover, our data showed the antidepressant-like effect exerted by the combination of atorvastatin with fluoxetine, paroxetine or sertraline. The association of atorvastatin with conventional antidepressants

should be used to reduce the dose of these drugs as an alternative approach to treat depression.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX – Project NENASC), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos-IBN-Net #01.06.0842-00) and INCT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia) for Excitotoxicity and Neuroprotection. FKL, LCC and TD-C receive scholarships from FAPESC, CAPES, and CAPES-PVE 052/2012, respectively. CIT and ALSR are supported by research fellowships from CNPq. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this study.

## References

- Abramowski D, Rigo M, Duc D, Hoyer D, Staufienbiel M. Localization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology* 1995;34:1635–45.
- Amargós-Bosch M, Artigas F, Adell A. Effects of acute olanzapine after sustained fluoxetine on extracellular monoamine levels in the rat medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 2005;516:235–8.
- Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 2000;58(1):19–36. [Apr].
- Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.09.006>.
- Asberg M, Traskman L, Thoren P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* 1976;33:1193–7.
- Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function; 1999.
- Bel N, Artigas F. Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 1993;15(3):243–5.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* 2009;14(8):764–73.
- Binfaré RW, Rosa AO, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(3):530–40.
- Blier P, Abbott FVJ. *Psychiatry Neurosci* 2001;26:37.
- Blier P, De Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:220–6.
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 2008;42:433–42.
- Bose J, Gandor F, Harms S, Synowitz M, Harms Djoufack PC, Megow D, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate induced excitotoxicity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2005;92:1386–98.
- Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* 2008;501:464–73.
- Capra JC, Cunha MP, Machado DG, Zomkowski AD, Mendes BG, Santos AR, et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Behav Pharmacol* 2010;643:232–8.
- Carrasco JL, Sandner C. Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. *Int J Clin Pract* 2005;59(12):1428–34.
- Carvalho AF, Machado JR, Cavalcante JL. Augmentation strategies for treatment-resistant depression. *Curr Opin Psychiatry* 2008;22:07–12.
- Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2013;4(1513):103–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.029>. [Epub 2013 Mar 30].
- Ceglía I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, Caccia S, Invernizzi RW. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 2004;142(3):469–78.
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 2001;21:9917–29.
- Cunha MP, Machado DG, Bettio LEB, Capra JC, Rodrigues ALS. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1913–20.
- Cunha MP, Pazini FL, Oliveira A, Machado DG, Rodrigues ALS. Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. *Brain Res Bull* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.01.005>.
- De Almeida J, Mengod G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT<sub>2A</sub> receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* 2007;103:475–86.
- Di Napoli P, Taccardi AA, Oliver M, De Caterina R. Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects. *Eur Heart J* 2002;23:1908–21.
- Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:435–51.
- Fink K, Schmitz V, Boing C, Gothert M. Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995;352:394–401.
- Freitas AE, Budni J, Lobato KR, Binfaré RW, Machado DG, Jacinto J, et al. Antidepressant-like effect of ethanolic extract of *Tabebuia avellanae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:335–43.
- Ghanizadeh A, Hedayati A. Augmentation of fluoxetine with lovastatin for treating major depressive disorder, a randomized double-blind placebo controlled - clinical trial. *Depression and Anxiety* 2013;30:1084–8.
- Gigliucci V, O'Dowd G, Casey S, Egan D, Gibney S, Harkin A. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. *Psychopharmacology* 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-013-3024-x>.
- Glennon RA, Dukat M. Serotonin receptors and their ligands: a lack of selective agents. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;40:1009–17.
- Glennon RA, Metwally K, Dukat M, Ismael AM, De los Angeles J, Herndon J, et al. Ketanserin and spiperone as templates for novel serotonin 5-HT<sub>2A</sub> antagonists. *Curr Top Med Chem* 2002;2(6):539–58.
- Grundy SM, Cleeman JJ, Merz CN, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Thromb Hemostasis* 2004;24:149–61.
- Hatanaka K, Yatsugi S, Yamaguchi T. Effect of acute treatment with YM992 on extracellular serotonin levels in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 2000;395:23–9.
- Heeschen C, Hamm CW, Laufs U, Snapinn S, Bohm M, White HD. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators: withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:1446–52.
- Hensler JG. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:203–14.
- Hoyer D. Molecular pharmacology and biology of 5-HT<sub>1c</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:89–94.
- Invernizzi R, Bramante M, Samanin R. Extracellular concentrations of serotonin in the dorsal hippocampus after acute and chronic treatment with citalopram. *Brain Res* 1995;696:62–6.
- Irwin SA, Iglewicz A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. *J Palliat Med* 2010;17:903–8.
- Jacobi F, Wittchen HU, Holting C, Hofler M, Pfister H, Muller N, et al. Prevalence, comorbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS). *Psychol Med* 2004;34:597–611.
- Kaster MP, Santos AR, Rodrigues ALS. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull* 2005;67:53–61.
- Kitaiichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kakuta A, Izumi T, et al. Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. *Eur J Pharmacol* 2010;647:90–6.
- Koolschijn PC, van Haren NE, Lensvelt-Mulders GJ, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 2009;30(11):3719–35.
- Kreiss DS, Lucki I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274(2):866–76.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. Serotonin now: part 1. Neurobiology and developmental genetics. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2010;78:319–31.
- Krishnan V, Nestler EJ. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 2010;167:1305–20.
- Kroeze Y, Zhou H, Homberg JR. The genetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera>.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 2010;329:959–64.
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89–118.
- Ludka FK, Zomkowski ADE, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni ALB, Rodrigues ALS, et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013;23:400–12.
- Machado DG, Kaster MP, Binfaré RW, Dias M, Santos AR, Pizzolatti MG, et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:421–8.
- Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 2008;587:163–8.
- Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:642–50.
- Mao QQ, Xian YF, Ip SP, Che CT. Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2011;35:1144–7.

- Marek GJ, Carpenter LL, McDougle CJ, Price LH. Synergistic action of 5-HT<sub>2A</sub> antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:402–12.
- Martin-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, et al. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 2001;21:9856–66.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:442.
- Millan MJ. *Pharmacol Exp Ther* 2000;295.
- Millan MJ. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol* 2004;500:371–84.
- Millan MJ. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Therapie* 2005;1138:441–60.
- Montgomery SA, Kasper S. Comparison of compliance between serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants: a meta-analysis. *Int Clin Psychopharmacol Suppl* 1995;4:33–40.
- Niswender CM, Herrick-Davis K, Dilley GE, Meltzer HY, Overholser JC, Stockmeier CA, et al. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. Alterations in suicide and implications for serotonergic pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:478–91.
- Nowak G, Legutko B, Skolnick P, Popik P. Adaptation of cortical NMDA receptors by chronic treatment with specific serotonin reuptake inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1998;26:367–70.
- Nutt DJ. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry* 2006;67:3–8.
- O’Leary OF, Bechtolt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;192:357–71.
- O’Neill MF, Conway MW. Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology* 2001;598:391–8.
- Ouk T, Potey C, Laprais M, Gautier S, Hanf R, Darteil R, et al. PPAR $\alpha$  is involved in the multitargeted effects of a pretreatment with atorvastatin in experimental stroke. *Fundam Clin Pharmacol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/fcp.12035>. [Epub ahead of print].
- Parrot S, Neuzerter PC, Denoroy L. A rapid and sensitive method for the analysis of brain monoamine neurotransmitters using ultra-fast liquid chromatography coupled to electrochemical detection. *J Chromatogr* 2011;879:3871–8.
- Parsey RV, Oquendo MA, Simpson NR, Ogden RT, Van Heertum R, Arango V, et al. Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding potential measured by PET using [<sup>11</sup>C]-WAY-100635. *Brain Res* 2002;954:173–82.
- Pessoa-Mahana H, Araya-maturana R, Saitz C, Pessoa-Mahama H. A synthetic overview of new molecules with 5-HT<sub>1A</sub> binding affinities. *Mini-Rev Med Chem* 2003;3:77–93.
- Piermartiri TC, Vandrezen-Filho S, de Araújo Herculano B, Martins WC, Dal’agnolo D, Stroeh E, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 2009;16(2):106–15.
- Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta$ (1–40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 2010;226(2):274–84.
- Posada-Duque RA, Velasquez-Carvajal D, Eckert GP, Cardona-Gomez GP. Atorvastatin requires geranylgeranyl transferase-I and Rac1 activation to exert neuronal protection and induce plasticity. *Neurochem Int* 2013;62(4):433–45.
- Posser T, Kaster MP, Barauna SC, Rocha JB, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol* 2009;602:85–91.
- Pralong E, Magistretti P, Stoop R. Cellular perspectives on the glutamate and monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 2002;67(173):202.
- Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 1998;138:1–8.
- Robbins TW, Arnsten AF. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:267–87.
- Rodrigues ALS, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*; 2002.
- Roy A, De Jong J, Linnoila M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46:609–12.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. Expression of serotonin 1A and serotonin 2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004;14:1100–9.
- Santos T, Baungratz MM, Haskel SP, de Lima DD, da Cruz JN, Magro DD, et al. Behavioral interactions of simvastatin and fluoxetine in tests of anxiety and depression. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2012;8:413–22.
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 1996;29:23–6.
- Stępień K, Tomaszewski M, Czuczwar SJ. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol Rep* 2002;57:561–9.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1985;85:367–70.
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* 1998;18:7394–401.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 2008;14:37–44.
- Wang YQ, Tu ZC, Xu XY, Li R, Qu WM, Urade Y, et al. Acute administration of fluoxetine normalizes rapid eye movement sleep abnormality, but not depressive behaviors in olfactory bulbectomized rats. *J Neurochem* 2012;120(2):314–24. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07558.x>. [Epub 2011 Nov 28].
- Woolley DW, Shaw E. Some neurophysiological aspects of serotonin. *Br Med J* 1954;4880:122–6.
- Xu YQ, Long L, Yan JQ, Wei L, Pan MQ, Gao HM, et al. Simvastatin induces neuroprotection in 6-OHDA-lesioned PC12 via the PI3K/AKT/caspase 3 pathway and anti-inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther* 2013;19(3):170–7.
- Zeni ALB, Zomkowski ADE, Dal-Cim T, Maraschin M, Rodrigues AL, Tasca CI. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *J Ethnopharmacol* 2011;137:864–74.
- Zeni ALB, Zomkowski ADE, Maraschin M, Rodrigues AL, Tasca CI. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. *Eur J Pharmacol* 2012;679:68–74.
- Zomkowski ADE, Engel D, Gabilan NH, Rodrigues ALS. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropharmacol* 2010;20:793–801.



**ANEXO B – CAPÍTULO I**

*Manuscrito submetido ao Journal of Psychiatric Reaserch:*

***Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  and mTOR in the Antidepressant-like Effect of Atorvastatin in Mice***

Fabiana Kalyne Ludka<sup>2,4</sup>, Leandra Celso Constantino<sup>2</sup>, Tharine Dal-Cim<sup>3</sup>, Luisa Bandeira Binder<sup>1</sup>, Andréa Zomkowski<sup>2</sup>, Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>1,2,3</sup>, Carla Inês Tasca<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica, <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>4</sup>Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, 89460-000, Canoinhas, SC, Brasil.

Corresponding author:

Fabiana Kalyne Ludka

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telephone number: +55-48 3721-5046

E-mail address: fabianakalyne@hotmail.com





## CAPÍTULO II

---

*Estudo dos mecanismos de neuroproteção desencadeados pela atorvastatina e a relação com o efeito tipo-antidepressivo.*

---

Este capítulo apresenta os resultados relacionados aos objetivos específicos IV e V desta tese. Os resultados referentes aos mecanismos de neuroproteção da atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos e frente à toxicidade e alteração comportamental induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  estão apresentados como anexos (Anexos A e B do Capítulo II, respectivamente).

O anexo A apresenta o manuscrito intitulado: “*Atorvastatin Protects from  $A\beta_{1-40}$ -induced Cell Death and Depressive-like Behavior via BDNF Cleavage*”, submetido ao periódico *Molecular Neurobiology*.

O anexo B apresenta o artigo científico intitulado: “*Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices*” publicado no periódico *Molecular Neurobiology*.



**ANEXO A – CAPÍTULO II**

*Manuscrito Submetido ao periódico Molecular Neurobiology*

**Atorvastatin Protects from A $\beta$ <sub>1-40</sub>-induced Cell Damage and Depressive-like Behavior via BDNF Cleavage**

Fabiana K. Ludka<sup>a,b,d</sup>, Maurício P. Cunha<sup>b</sup>, Tharine Dal-Cim<sup>b</sup>, Luisa Bandeira Binder<sup>a</sup>, Leandra C. Constantino<sup>b</sup>, Caio Massari<sup>b</sup>, Wagner C. Martins<sup>c</sup>, Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>a,b,c</sup>, Carla I. Tasca<sup>a,b,c</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica, <sup>c</sup>Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>d</sup>Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, 89460-000, Canoinhas, SC, Brasil.

**Corresponding author:**

Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telephone number: +55-48 3721-5046

E-mail address: carla.tasca@ufsc.br

**Running title: Atorvastatin Protects from A $\beta$ <sub>1-40</sub>-induced Toxicity**



**ANEXO B – CAPÍTULO II**



# Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices

Fabiana K. Ludka<sup>1,2,3</sup> · Tharine Dal-Cim<sup>4</sup> · Luisa Bandeira Binder<sup>2</sup> ·  
Leandra Celso Constantino<sup>1</sup> · Caio Massari<sup>4</sup> · Carla I. Tasca<sup>1,2,4</sup>

Received: 26 December 2015 / Accepted: 21 March 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Atorvastatin has been shown to exert a neuroprotective action by counteracting glutamatergic toxicity. Recently, we have shown atorvastatin also exerts an antidepressant-like effect that depends on both glutamatergic and serotonergic systems modulation. Excitotoxicity is involved in several brain disorders including depression; thus, it is suggested that antidepressants may target glutamatergic system as a final common pathway. In this study, a comparison of the mechanisms involved in the putative neuroprotective effect of a repetitive atorvastatin or fluoxetine treatment against glutamate toxicity in hippocampal slices was performed. Adult *Swiss* mice were treated with atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), once a day during seven consecutive days. On the eighth day, animals were killed and hippocampal slices were obtained and subjected to an *in vitro* protocol of glutamate toxicity. An acute treatment of atorvastatin or fluoxetine was not neuroprotective; however, the repeated atorvastatin or fluoxetine treatment prevented the decrease in cellular viability induced by

glutamate in hippocampal slices. The loss of cellular viability induced by glutamate was accompanied by increased D-aspartate release, increased reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production, and impaired mitochondrial membrane potential. Atorvastatin or fluoxetine repeated treatment also presented an antidepressant-like effect in the tail suspension test. Atorvastatin or fluoxetine treatment was effective in protecting mice hippocampal slices from glutamate toxicity by preventing the oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

**Keywords** Atorvastatin · Fluoxetine · Glutamate toxicity · Neuroprotection · Hippocampal slices

## Abbreviations

HBSS	Hank's balanced salt solution
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
KRB	Krebs ringer buffer
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
ROS	Reactive oxygen species
SSRIs	Selective serotonin reuptake inhibitors
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrial membrane potential

## Introduction

The amino acid L-glutamate (Glu) is an excitatory neurotransmitter that plays a fundamental role in a wide range of physiological functions, including memory, cognition, and neuronal plasticity [1]. Deregulated excitatory neurotransmission results in high concentrations of extracellular glutamate and

✉ Fabiana K. Ludka  
fabianakalyne@hotmail.com

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>3</sup> Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, 89460-000 Canoinhas, SC, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

especially increased levels of extra-synaptic Glu that leads to cellular damage, an event known as excitotoxicity [2–4].

The intracellular mechanisms responsible for neuronal injury in excitotoxicity are under investigation [5]; however, some processes are already well established. Glu-induced toxicity is dependent on its interaction with the ionotropic receptor N-methyl-D-aspartate (NMDAR) [6, 7]. NMDAR is an ion gated channel that once activated allows a massive calcium influx [6]. Calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) can interact with calmodulin forming the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex, which in turn activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) promoting an increase in nitric oxide (NO) production [8–10]. Once formed, NO has a number of intracellular targets [11]. It can also form peroxynitrite due to interaction with reactive oxygen species (ROS) as the free radical superoxide, which may lead to protein nitration, protein oxidation, lipid peroxidation, and DNA damage [12], culminating in necrotic or apoptotic cell death [13]. In pathological conditions, beyond nNOS activity, inducible NOS (iNOS) can produce an additional amount of NO thus contributing to Glu toxicity [14, 15]. NO can inhibit the mitochondrial respiratory chain and stimulates neurotransmitter release from synaptosomes [16].

Besides NO, NMDAR activation and secondary  $\text{Ca}^{2+}$  influx can also disrupt mitochondria function, once this organelle is a regulator of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels that can be overloaded by the ionic unbalance. Mitochondrial injury contributes to excitotoxic damage by changing membrane potential, increasing generation of ROS and releasing pro-apoptotic proteins that lead to cell death [17–19]. Therefore, loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) following NMDAR activation due to excitotoxicity requires mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload, possibly combined with oxidative or nitrosative stress [20, 21]. An intact  $\Delta\Psi_m$  is crucial to ATP synthesis,  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration, and controlled ROS production [17] in order to maintain cellular viability.

Considering the remarkable levels of oxygen utilization and ATP synthesis, the central nervous system (CNS) has a large susceptibility to oxidative stress [22]. In this scenario, many neurodegenerative diseases, such as depression, share events as NMDAR hyperfunctioning, NO production, mitochondrial dysfunction, cell energy impairment, overproduction of ROS, and apoptosis as a final common pathogenic mechanism [23–25].

In this way, for treating depression, it is interesting to identify drugs that act by improving mood and also present neuroprotective effects [26]. The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) were approved for clinical use in the 1980s, and among SSRIs, fluoxetine has become the most effective prescribed antidepressant worldwide [27]. Although the primary fluoxetine mechanism of action is based on the modulation of serotonergic system, the final pathway, not just for fluoxetine but also for general SSRIs, seems to be the glutamatergic system [28, 29],

and increased attention around the crosstalk between these systems has been perceived [30].

Recently, we have demonstrated that atorvastatin, a lipophilic drug that belongs to the class of statins, could exert an antidepressant-like effect that depends on both glutamatergic and serotonergic systems modulation [31, 32]. The neuroprotective effect of this statin against several animal models of diseases that disrupts glutamatergic system has been shown by our laboratory [33–37]. Also, it has been revealed that statins can improve the well-being of depressed [38] and anxious patients, and it has been suggested that statins can be used as adjuvant agents for treating major depression [39].

Considering the importance of glutamatergic toxicity for depression development and treatment, this study investigated the protective effect of atorvastatin and fluoxetine against Glu toxicity and the mechanisms involved in such effect. We succeed in demonstrating that atorvastatin as well as fluoxetine, at the same protocol schedule that promoted antidepressant-like effect in mice, were effective in protecting hippocampal slices from Glu toxicity by preventing NO and ROS production and loss of the  $\Delta\Psi_m$ . These results showed that atorvastatin and fluoxetine counteracted oxidative stress and mitochondrial membrane potential impairment induced by excitotoxicity.

## Materials and Methods

### Animals

Male adult *Swiss* mice (60–90 days postnatal) maintained on a 12-h light/12-h dark schedule at 25 °C, with food and water ad libitum, have been obtained from our local breeding colony. Experiments have followed the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised in 1985) and they have been approved by the local Ethical Committee for Animal Research (CEUA/UFSC PP559).

### Pharmacological Treatment

Atorvastatin (Liptor®, Pfizer, 10 mg/kg) or fluoxetine (Prozac®, Eli Lilly, 10 mg/kg) were freshly dissolved in water and administered by oral route (p.o.) in a volume of 10 mL/kg body weight using the gavage technique. When acute administration was done, atorvastatin or fluoxetine were administered 1 h before mice decapitation. The repetitive treatment consisted in a daily administration of atorvastatin or fluoxetine once a day for seven consecutive days. Atorvastatin or fluoxetine administration was done between 10 and 12 a.m. The animals were subjected to behavioral tests or were sacrificed in order to remove hippocampus to assess biochemical parameters 24 h after



the last administration. Control animals received water in the same conditions. The doses of drugs were selected on the basis of literature data and on our own group experience [31, 32, 40].

### Preparation and Incubation of Hippocampal Slices

After pharmacological treatment, mice were decapitated and have their brain rapidly removed from the skull and placed into ice-cold Krebs-bicarbonate (KRB) dissection buffer containing, in mM: 120 NaCl, 2 KCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucose, and 200 sucrose. The buffer was bubbled with 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub> up to pH 7.4 [41]. Hippocampi were dissected and slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper and separated in KRB at 4 °C, using a soft brush. Immediately after sectioning, slices were transferred to a 24-well plate and were maintained in KRB without sucrose at 37 °C for 30 min to recover from slicing trauma (pre-incubation period). Experiments were conducted in triplicates.

A previously established protocol of evaluation of Glu toxicity *in vitro* was used [42]. After pre-incubation period, slices were exposed to 10 mM Glu (in KRB) for 1 h. The medium was then removed and slices were maintained during 6 h in nutritive incubation medium (NIM) (post-incubation period) composed of 50 % KRB, 50 % Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), and 20 mM HEPES, at 37 °C in a CO<sub>2</sub> atmosphere. In order to adapt the protocol to slices obtained from adult mice, post-incubation periods of 3 or 4 h in NIM were tested.

A time course of Glu incubation was also done aiming to assess early biochemical alterations. After the pre-incubation period, slices were exposed to 10 mM Glu (in KRB solution) for 15, 30, 60, or 120 min and oxidative or mitochondrial damage was immediately assessed after each incubation period. The slices corresponding to the control groups were incubated only in KRB solution or in the NIM, when it was necessary to preserve slices viability for longer periods of time, in order to mimic the physiological conditions.

### Evaluation of Cell Viability

The ability of cells to reduce the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) was used to determine cell viability as previously described [43]. Slices were incubated with MTT (0.5 mg/mL) in KRB for 30 min at 37 °C. The tetrazolium ring of MTT can be cleaved by active dehydrogenases to produce a precipitated formazan which reduction can be used as an index of cellular viability. The medium was withdrawn and precipitated formazan was solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO) and quantified spectrophotometrically at a wavelength of 540 nm.

### Excitatory Amino Acids Release

After pre-incubation period in KRB buffer, hippocampal slices were incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.4, composition in mM: 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.65 MgSO<sub>4</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5 HEPES. Glu (10 mM) was added and incubated for 15 min and excitatory amino acids release was assessed by adding 0.33 μCi/ml D-[<sup>3</sup>H]aspartate with 100 μM of unlabeled D-aspartate in 300 μL for 7 min and stopped by three ice-cold washes with 1 mL HBSS. The ice-cold wash is necessary in order to stop D-[<sup>3</sup>H]aspartate uptake and remove extracellular excess of D-[<sup>3</sup>H]aspartate that was not taken up by cells. D-[<sup>3</sup>H]aspartate was used in order to avoid amino acids metabolism in intracellular compartments and we previously observed that similar data was observed by using L-[<sup>3</sup>H]glutamate [44]. Slices were then further incubated for 15 min in 300 μL HBSS and the supernatant was collected in order to measure the amount of released D-[<sup>3</sup>H]aspartate. Slices were disrupted by overnight incubation with 0.1 % NaOH/0.01 % SDS and aliquots of lysates were taken for determination of intracellular D-[<sup>3</sup>H]aspartate content [44, 45]. Intracellular and extracellular D-[<sup>3</sup>H]aspartate content were determined through scintillation counting, calculated as nanomole of aspartate per milligram of protein per minute and the amount of released excitatory amino acids and was expressed as a percentage of total D-[<sup>3</sup>H]aspartate content.

### Nitric Oxide (NO) Measurement

The molecular probe 5,6-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) was used to measure NO levels [46], adapting the protocol as proposed by Martín-de-Saavedra et al. [47]. DAF-2DA diffuses through cells membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to the non-fluorescent form diaminefluorescein-2 (DAF-2). DAF-2 reacts with an oxidation product of NO to the highly fluorescent triazolofluorescein DAF-2T. DAF-2DA was added 30 min before the end of the experiment to the media in which hippocampal slices were incubated, at a final concentration of 10 μM. At the end of the experiment, slices were washed once with KRB. The fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (TECAN®). Wavelengths of excitation and emission were 495 and 515 nm, respectively.

### ROS Measurement

Generation of ROS was estimated with the fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) that is hydrolyzed by intracellular esterases to the non-fluorescent form 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), which in turn reacts with intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to form 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), a green fluorescent dye. At the end of the experiment,

H<sub>2</sub>DCFDA was added to hippocampal slices incubation medium, at a final concentration of 40  $\mu$ M for 20 min. At the end of the incubation, slices were washed once with KRB. The fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (TECAN®), using 495 and 515 nm as wavelengths of excitation and emission, respectively.

### Mitochondrial Membrane Potential ( $\Delta\Psi_m$ ) Measurement

Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE), a mitochondria selective fluorescent dye, was used to measure  $\Delta\Psi_m$  [48]. TMRE dye was used in a quenching protocol, which means that it was used in a sufficient concentration to form aggregates, thus quenching some of the fluorescent emission of the aggregated dye. Under these conditions, once dye is loaded into mitochondria, a subsequent mitochondrial depolarization will result in release of dye, thus unquenching the loaded probe, and increasing fluorescent signal [49].

At the end of the experiment, hippocampal slices were incubated with TMRE, at a concentration of 100 nM, during 30 min. At the end of the incubation, slices were washed once with KRB. The fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (TECAN®), using 550 and 590 nm as wavelengths of excitation and emission, respectively.

### Behavioral Tests

#### *Tail Suspension Test (TST)*

The total duration of mice immobility induced by tail suspension was measured according to the method described by Steru et al. [50]. Briefly, mice both acoustically and visually isolated were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape and placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded during a 6-min period [51].

#### *Open-Field Behavior*

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test as described previously [52]. The apparatus consisted of a wooden box measuring 40  $\times$  60  $\times$  50 cm high. The floor of the arena was divided into 12 equal squares. The number of squares crossed with all paws (crossings) was counted in a 6-min session. The light was maintained at minimum to avoid anxiety behavior.

### Statistical Analysis

Comparisons among treatment groups and controls were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test or Student's *t* test when appropriate. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant.

### Results

#### Glutamate Reduces Hippocampal Cell Viability Due to Nitric Oxide (NO) and Reactive Oxygen Species (ROS) Production and Mitochondrial Membrane Potential ( $\psi$ ) Impairment

We have previously shown that incubation of young rat hippocampal slices with 10 mM Glu for 1 h and evaluated after 6 h of incubation in a fresh culture medium promoted a reduction of hippocampal cellular viability [42]. In order to standardize the utilization of hippocampal slices from adult mice in this protocol, slices were incubated with 10 mM Glu for 1 h and then the medium was replaced by a NIM and slices were incubated for additional 3, 4, or 6 h. Slices challenged with Glu and maintained in culture medium for 3, 4, or 6 h showed a significant decrease of cell viability when compared to control groups (Table 1). However, after 6 h of incubation, control hippocampal slices also showed a decreased cellular viability in comparison with slices incubated for 3 or 4 h. Additionally, cellular viability in slices challenged with Glu and incubated for 4 h in NIM showed a stronger statistical significance between control and glutamate groups. In this way, hippocampal slices obtained from adult mice and incubated with Glu (10 mM) for 1 h followed by 4 h of incubation in a nutritive medium solution was the protocol used in the subsequent experiments.

In order to investigate the participation of NO and ROS in the mechanism of cell damage induced by Glu in this protocol, an iNOS inhibitor—1400W (50  $\mu$ M)—and a ROS scavenger—N-acetyl-cysteine (Nac, 5 mM), were used. We succeed to demonstrate that both iNOS inhibitor and ROS scavenger were able to prevent the cell death induced by Glu in hippocampal slices (Fig. 1a, b), thus confirming that cell death induced by Glu in this protocol involves NO and ROS production.

Considering these results, we investigated the effect of Glu on NO and ROS production and also in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). As shown in Fig. 2a, at the end of the incubation period (1 h with Glu + 4 h in NIM), no alteration of NO or ROS levels was observed. On the other hand, a significant disruption on  $\Delta\Psi_m$  at the end of this period of incubation protocol was observed. As NO and ROS production are involved in the mechanism of Glu toxicity (Fig. 1), and taking into account that NO and ROS production are events that may occur rapidly and precede mitochondrial dysfunction and cell death, a time course of glutamate incubation was carried out in order to identify the production of NO and ROS. A significantly increase in NO production was observed after a period of 30 min of hippocampal slices incubation with 10 mM Glu (Fig. 2b). On the other hand, a significantly increase in ROS production was just observed in hippocampal slices that were subjected to an incubation period of 2 h with

**Table 1** Cellular viability of mice hippocampal slices submitted to glutamate toxicity

	3 h		4 h		6 h	
	Control	Glu	Control	Glu	Control	Glu
% of cellular viability	100	75.4 ± 8.19*	100	73.8 ± 2.15**	100	83.1 ± 2.95*

Hippocampal slices were incubated with 10 mM Glu for 1 h. After this period, the medium was withdrawn and replaced by a nutritive incubation medium without Glu that was maintained for 3, 4, or 6 additional hours. Cell viability was assessed by MTT reduction. The optic density (O.D.) was measured at 540 nm. Control group was considered as 100 % of cell viability. The values are expressed as means ± S.E.M. of five experiments carried out in triplicates

\* $P < 0.05$  compared to control group; \*\* $P < 0.01$  compared to control group (Student's *t* test)

Glu (Fig. 2c). Regarding disruption of  $\Delta\Psi_m$ , it was only observed after 1 h with Glu + 4 h in NIM (Fig. 2a) and not during shorter glutamate incubations (Fig. 2d).

### Repeated Atorvastatin or Fluoxetine Treatment Protects Hippocampal Slices from Glu-Induced Toxicity

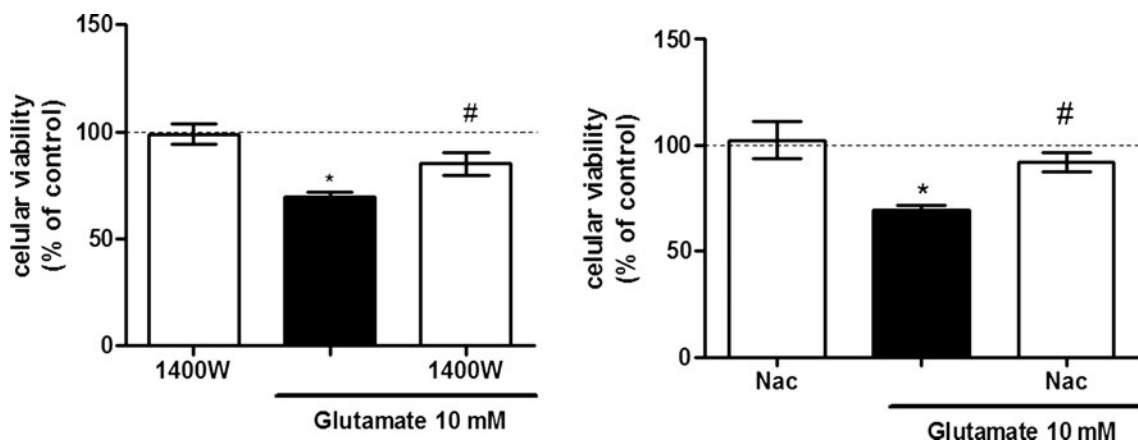
A putative neuroprotective effect of a single administration of atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) was evaluated against Glu-induced toxicity in mice hippocampal slices, as we previously demonstrated the antidepressant-like effect of this atorvastatin dose in an acute treatment [31]. Fluoxetine (10 mg/kg, p.o., acute administration), a classical antidepressant used clinically, was used for comparison. Neither atorvastatin nor fluoxetine acute treatment (1 h before mice decapitation and tissue slicing) was able to protect hippocampal slices from Glu toxicity, as shown at Fig. 3a.

In previous studies, experimental protocols using an atorvastatin repeated treatment (10 mg/kg, p.o., during seven consecutive days) have been shown an effective neuroprotective effect against different cellular insults [35–37]. Therefore, we

investigated the neuroprotective effect of atorvastatin repeated treatment against Glu toxicity using an ex vivo approach. The effect of a classical antidepressant, fluoxetine (10 mg/kg, p.o., during seven consecutive days), was also investigated in a comparative way. As depicted in Fig. 3b, atorvastatin as well as fluoxetine treatment prevented Glu-induced toxicity to hippocampal slices.

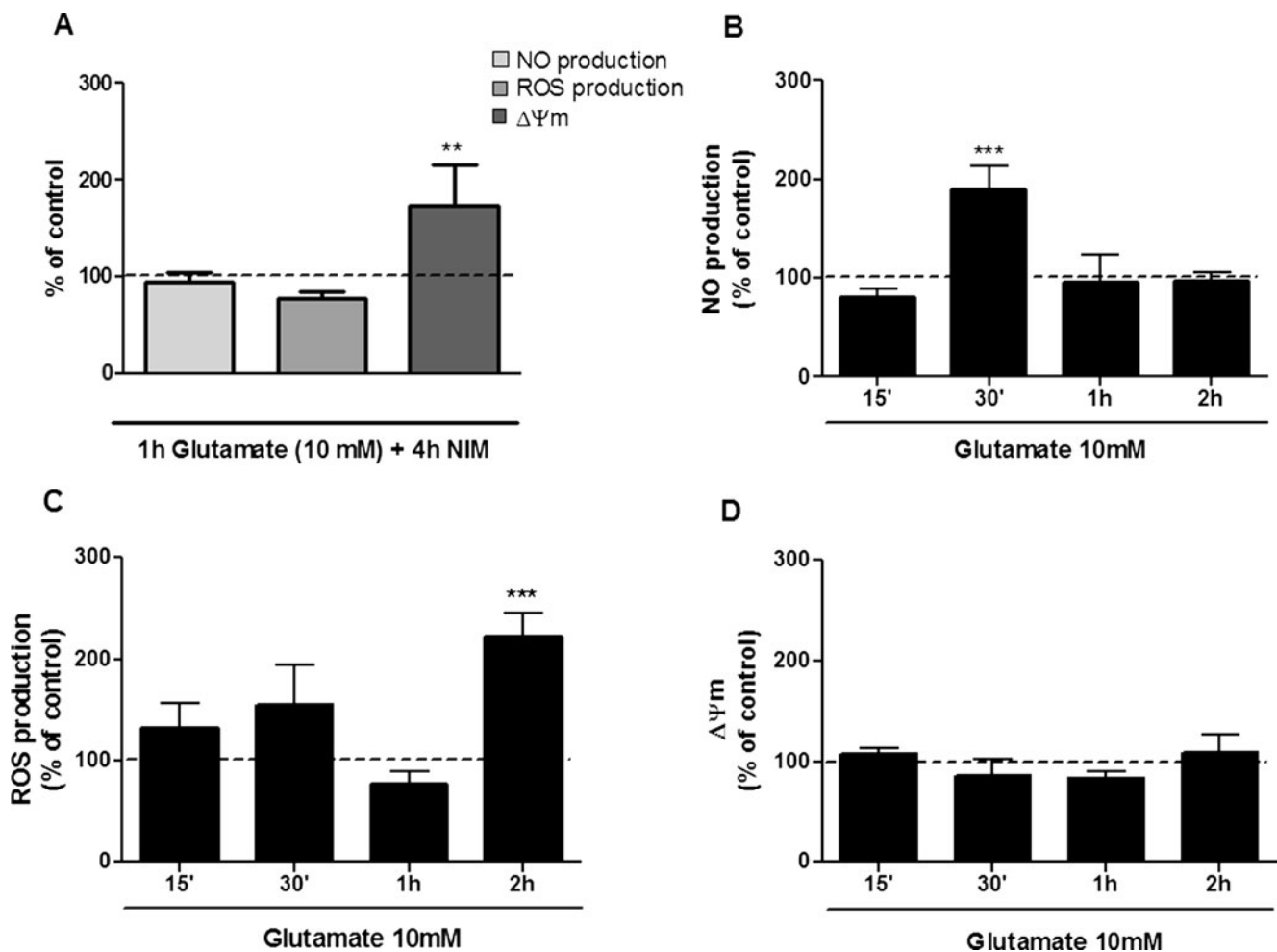
### Glu-Induced Excitatory Amino Acids Release Is Prevented by Repeated Atorvastatin or Fluoxetine Treatment

One of the mechanisms by which Glu can evoke a reduced cellular viability in this protocol is mediated by Glu-induced increase in excitatory amino acids release [42]. Considering atorvastatin repeated treatment protected from Glu-induced toxicity in hippocampal slices, we investigated whether atorvastatin may be modulating Glu transporters activity. We succeeded to demonstrate that atorvastatin, as well as fluoxetine, was able to counteract the increased release of excitatory amino acids induced by Glu toxicity (Fig. 4).



**Fig. 1** Participation of NO and ROS production in the mechanism of cellular damage induced by Glu in hippocampal slices. Hippocampal slices were pre-treated for 30 min with an iNOS inhibitor (1400W, 50  $\mu$ M) (a) or a reactive oxygen species scavenger (Nac, 5 mM) (b), and then were incubated with 10 mM Glu for 1 h followed by 4 h of

incubation in nutritive incubation medium. 1400W or NAC were maintained during Glu incubation period. Values were expressed as media ± S.E.M. of five experiments carried out in triplicates. \* $P < 0.05$  compared to control group, # $P < 0.05$  compared to glutamate-treated group (ANOVA followed by Tukey's HSD test)



**Fig. 2** Evaluation of NO and ROS production and  $\Delta\Psi_m$  impairment in hippocampal slices subjected to Glu and a time course of Glu-induced damage. Hippocampal slices were incubated with 10 mM Glu for 1 h followed by 4 h of nutritive incubation medium (NIM) (a). To measure NO production, hippocampal slices were incubated with DAF-2DA (10  $\mu$ M) before the end of experiment for 30 min. ROS production was measured by DCFDA dye (40  $\mu$ M) that was incubated for 20 min at the end of the experiment. TMRE (100 nM) used to measure  $\Delta\Psi_m$  was

incubated for 30 min at the end of the experiment. In a time course of Glu-induced damage, hippocampal slices were submitted for 15 min to 2 h with 10 mM Glu and NO and ROS production and  $\Delta\Psi_m$  were evaluated (b–d). Values were calculated considering control group as 100 % and are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of at least five experiments carried out in triplicates. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group (ANOVA followed by Tukey's HSD test)

### Atorvastatin or Fluoxetine Prevents the Increase in NO and ROS Production and $\Delta\Psi_m$ Impairment

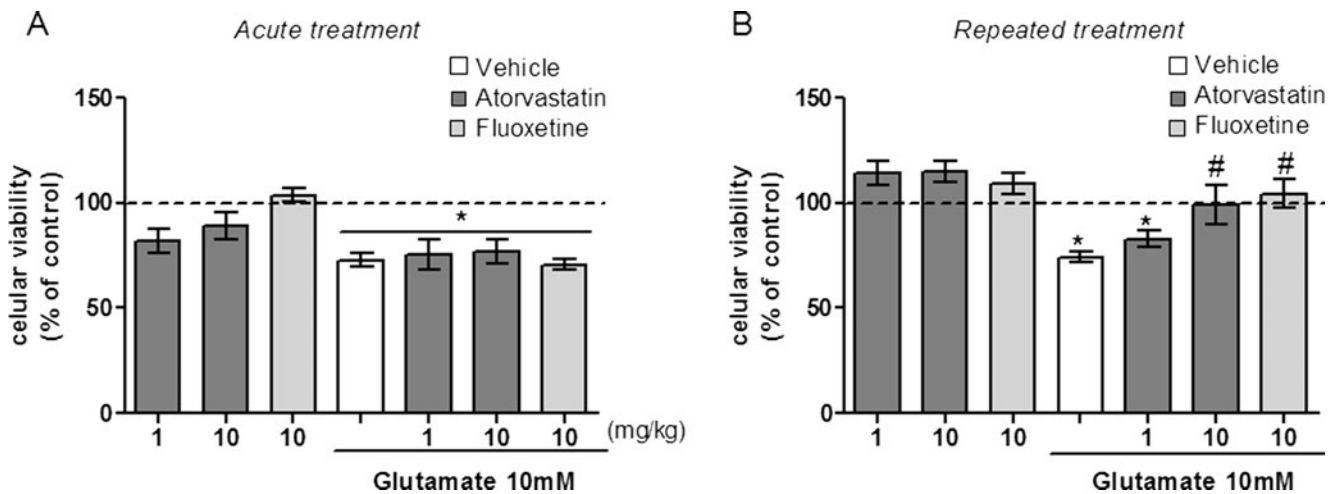
As atorvastatin or fluoxetine repeated treatment showed neuroprotective effect against Glu-induced cell death and considering that time course of NO and ROS production and  $\Delta\Psi_m$  impairment induced by Glu was determined, we investigated if these drugs could prevent these Glu-induced oxidative stress parameters.

Figure 5a shows representative photographs from hippocampal slices subjected to Glu toxicity and the quantification of fluorescence emission due to NO and ROS production and  $\Delta\Psi_m$ . Whole hippocampal slices were used for fluorescence quantification, although images from hippocampal CA1 region were obtained in order to get better quality magnifications (Fig. 5a). Atorvastatin or fluoxetine repeated treatment

protects hippocampal slices from Glu-induced NO increase, ROS production, and loss of mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  as depicted at panels b–d of Fig. 5, respectively. Therefore, atorvastatin and fluoxetine prevents oxidative damage and mitochondria dysfunction evoked by Glu toxicity in hippocampal slices, promoting neuroprotection.

### Repeated Atorvastatin or Fluoxetine Also Exerts Antidepressant-Like Effect

The antidepressant-like effect of atorvastatin or fluoxetine acute treatment was previously demonstrated [31, 32], although the neuroprotective effect against Glu toxicity was just observed after repeated treatment. In order to investigate if neuroprotective effect evoked by atorvastatin or fluoxetine repeated treatment coincides with antidepressant-like effect,



**Fig. 3** Effect of acute or repeated atorvastatin or fluoxetine treatment to mice hippocampal slices subjected to Glu toxicity *ex vivo*. Mice were treated with a single atorvastatin (0.1–10 mg/kg, *p.o.*) or fluoxetine (10 mg/kg) administration 1 h before the decapitation. Hippocampal slices were subjected to Glu (10 mM) toxicity protocol for 1 h (a). Independent groups of mice were treated with atorvastatin (1 or 10 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) once a day during seven consecutive days. After a period of 24 h from the last administration, mice were decapitated

and hippocampal slices were subjected to Glu (10 mM) toxicity for 1 h (b). After this period of Glu incubation, the medium was withdrawn and replaced by a nutritive incubation medium without glutamate that was maintained for four additional hours. Cell viability was assessed by MTT assay. Control group was considered as 100 % of cell viability. The values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of at least five experiments. \* $P < 0.05$  compared to control group; # $P < 0.05$  compared to glutamate-treated group (ANOVA followed by Tukey's test)

mice were subjected to behavioral tests. The effects of atorvastatin treatment in the tail suspension test (TST) and open-field test (OFT) are shown at Fig. 6a, b, respectively. Atorvastatin significantly reduced the immobility time on mice subjected to TST ( $F(3,36) = 7.9104$ ,  $P < 0.01$ ) when compared to control group, without any alteration in the number of crossings in the OFT ( $F(3,36) = 2.4433$ ,  $P = 0.08$ ). The

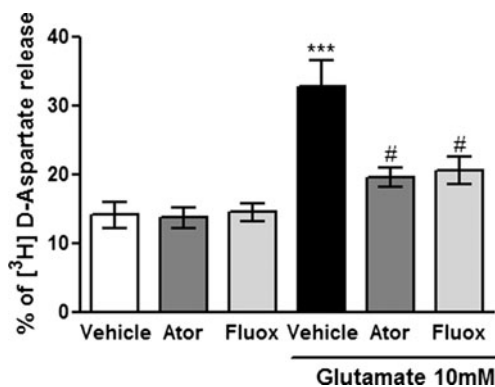
antidepressant-like effect was also demonstrated for fluoxetine treatment, as evaluated in the TST ( $F(3,36) = 6.9870$ ,  $P < 0.01$ ), without any alteration in the number of crossings in the OFT ( $F(3,36) = 3.0256$ ,  $P = 0.09$ ).

## Discussion

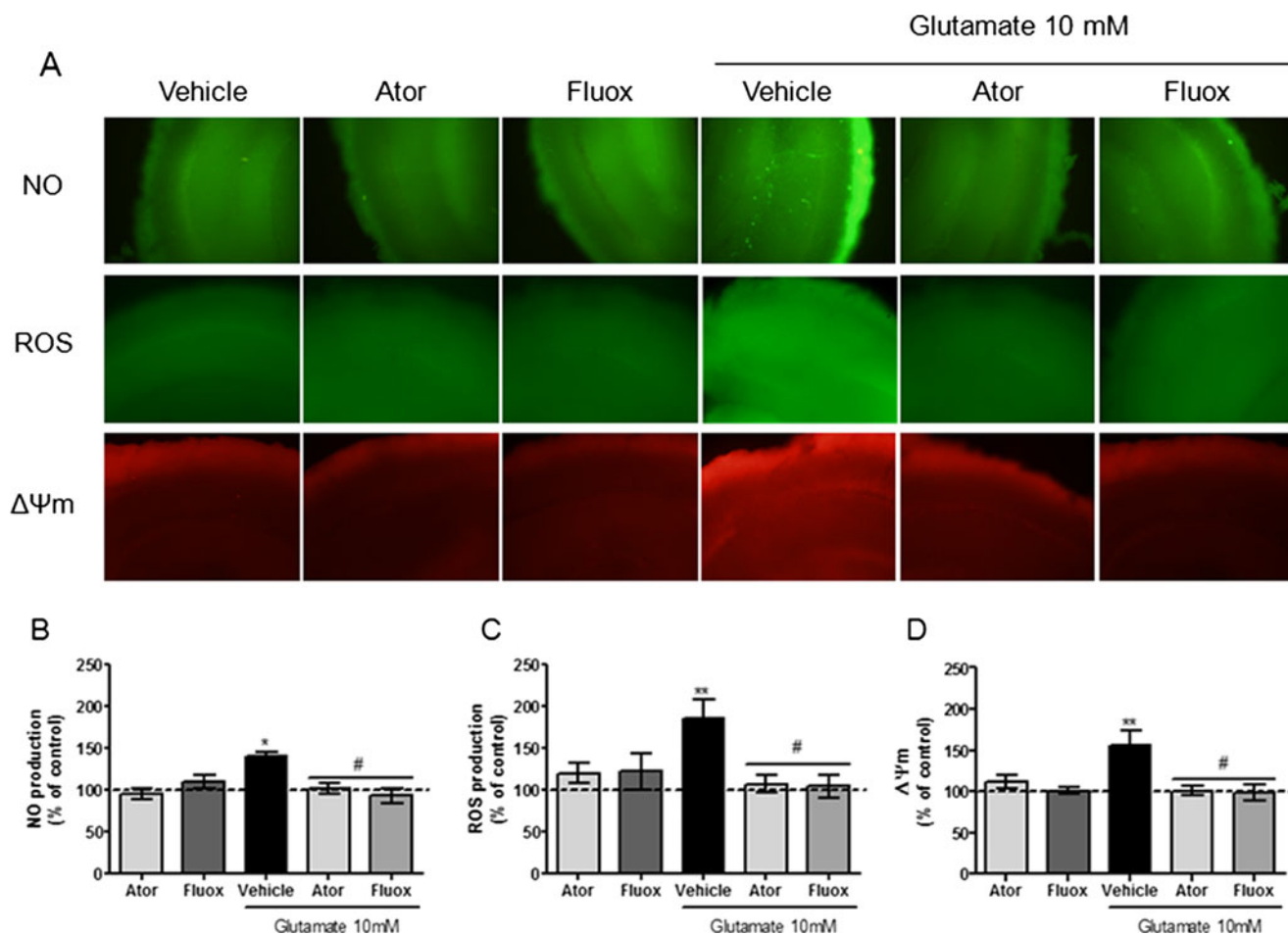
The results presented in this study show that a repeated (7-day protocol) atorvastatin or fluoxetine administration protects mice hippocampal slices from Glu-induced toxicity. Atorvastatin or fluoxetine mechanism of neuroprotection involves the prevention of Glu-induced excitatory amino acids release, NO and ROS production, and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) disruption (Fig. 7). Moreover, an antidepressant-like effect of atorvastatin or fluoxetine after the repeated treatment was also observed.

We have previously shown that an acute atorvastatin treatment exerts an antidepressant-like effect that depends on the NMDAR-L-arginine-NO pathway. The acute atorvastatin treatment also increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in hippocampus [31]. However, using this single administration protocol, we are now showing that atorvastatin does not prevent decreased cell viability induced by Glu toxicity. Similarly, we observed that an acute fluoxetine treatment, in a dose that exerted antidepressant-like effect [32], was not also effective in protecting hippocampal slices from Glu toxicity.

Atorvastatin neuroprotective effect has been demonstrated against many different insults: NMDA or Glu toxicity in cortical neurons in culture [53–55], seizures induced by

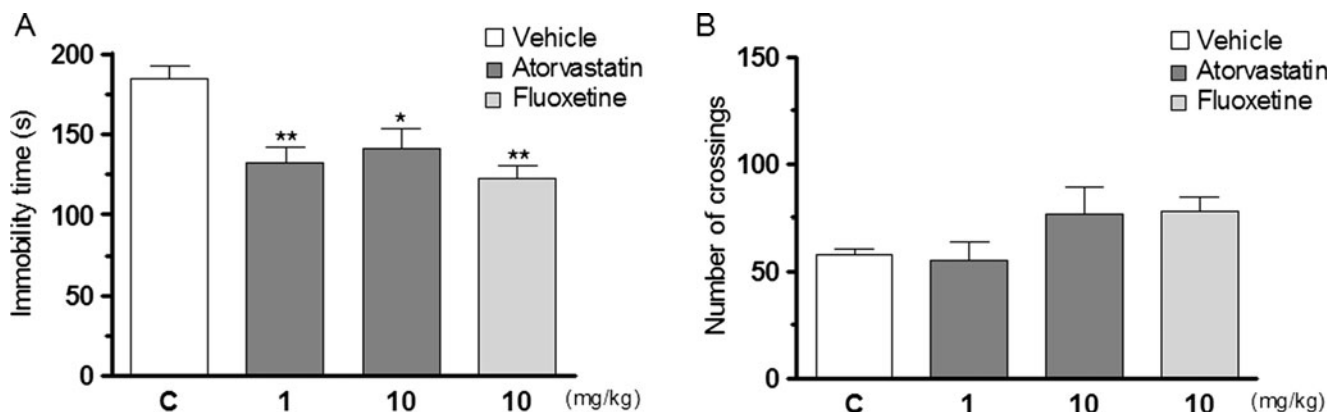


**Fig. 4** Effect of atorvastatin or fluoxetine repeated treatment on D- $[^3\text{H}]$ aspartate release induced by Glu toxicity. Mice received atorvastatin (Ator, 10 mg/kg, *p.o.*) or fluoxetine (Fluox, 10 mg/kg, *p.o.*) once a day, during seven consecutive days. On the eighth day, animals were decapitated, and the hippocampus were obtained and sliced. Slices (0.4 mm) were incubated with or without 10 mM Glu for 15 min (control group incubated with HBSS- $\text{Na}^+$  buffer) and release was evaluated after the incubation with D- $[^3\text{H}]$ aspartate, measured in the medium, as an index of excitatory amino acids release. Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 10 experiments. \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group, # $P < 0.05$  compared to glutamate-treated group (ANOVA followed by Tukey's HSD test)



**Fig. 5** Effect of atorvastatin or fluoxetine treatment on increased NO, ROS, and disrupted  $\Delta\Psi_m$  induced by Glu incubation. Mice were treated with atorvastatin (Ator, 10 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (Fluox, 10 mg/kg, p.o.), once a day during seven consecutive days. After 24 h of the last administration, animals were decapitated and hippocampal slices were obtained. Slices were subjected to 10 mM Glu during the different time courses established at Fig. 2. Representative photographs from

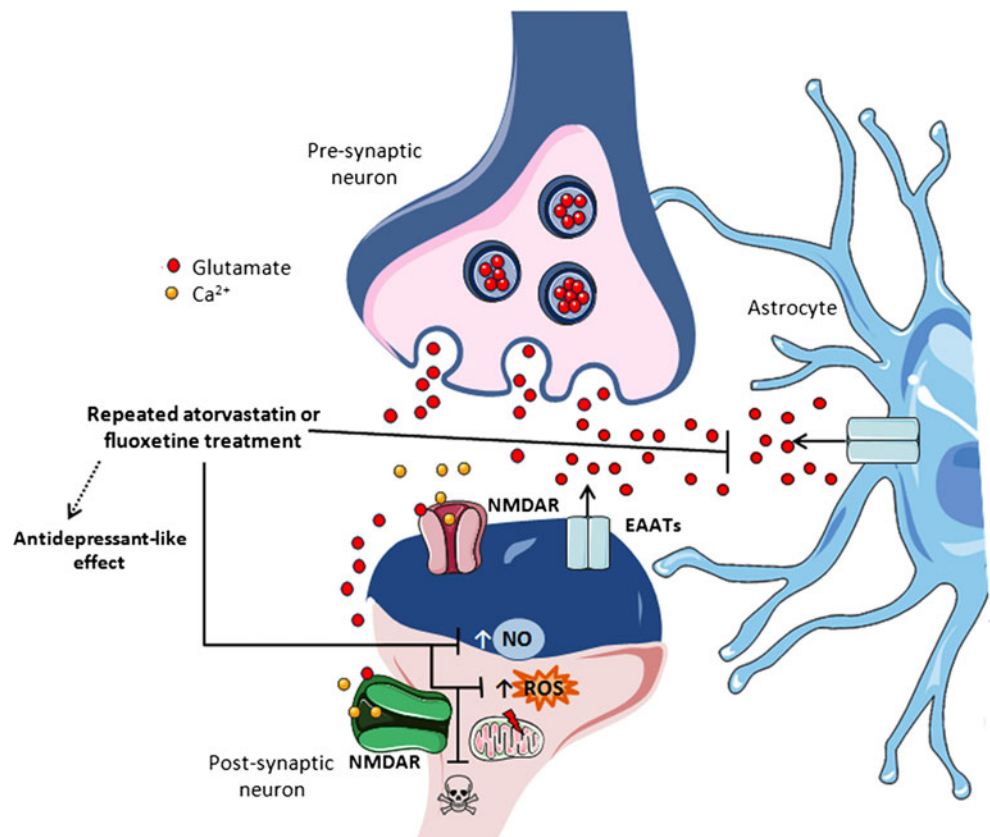
hippocampus CA1 region (a). Atorvastatin as well as fluoxetine were able to decrease fluorescence related to NO (b) or ROS (c) production and also to prevent the loss of  $\Delta\Psi_m$  induced by Glu (d). Values were calculated considering control group as 100 % and were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of at least five experiments carried out in triplicates. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group (ANOVA followed by Tukey's HSD test)



**Fig. 6** Antidepressant-like effect of repeated atorvastatin or fluoxetine treatment. Mice were treated with atorvastatin (1 or 10 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) once a day during seven consecutive days to assess behavioral parameters. After a period of 24 h from the last

administration, mice were submitted to TST (a) and to OFT (b). Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. from 10 mice per group. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  compared to control group (ANOVA followed by Tukey's HSD test)

**Fig. 7** Schematic view of effects promoted by atorvastatin or fluoxetine repeated treatment. A repeated (7-day protocol) atorvastatin or fluoxetine administration protects hippocampal slices from Glu-induced toxicity. Atorvastatin and fluoxetine shared a mechanism of protection that involves the prevention of Glu-induced excitatory amino acids release, NO and ROS production, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) disruption, and decreased cell viability. An antidepressant-like effect of atorvastatin or fluoxetine after the repeated treatment was also observed. The exact localization and subtypes of NMDAR and excitatory amino acids transporters (EAATs) modulated by atorvastatin or fluoxetine remain to be identified



intracerebroventricular administration of quinolinic acid [35], or amyloid-beta-induced toxicity in mice hippocampus [34, 36]. In these studies, a repeated treatment was necessary in order to achieve a protective effect. In agreement, in this study, atorvastatin repeated treatment was effective to protect hippocampal slices from Glu toxicity. A similar pattern of neuroprotection was observed when fluoxetine repeated treatment was applied.

Postmortem studies have shown a significant increase in tissue Glu levels in individuals with bipolar or depressive disorders [56, 57]. In other related studies, higher glutamate metabolite measures were reported in the frontal cortex of patients experiencing late life depression and post-stroke depression [58–60]. In agreement with this, there is evidence that antidepressants treatment may decrease plasma Glu levels in depressed patients [61, 62]. In this study, both treatments significantly prevented the excess of excitatory amino acids overflow induced by excitotoxicity. Atorvastatin and fluoxetine are drugs that belong to different pharmacological classes, although the effect of preventing increased excitatory amino acids overflow likely represents a component of the neuroprotective effect of the repeated treatment with both drugs. The effect of atorvastatin on glutamate uptake was previously demonstrated by our group [35, 37]; however, this is the first evidence that atorvastatin alters glutamate release, reinforcing the modulatory role of atorvastatin on glutamatergic system.

On the other hand, previous studies showed that the treatment of rats with fluoxetine, desipramine, venlafaxine, or agomelatine prevented the stress-induced enhancement of depolarization-dependent Glu release [63, 64], reinforcing the role of glutamate transport modulation also to classical antidepressants mechanism of action.

Glu promotes apoptosis in hippocampal slices, reducing cell viability by interaction with NMDA, kainate, and AMPA receptors [42]. Here we demonstrated that Glu toxicity in hippocampal slices also depends on NO production. This result is in accordance with a previous study from our laboratory that showed increased iNOS expression followed by Glu exposure [65]. In a time-course evaluation, we observed that incubation of slices with Glu for 30 min significantly increase NO levels. This increase was probably transient, considering the small NO half-life time [8], but sufficient to contribute to cell damage. There are several evidences pointing for the involvement of augmented NO levels in depression and cell death [66]. Moreover, decreasing or blocking the synthesis of NO in brain can induce antidepressant-like and neuroprotective effects [67–69]. Accordingly, we previously demonstrated that acute atorvastatin administration to mice decreased NO levels as measured by nitrite/nitrate content, an effect that was correlated with antidepressant-like activity [31]. We are now showing that atorvastatin repeated

treatment prevented Glu-induced NO increase, demonstrating that NO modulation is involved in the mechanism of neuroprotection. Fluoxetine mechanism of neuroprotection may also involve NO modulation, as it down-regulated nNOS expression in the hippocampus [70] and decreased striatal NO production followed by NMDA injection [71]. Similar to atorvastatin, in this study we showed fluoxetine also decreased NO production evoked by Glu toxicity in hippocampal slices. “Bun-Hee et al. 2006” is cited in text but not given in the reference list. Please provide details in the list or delete the citation from the text. Please delete the cited reference

Once produced, NO can interact with superoxide anions leading to overproduction of peroxynitrite, a powerful oxidant molecule [72]. Both NO and peroxynitrite have been shown to inhibit mitochondrial respiratory complex IV, where NO competes with O<sub>2</sub> to bind at the enzymatic active site, thus changing the  $\Delta\Psi_m$  and increasing the generation of ROS and consequently contributing to excitotoxic damage [17]. The participation of ROS in Glu toxicity was demonstrated by the use of a ROS scavenger. Also, in a time-course evaluation, we demonstrated that increased ROS production is significantly observed after 2 h of Glu exposure. The loss of  $\Delta\Psi_m$  was observed after 1 h of Glu exposure followed by 4 h incubation in a nutritive incubation medium.

Disruption of  $\Delta\Psi_m$  followed by Glu exposure was demonstrated previously in other studies that used different protocols [17, 20, 73, 74]. In this study, using a quenching TMRE protocol, we demonstrated that Glu toxicity promoted a mitochondrial depolarization that increased fluorescence signal. Excessive ROS production and consequently  $\Delta\Psi_m$  impairment can be counterbalanced in order to diminish damaging reactions [75, 76]. It has been previously shown that atorvastatin attenuated ROS production and cerebral damage in vitro and in vivo models of cerebral ischemia [37, 77]. In a similar way, fluoxetine treatment reversed the oxidative damage induced by chronic stress in brain mice [78] or induced by lipopolysaccharide [79]. However, to the best of our knowledge, it is the first report showing atorvastatin or fluoxetine prevent disruption of the mitochondrial membrane potential induced by Glu toxicity.

Several neuropathological processes are associated with excitotoxicity and oxidative stress that lead to neuronal damage and death [80]. Accordingly, in the last few years, numerous lines of evidence have accumulated in favor of a role for Glu in the development [81, 82] as well as in the treatment of depression [83, 84]. In line with this, neuroprotective drugs that counteract oxidative stress and Glu toxicity should be considered for depression treatment. In this study, we succeeded to demonstrate that both atorvastatin or fluoxetine repeated treatment prevented Glu-induced NO and ROS production and alteration of  $\Delta\Psi_m$ .

The neuroprotective effect evoked by atorvastatin and fluoxetine repeated treatment coincides with an antidepressant-like effect exerted by both drugs. At this point, two important

observations should be highlighted: (i) acute atorvastatin or fluoxetine treatment exerted antidepressant-like effect, but it did not evoke neuroprotective effect; (ii) antidepressant-like effect is still observed and a neuroprotective effect against Glu toxicity is achieved when a repeated treatment was applied. In the face of similarities in the mechanism of neuroprotection exerted by atorvastatin and fluoxetine treatment against Glu toxicity, it is feasible that these drugs share a similar mechanism of action.

Fluoxetine has been proposed as an antidepressant and neuroprotective agent that acts as an NMDAR antagonist, by interacting with the NMDAR GluN2B subunit [85]. Parallel to this fact, atorvastatin presented neuroprotective effect against quinolinic acid-induced damage, a GluN2B subunit agonist [35]. Recently, it was demonstrated atorvastatin protects cortical cells from cell death induced by focal global ischemia via interaction with GluN2B [86]. Therefore, we speculate that fluoxetine and atorvastatin may exert neuroprotective effect against Glu toxicity by interaction with GluN2B subunit of NMDAR. However, information on the exact site of interaction of atorvastatin is lacking and must be investigated.

In conclusion, acute administration of atorvastatin or fluoxetine presents antidepressant-like effect but it is not neuroprotective. However, a repeated protocol of atorvastatin or fluoxetine administration presents an antidepressant-like and neuroprotective effects. Atorvastatin or fluoxetine prevented the oxidative damage and the impairment of mitochondrial potential evoked by Glu toxicity in hippocampal slices, features that might be associated in depressive, as well as, in neurodegenerative conditions.

**Acknowledgments** Research supported by grants from the Brazilian funding agencies CNPq (IBN-Net # 01.06.0842-00 and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection), CAPES (CAPES-PVE 052/2012), and FAPESC (NENASC Project) to C.I. Tasca. F.K. Ludka scholarship is sponsored by FAPESC.

#### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest Disclosure** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Kugaya A, Sanacora G (2005) Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 10:808–819
2. Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623–634
3. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405–414
4. Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH, Baum ML, Bibb JA et al (2009) Extrasynaptic NMDA receptors



- couple preferentially to excitotoxicity via calpain mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29:9330–9343
5. Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 60:525–542
  6. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2011) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 100:656–664
  7. Vizi ES, Mike A (2006) Nonsynaptic receptors for GABA and glutamate. *Curr Top Med Chem* 6:941–948
  8. Splugues JV (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079–1095
  9. Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (2006) Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects, 7th edn. Elsevier Academic Press, Burlington
  10. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci* 88:6368–6371
  11. Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675–683
  12. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30:463–488
  13. Brown GC, Borutaite V (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1658:44–49
  14. Bal-Price A, Brown GC (2001) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21:6480–6491
  15. Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8:929–947
  16. Szatkowski M, Attwell D (1994) Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 17:359–365
  17. Nicholls DG, Ward MW (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23:166–174
  18. Padmaja S, Huie RE (1993) The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2):539–544
  19. Wang Y, Zheng-hong Q (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15:1382–1402
  20. Abramov AY, Duchen MR (2008) Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1777:953–964
  21. Keelan J, Vergun O, Duchen MR (1999) Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons. *J Physiol Lond* 3:797–813
  22. Michel TM, Pulschen D, Thome J (2012) The role of oxidative stress in depressive disorders. *Curr Pharm Des* 18:5890–5899
  23. Lee S, Jeong J, Kwak Y, Park SK (2010) Depression research: where are we now? *Mol Brain* 3(8):1–10
  24. Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658
  25. Lee BH, Lee SW, Yoon D, Lee HJ, Yang JC, Shim SH, Kim DH, Seung-Ho R et al (2006) Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology* 53:127–132
  26. Haynes LE, Barber D, Mitchell IJ (2004) Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res* 1026:157–167
  27. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP (2005) The discovery of fluoxetine hydrochloride Prozac. *Nat Rev* 4:764–775
  28. Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63–77
  29. Vizi ES, Kisfali M, Lorincz T (2013) Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain Res Bull* 93:32–38
  30. Drago A, Crisafulli C, Sidoti A, Serretti A (2011) The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes. *Prog Neurobiol* 94:418–460
  31. Ludka FK, Zomkowski ADE, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni ALB, Rodrigues ALS, Tasca CI (2013) Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine/nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:400–412
  32. Ludka FK, Constantino LC, Kuminek G, Binder LB, Zomkowski ADE, Cunha MP, Dal-Cim T, Rodrigues ALS et al (2014) Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 122:253–260
  33. Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR et al (2013) Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1513:103–116
  34. Martins WC, dos Santos VV, dos Santos AA, Vandresen-Filho S, Dal-Cim TA, de Oliveira KA, Mendes-de-Aguiar CB, Farina M et al (2015) Atorvastatin prevents cognitive deficits induced by intracerebroventricular amyloid- $\beta$ 1-40 administration in mice: involvement of glutamatergic and antioxidant systems. *Neurotox Res* 28(1):32–42
  35. Piermartiri TCB, Vandresen Filho S, Herculano BA, Martins WC, Dal'Agnolo D, Stroech E, Carqueja CL, Boeck CR et al (2009) 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
  36. Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, De Bem AF, Prediger RDS et al (2010) Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta$ 1-40 administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 226:274–284
  37. Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, Herculano BA, de Bem AF, Tasca CI (2013) Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Neurochem Int* 62(7):948–955
  38. Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89–118
  39. Ghanizadeh A, Hedayati A (2013) Augmentation of fluoxetine with lovastatin for treating major depressive disorder, a randomized double-blind placebo controlled-clinical trial. *Depress Anxiety* 30:1084–1088
  40. Cunha MP, Budni J, Ludka FK, Pazini FL, Rosa JC, Oliveira A, Lopes MW, Tasca CI, Leal RB, Rodrigues ALS (2015). Involvement of PI3K/Akt signaling pathway and its downstream intracellular targets in the antidepressant-like effect of creatine. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-015-9192-4
  41. Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI (2013) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *J Neurochem* 126:437–450
  42. Molz S, Decker H, Dal-Cim T, Cremonese C, Cordova FM, Leal RB, Tasca CI (2008) Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res* 33:27–36

43. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69:581–593
44. Molz S, Dal-Cim T, Tasca CI (2009) Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. *Neurochem Int* 55:703–709
45. Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Aalves LB, Porciuncula LO, Emanuelli T, Souza DO (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40:621–627
46. Hernanz R, Briones AM, Martin A, Beltran AE, Tejerina T, Salas M, Alonso MJ (2008) Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. *J Hypertens* 26:1944–1954
47. Martín-de-Saavedra MD, del Barrio L, Cañas N, Egea J, Lorrio S, Montell E, Vergés J, García AG et al (2011) Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NFκB and iNOS. *Neurochem Int* 58(6):676–683
48. Egea J, Rosa AO, Cuadrado A, Garcia AG, Lopez MG (2007) Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* 102:1842–1852
49. Scaduto RC, Grotyohann LW (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophys J* 76:469–477
50. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85:367–370
51. Zeni AL, Zomkowski AD, Dal-Cim T, Maraschin M, Rodrigues AL, Tasca CI (2011) Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: investigation of involvement of L-arginine–nitric oxide cyclic guanosine monophosphate pathway. *J Ethnopharmacol* 137:864–874
52. Zomkowski ADE, Engel D, Gabilan NH, Rodrigues ALS (2010) Involvement of NMDA receptors and L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropharmacol* 20:793–801
53. Bosel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms Djoufack PC, Megow D, Dimagl U, Hortnagl H et al (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate induced excitotoxicity in primary cortical neurons. *J Neurochem* 92:1386–1398
54. Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Dávalos A, Gasull T (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 39:1269–1275
55. Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 35:11104–11111
56. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 25:1310–1316
57. Lan MJ, McLoughlin GA, Griffin JL, Tsang TM, Huang JT, Yuan P, Manji H, Holmes E et al (2009) Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 14:269–279
58. Binesh N, Kumar A, Hwang S, Mintz J, Thomas MA (2004) Neurochemistry of late-life major depression: a pilot two-dimensional MR spectroscopic study. *J Magn Reson Imaging* 20:1039–1045
59. Glodzik-Sobanska L, Slowik A, McHugh P, Sobiecka B, Kozub J, Rich KE, Urbanik A, Szczudlik A (2006) Single voxel proton magnetic resonance spectroscopy in post-stroke depression. *Psychiatry Res* 148:111–120
60. Wang CC, Wang SJ (2009) Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Synapse* 63:745–751
61. Kucukbrahimoglu E, Saygin MZ, Caliskan M, Kaplan OK, Unsal C, Goren MZ (2009) The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. *Eur J Clin Pharmacol* 65:571–577
62. Maes M, Verkerk R, Vandoolaeghe E, Lin A, Scharpe S (1998) Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsiveness. *Acta Psychiatr Scand* 97:302–308
63. Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A et al (2010) Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One* 5:8566
64. Popoli M, Musazzi L, Perego C, Mallei A, Villa A, Milanese M, Treccani G, Tardito D et al (2010) Acute behavioural stress affects the readily releasable pool of vesicles in prefrontal/frontal cortex. *Soc Neurosci Abstr*, 667.7
65. Molz S, Dal-Cim T, Budni J et al (2011) Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci Res* 89:1400–1408
66. Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M (2001) Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord* 63:221–224
67. Dhir A, Kulkarni SK (2011) Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 24:125–131
68. Joca SR, Guimarães FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185:298–305
69. Kollegger H, McBean GJ, Tipton KF (1993) Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 45:260–264
70. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, Zhou QG, Wu DL et al (2010) Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci* 30:2433–2441
71. Crespi F (2010) The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces striatal in vivo levels of voltammetric nitric oxide (NO): a feature of its antidepressant activity? *Neurosci Lett* 470:95–99
72. Moncada S, Bolanos JP (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 97:1676–1689
73. Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tramontina AC, Wartchow KM, Tagliari B, Souza DO, Wyse ATS, Gonçalves CA (2014) Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol in Vitro* 28(4):544–551
74. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16:6125–6133
75. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6–18
76. Popa-Wagner A; Mitran S; Sivanesan S; Chang E; Buga AM. (2013) ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxidative Med Cell Longevity*. Article ID 963520, 14 pages doi:10.1155/2013/963520
77. Hong H, Zeng JS, Kreulen DL, Kaufman DI, Chen AF (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2210–H2215

78. Moretti M, Colla A, de Oliveira BG, dos Santos DB, Budni J, de Freitas AE, Farina M, Severo Rodrigues AL (2012) Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res* 43(3):331–340
79. Chung ES, Chung YC, Bok E, Baik HH, Park ES, Park JY, Yoon SH, Jin BK (2010) Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. *Brain Res* 1363:143–150
80. Gliyazova NS, Huh EY, Ibeanu GC (2013) A novel phenoxy thiophene sulphonamide molecule protects against glutamate evoked oxidative injury in a neuronal cell model. *BMC Neurosci* 14:93
81. Racagni G, Popoli M (2008) Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 10:385–400
82. Paul IA, Skolnick P (2003) Glutamate depression: clinical and pre-clinical studies. *Ann N Y Acad Sci* 1003:250–272
83. Duman RS, Li N, Liu RJ, Duric V, Aghajanian G (2012) Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62:35–41
84. Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G et al (2011) Glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69:754–761
85. Kiss JP, Szasz BK, Fodor L, Mike A, Lenkey N, Kurkó D, Nagy J, Vizi S (2012) GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochem Int* 60:170–176
86. Gutierrez-Vargas JA, Muñoz-Manco JI, Garcia-Segura LM, Cardona-Gómez GP (2014) GluN2B N-Methyl-D-aspartic acid receptor subunit mediates atorvastatin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 92:1529–1548



## 6 DISCUSSÃO

Há cerca de duas décadas os efeitos pleiotrópicos das estatinas foram relatados e deste então têm sido extensivamente estudados (Birnbaum e Ye, 2012; Citraro et al., 2014; Harrison e Hashton, 1994; Liao e Laufs, 2005). Em contrapartida os primeiros achados da associação entre estatinas e transtornos do humor fizeram-se a partir da ideia de que fármacos hipocolesterolemiantes poderiam desencadear sintomas depressivos (Duits e Bos, 1993; Kassler-Taub; Woodward; Markowitz, 1993; Lechleitner et al., 1992; Zureik; Courbon; Ducimetière, 1996). Entretanto, ensaios clínicos demonstraram não existir diferenças significativas no desenvolvimento de depressão considerando o tratamento com estatinas ou placebo (Muldoon et al., 2000; Stewart et al., 2000; Wardle et al., 1996). Contrariando os ensaios clínicos anteriores, estudos apontaram para a melhora do bem-estar psicológico (Young-Xu et al., 2003), bem como redução do risco de desenvolvimento de depressão em usuários de estatinas (Ormiston et al., 2003; Wirleitner; Sperner-Unterweger; Fuchs, 2004; Yang; Jick; Jick, 2003; Young-Xu et al., 2003;) impulsionando novas pesquisas acerca do entendimento do efeito dessa classe de fármacos frente aos transtornos do humor.

O efeito tipo-antidepressivo da estatina lipossolúvel, atorvastatina, em testes preditivos para avaliação do potencial efeito antidepressivo de substâncias como o teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado, foi demonstrado pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa. A participação do receptor NMDA e da via de sinalização L-arginina-NO-GMPc no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos foi também evidenciada (Ludka et al., 2013). Apesar da importância do sistema glutamatérgico no entendimento e na busca de novos fármacos antidepressivos, sabe-se que a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico possibilita a melhora dos sintomas clínicos dos pacientes com depressão de forma que grande parte dos antidepressivos disponíveis na clínica atua modulando este sistema neurotransmissor (Artigas, 2012; Wong et al., 2005). Além disso, a modulação da função do receptor NMDA em decorrência da administração crônica de antidepressivos de diferentes classes (Nowak et al., 1993; Paul et al., 1994; Skolnick, 1999), bem como a modulação dos transportadores de 5-HT pelo sistema glutamatérgico (Nowak et al., 1998; Skolnick et al., 1996) já foram demonstradas, evidenciando a relação entre os sistemas glutamatérgico e serotoninérgico.

Neste contexto, o anexo A do capítulo I desta tese traz os resultados referentes à participação do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. Demonstramos que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina depende da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica bem como da participação dos receptores dos subtipos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/C</sub>. Além disso, demonstramos o efeito tipo-antidepressivo desencadeado pela coadministração de atorvastatina com antidepressivos ISRS.

A diminuição da concentração de 5-HT e seus metabólitos no fluido cérebro-espinal de pacientes com depressão parece estar correlacionado com um aumento no risco de suicídio (Asberg et al., 1976), e em concordância o tratamento dos pacientes com antidepressivos clássicos rapidamente aumenta as concentrações de 5-HT (Millan, 2004). Neste estudo, demonstramos que a disponibilidade de 5-HT no encéfalo dos camundongos é crucial para que a atorvastatina seja capaz de desencadear efeito tipo-antidepressivo, uma vez que a depleção de 5-HT através da administração de um inibidor da TH aboliu este efeito. A concentração de 5-HT é também crucial para o efeito tipo-antidepressivo da cetamina – um antagonista NMDA- (Gigliucci et al., 2013) e da fluoxetina – um ISRS - (Rodrigues et al., 2002). Apesar da dependência da concentração de 5-HT para o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, a administração de atorvastatina *per se* não é capaz de alterar o conteúdo total de 5-HT no hipocampo ou córtex pré-frontal de camundongos. Resultado semelhante foi observado no hipocampo e córtex de camundongos tratados com fluoxetina. Estes resultados vão ao encontro dos relatos de Wang e colaboradores (2012) que usando protocolo semelhante demonstraram que a administração aguda de fluoxetina não é capaz de alterar o conteúdo de 5-HT, a qual somente aumenta quando o tratamento crônico com antidepressivos ISRS é realizado (Amargós-Bosch et al., 2005; Kreiss and Lucki, 1995). Vale ressaltar que o protocolo experimental que utilizamos não permite avaliar a dinâmica do sistema, nem tão pouco, os níveis de 5-HT na sinapse, e apesar do conteúdo não ser alterado pelo tratamento com atorvastatina ou fluoxetina, a disponibilidade de 5-HT é crucial para desencadear o efeito tipo-antidepressivo de ambos os fármacos (Capítulo I, Anexo A – Figura 2; Rodrigues et al., 2002).

Dentre os 7 subtipos de receptores de 5-HT sabe-se que o mecanismo de ação de diferentes classes de drogas antidepressivas, como os TCA, os iMAO e os ISRS modulam receptores dos subtipos 5-HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>-2A</sub> e 5HT<sub>-2C</sub> (Artigas, 2012; Hensler, 2006). A participação desses subtipos de receptores no efeito tipo-antidepressivo da

atorvastatina foi demonstrada através da utilização dos antagonistas seletivos de receptores do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100635) e 5HT<sub>2A/C</sub> (cetanserina) que aboliram o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.

Os antidepressivos ISRS estão entre os fármacos mais prescritos nos consultórios psiquiátricos (Kroeze; Zhou; Homberg, 2012), uma vez que apresentam maior tolerabilidade e menores índices de descontinuação do tratamento do que é observado com o uso de antidepressivos TCA (Anderson, 2000). Estes fármacos atuam por bloquear o transporte de 5-HT no neurônio pré-sináptico, impedindo a recaptação do neurotransmissor, aumentando desta forma, sua concentração na fenda sináptica (Ceglia et al., 2004).

No presente estudo foi demonstrado o efeito tipo-antidepressivo proveniente do tratamento combinado com atorvastatina e ISRS (fluoxetina, paroxetina ou sertralina). Estudo prévio reportado na literatura, demonstrou que a administração de lovastatina a ratos por 30 dias deixou os animais mais sensíveis à dose sub efetiva de fluoxetina, quando estes foram avaliados no TNF (Renshaw et al., 2009). O efeito somatório da lovastatina e fluoxetina foi reforçado por um ensaio clínico que apontou que os *scores* para depressão diminuíram de forma mais significativa em pacientes fazendo uso dos dois medicamentos em relação aos pacientes em uso de fluoxetina (Ghanizadeh e Hedayati, 2013), sem que nenhum efeito colateral significativo fosse relatado. Vale ressaltar que o uso concomitante de estatinas e ISRS pode ser prática comum, uma vez que tanto a hipercolesterolemia como a depressão são doenças de alta incidência, especialmente na população idosa (Grundy et al., 2004; Jacobi et al., 2004; Mathers e Loncar, 2006). É importante considerar que nenhuma evidência direta acerca do mecanismo pelo qual as estatinas potencializam o efeito antidepressivo foi relatada.

A atividade de alguns sistemas neurotransmissores como os sistemas glutamatérgico e serotonérgico, envolvidos no desenvolvimento de doenças psiquiátricas, parece ser modulada pelo sistema adenosinérgico (Machado-Vieira et al., 2002). Evidências de estudos em animais apontam para uma possível disfunção da sinalização do sistema adenosinérgico, mediado basicamente pelos receptores de adenosina dos subtipos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> na patofisiologia dos transtornos do humor (Zlomuzica et al., 2013), especialmente depressão (Gomes et al., 2011; El Yacoubi et al., 2003) e ansiedade (Lara et al., 2006).

Por outro lado, estratégias farmacológicas para o tratamento dos transtornos do humor, parecem modular o sistema adenosinérgico. Estudo recente demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo da cetamina,

um antidepressivo de última geração com efeito rápido e sustentado, que age como antagonista de receptores NMDA depende da modulação do sistema adenosinérgico. Por outro lado, a modulação do referido sistema não é requerida para o efeito do antidepressivo clássico, fluoxetina (Cunha et al., 2015a). Ainda, os agonistas sintéticos de receptores de adenosina dos subtipos  $A_1$  e  $A_{2A}$ , CHA e DPMA respectivamente, apresentam efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao TNF (Kaster et al., 2004). Em outro estudo, o agonista de receptor de adenosina do subtipo  $A_1$ , CCPA também reduziu o tempo de imobilidade de camundongos no TNF, efeito este que foi sustentado por 36h (Hines et al., 2013).

O capítulo 1 desta tese descreve os resultados referentes à participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. A participação da adenosina, bem como dos receptores do subtipo  $A_1$  no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina foram evidenciados.

Inicialmente a participação do sistema adenosinérgico no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC foi demonstrada pela utilização de adenosina (um agonista não seletivo de receptores de adenosina) e cafeína (um antagonista não seletivo de receptores de adenosina). Demonstrou-se um efeito combinado proveniente da administração de adenosina e atorvastatina em camundongos submetidos ao TSC. Um efeito semelhante foi observado com a administração de doses subativas de atorvastatina e cafeína no TSC. A cafeína é um antagonista de receptores de adenosina com semelhante seletividade *in vitro* para receptores dos subtipos  $A_1$  e  $A_{2A}$  (Fredholm et al., 1999) de forma que a utilização de antagonistas seletivos fez-se necessária para investigar o envolvimento de cada subtipo de receptor no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina.

A participação dos receptores  $A_1$  de adenosina no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina foi demonstrada, uma vez que o antagonista seletivo de receptor  $A_1$  de adenosina preveniu o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC. Reforçando este resultado, o agonista de receptor  $A_1$  de adenosina, CHA, em dose subativa, combinado com uma dose subativa de atorvastatina, desencadeou efeito tipo-antidepressivo.

A participação do sistema adenosinérgico nos efeitos pleiotrópicos da atorvastatina, bem como de outras estatinas já havia sido reportado em modelos de isquemia do miocárdio, porém, a nosso conhecimento este é o primeiro relato da participação deste sistema no efeito tipo-antidepressivo de uma estatina. Um estudo prévio



demonstrou que a administração de atorvastatina em camundongos, leva a um aumento significativo da fosforilação de proteínas relacionadas com a sobrevivência celular como a Akt, ERK e eNOS no miocárdio. Este aumento de fosforilação é abolido parcialmente pela utilização de antagonistas  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  de adenosina (Merla et al., 2007). Além disso, o efeito protetor da atorvastatina frente aos danos causados por um protocolo de isquemia e reperfusão em ratos é potencializado pelo tratamento combinado com café contendo cafeína (Ye et al., 2008).

Em concordância, um estudo clínico, utilizando 60 voluntários saudáveis, demonstrou que o tratamento com rosuvastatina aumenta a formação extracelular de adenosina e este efeito parece estar relacionado com a proteção frente aos danos causados por isquemia e reperfusão (Meijer et al., 2009). Posteriormente, foi demonstrado que este efeito parece ser mediado pelo aumento da expressão da enzima 5-ecto-nucleotidase, que defosforila a adenosina-5'-monofosfato (AMP) extracelular dando origem à adenosina (Meijer et al., 2010).

O envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  de adenosina na depressão e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos não está bem esclarecida (Cunha et al., 2015a). Dados da literatura já apontaram que o antagonismo de receptores  $A_{2A}$  de adenosina (El Yacoubi et al., 2001, 2003, Yamada et al., 2014) desencadeiam efeito tipo-antidepressivo no TNF, bem como outros trabalhos apontam para a ativação dos receptores  $A_{2A}$  como mecanismo envolvido no efeito tipo-antidepressivo de diversas drogas (Kaster et al., 2004, 2013; Lobato et al., 2008). No presente estudo, demonstrou-se que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina independe da modulação dos receptores  $A_{2A}$ , uma vez que o pré-tratamento com o antagonista ZM 241385 não preveniu o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC. Para excluir a participação dos receptores  $A_{2A}$  no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC, experimentos posteriores utilizando um agonista desses receptores devem ser realizados.

A participação do transportador de adenosina no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina foi avaliada através da utilização do dipiridamol, um inibidor de transporte de adenosina. O dipiridamol inibe a captação de adenosina, aumentando desta forma a biodisponibilidade da mesma na fenda sináptica (Kulkarni e Mehta, 1985). Neste trabalho demonstrou-se que o tratamento dos camundongos com doses subativas de dipiridamol e atorvastatina não foi capaz de desencadear um efeito tipo-antidepressivo combinado, de forma que os níveis de adenosina na fenda sináptica parecem não interferir com o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina neste teste. Trabalhos anteriores reportaram que o

aumento dos níveis de adenosina na fenda sináptica é crucial para o efeito tipo-antidepressivo da cetamina e da creatina (Cunha et al., 2015a), bem como parece mediar o efeito antidepressivo do citalopram em pacientes com depressão (Blardi et al., 2005).

Neste ponto, é interessante ressaltar que três sistemas neurotransmissores pareceram estar envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. O sistema glutamatérgico (Ludka et al., 2013), o serotoninérgico (Anexo A, Capítulo I) e o adenosinérgico (Capítulo I), via modulação dos receptores NMDA; 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/C</sub> e A<sub>1</sub> respectivamente. Sabe-se que a modulação de receptores é apenas o primeiro evento associado ao mecanismo de ação de fármacos, e que vias de sinalização intracelular são ativadas ou inibidas em resposta a modulação inicial de receptores.

Estudos já demonstraram que vários sistemas de transdução de sinal, incluindo a via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  e mTOR estão alteradas no encéfalo de pacientes com depressão. Esta parece ser uma importante via de sinalização a ser modulada por fármacos antidepressivos (Kitagishi et al., 2012; Yoon e Kim, 2009) e também uma via associada à neuroproteção (Kitagishi et al., 2012). Além disso, a via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  e mTOR está envolvida no efeito neuroprotetor das estatinas tanto *in vitro* (Chen et al., 2003; Dolga et al., 2008) como *in vivo* (Dolga et al., 2009; Hernández-Romero et al., 2008; Kretz et al., 2006; Lee et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2007). Estudos apontam ainda para a importância desta via de sinalização no efeito tipo-antidepressivo de várias substâncias moduladoras do sistema glutamatérgico, como o ácido ascórbico (Moretti et al., 2014), a creatina (Cunha et al., 2015b), a guanosina (Bettio et al., 2012), o zinco (Manosso et al., 2015) e a cetamina (Li et al., 2010). A fosforilação da mTOR é rapidamente aumentada pelo tratamento com cetamina, desencadeando o aumento da expressão de proteínas sinápticas, mecanismo este responsável pelo efeito antidepressivo sustentado deste fármaco (Li et al., 2010). Vale ressaltar que apesar da cetamina ser um fármaco que atua inicialmente por antagonizar o receptor NMDA (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006), seu efeito antidepressivo é dependente da disponibilidade de 5-HT (Gigliucci et al., 2013) e da modulação dos receptores de adenosina (Cunha et al., 2015a).

Os resultados referentes ao efeito da atorvastatina frente à via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  e mTOR estão apresentados no Anexo B do Capítulo I. Foi demonstrado utilizando o TSC que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina depende da ativação de PI3K/Akt e mTOR, bem como da inibição de GSK-3 $\beta$ . Corroborando os resultados

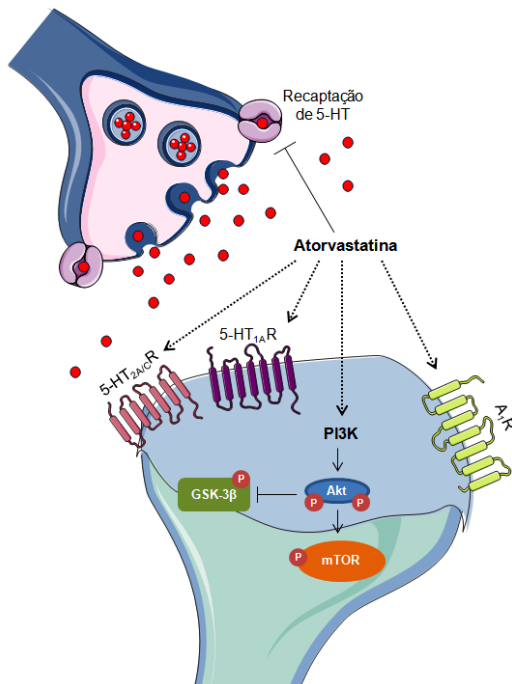
comportamentais, um aumento da fosforilação hipocampal das proteínas Akt, GSK-3 $\beta$  e mTOR foi evidenciado.

Estudos prévios demonstraram que o tratamento com atorvastatina ou com simvastatina (durante 7 dias consecutivos) aumentou a fosforilação de GSK-3 $\beta$  promovendo recuperação tecidual pós hemorragia intracerebral experimental. O crescimento de neuritos em neurônios corticais promovido pelo tratamento com atorvastatina também foi dependente da sinalização de Akt/GSK3- $\beta$ . No mesmo estudo, a atorvastatina estimulou a fosforilação de 4E-BP1 e p70S6K, substratos da mTOR, sugerindo o envolvimento desta proteína no efeito da atorvastatina (Yang et al., 2012).

Nenhuma evidência prévia, apontou a participação de mTOR no efeito tipo-antidepressivo das estatinas. Porém a atorvastatina parece modular esta via de sinalização para proteger células progenitoras mesenquimais da autofagia induzida por hipóxia (Zhang et al., 2012), além de sensibilizar células a drogas citostáticas (Roudier, Mistafa, Stenius, 2006) demonstrando a participação de mTOR nos efeitos biológicos desencadeados por atorvastatina.

Como exposto anteriormente, um estudo prévio demonstrou que a administração de atorvastatina em camundongos, leva a um aumento significativo da fosforilação da Akt, no miocárdio. Neste estudo a fosforilação da Akt foi parcialmente abolida pela utilização de antagonistas A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> de adenosina (Merla et al., 2007). Nesta tese, com os resultados obtidos não se pode estabelecer a existência de dependência entre a modulação da via Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR por atorvastatina com a modulação dos receptores envolvidos no efeito tipo-antidepressivo deste fármaco. Além disso, é interessante discutir que, apesar da atorvastatina compartilhar mecanismos com a fluoxetina (Capítulo I, Anexo A) e com a cetamina (Ludka et al., 2013, Capítulo I, Anexo B), com relação a modulação do sistema adenosinérgico, parece não haver mecanismo comum. Enquanto para o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina os receptores de adenosina do subtipo A<sub>1</sub>, mas não A<sub>2A</sub> são importantes, para o efeito antidepressivo da cetamina ambos são cruciais, e dispensáveis ao efeito antidepressivo da fluoxetina (Cunha et al., 2015a).

A figura 1 sumariza os mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina e apresentados no capítulo I desta tese.



**Figura 1: Esquema representativo dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração aguda de atorvastatina a camundongos.** A atorvastatina atua modulando receptores A<sub>1</sub> de adenosina, bem como antagoniza receptores de 5-HT dos subtipos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A/C</sub>. A participação da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3β/mTOR no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina também foi demonstrada. A atorvastatina ativa PI3K/Akt e mTOR e inibe GSK-3β.

O TSC utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina é um dos testes mais amplamente empregados na pesquisa básica para caracterizar a eficácia dos compostos com ação antidepressiva (Cryan; Valentino; Lucki, 2005) em camundongos, bem como é uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas respostas (Bourin et al., 2005; Steru et al., 1985). Apesar de classicamente, fármacos antidepressivos diminuam o tempo de imobilidade desses animais neste teste (Steru et al., 1985) sugerindo diminuição do desespero comportamental, ele apresenta validade preditiva e importância inicial, devendo ser seguido de um modelo animal de depressão com validade de constructo e/ou face (Abelaira; Réus; Quevedo, 2013).

Os modelos animais de depressão disponíveis apresentam a limitação de que em animais não se pode mensurar sentimentos que são mensuráveis nos seres humanos como tristeza, culpa, pensamentos suicidas, extremamente importantes para o diagnóstico da doença e classificação da severidade segundo o DSM-V. Desta forma, sugere-se que a validade dos modelos animais de depressão seja diretamente proporcional a capacidade de: i) mimetizar as manifestações comportamentais semelhantes aos sintomas observados nos pacientes com depressão e passíveis de mensuração em animais, como o comportamento anedônico; e/ou ii) mimetizar as alterações patofisiológicas dos pacientes com depressão, como alterações em neurotransmissores ou atrofia hipocampal (Abelaira; Réus; Quevedo, 2013).

Enquanto a depressão é a mais prevalente e ameaçadora forma de doença mental, a DA é um transtorno neurodegenerativo que acomete cerca de 37 milhões de pessoas em todo mundo, fazendo cerca de 4,6 milhões de novas vítimas a cada ano (Smith, 2006). A DA não tem cura, e considerando o aumento da expectativa de vida da população, tende a ser uma doença ainda mais prevalente nos próximos anos. Os sintomas neuropsiquiátricos em pacientes com DA tem sido reconhecidos como sérios problemas associados tanto a um prognóstico ruim como a baixa efetividade do tratamento farmacológico (Zhao et al., 2016). A depressão é o transtorno psiquiátrico mais frequentemente observado em pacientes com DA, podendo ainda ser um fator de risco para o desenvolvimento da mesma (Wuwongse et al., 2013).

Um achado patológico da DA é a presença de placas amiloides decorrentes da produção excessiva e acúmulo de peptídeos A $\beta$ . Já foi demonstrado que o acúmulo de peptídeos A $\beta$  é maior no soro de pacientes com depressão quando comparado aos controles saudáveis (Namekawa et al., 2013). Em concordância, estudos utilizando roedores demonstraram que a administração i.c.v. de peptídeos A $\beta$ , pode desencadear comportamento depressivo e alterações neuropatológicas nesses animais (Colaianna et al., 2010; Ledo et al., 2012; dos Santos et al., 2013).

Neste contexto a administração i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> a camundongos foi utilizada como um protocolo para desenvolver um modelo animal de validade de constructo e face que permitiu a investigação do efeito proveniente do tratamento com atorvastatina frente a achados comuns a duas patologias altamente prevalentes: DA e depressão (dos Santos et al., 2013). Modelar sintomas comuns a mais de uma doença pode melhorar a especificidade bem como a utilidade do modelo animal.

O capítulo II, Anexo A desta tese, traz os resultados referentes ao efeito do tratamento de camundongos com atorvastatina frente às alterações comportamentais e bioquímicas desencadeadas pelo protocolo utilizado. Demonstramos que o tratamento com atorvastatina reverteu o comportamento tipo-depressivo e tipo-anedônico, bem como a morte celular hipocampal desencadeada pela infusão do peptídeo. Esse efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina é dependente do aumento da clivagem de pró-BDNF a mBDNF, ocasionado pelo acréscimo da síntese das proteases tPA e p11.

O aumento no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, induzido pela infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  foi revertido pelo tratamento dos animais com atorvastatina, demonstrando que além do efeito preditivo exposto no capítulo I (Anexo A) desta tese, a atorvastatina apresenta efeito antidepressivo frente a um modelo animal de depressão. Estudo prévio do nosso laboratório já havia demonstrado o efeito da atorvastatina em prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração intranasal de 1-metil-1,4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a ratos (Castro et al., 2013), sugerindo que a atorvastatina tanto é capaz de prevenir como reverter o comportamento tipo-depressivo induzido por diferentes neurotoxinas. Vale considerar que a administração repetida de atorvastatina *per se* já é capaz de desencadear efeito tipo-antidepressivo no TSC semelhante ao efeito observado com uma única administração do fármaco (Capítulo I, Anexo A), mostrando que o mecanismo de resposta não é dessensibilizado pelo tratamento repetido como acontece com outras substâncias (Kaster, 2008).

Um dos mais importantes e característicos sintomas da depressão é a anedonia. É caracterizada pela diminuição da habilidade em vivenciar experiências prazerosas, e é critério necessário para o diagnóstico de depressão, segundo o DSM-V. Em animais, a anedonia é um comportamento facilmente avaliado, considerando sua relação com o sistema de recompensa (Gorwood, 2008). Neste estudo nós demonstramos que a atorvastatina reverteu o comportamento anedônico induzido pela administração de  $A\beta_{1-40}$  em camundongos. A nosso conhecimento é a primeira vez que o efeito de uma estatina frente a esse comportamento animal é demonstrado. Interessante é o fato que resultados preliminares de ensaio clínico demonstraram a relação existente entre anedonia e alteração da função cognitiva (McIntyre et al., 2015). Além de ser um achado bastante comum em outras doenças neuropsiquiátricas, a anedonia parece sinalizar a presença de lesão neuronal e aumentar a vulnerabilidade a DA (Donovan et al., 2015).

Achado comum em pacientes com depressão ou DA é a atrofia hipocampal decorrente da morte celular dos neurônios desta região (Carrillo-Mora et al., 2014; Duman and Monteggia, 2006; Sahay and Hen, 2008), que pode ser correlacionada com a perda de memória e a severidade da depressão (Banar et al., 2007; De Felice et al., 2009). Desta forma, como já citado, agentes neuroprotetores podem ser estratégias plausíveis para o tratamento tanto de doenças neurodegenerativas como de doenças neuropsiquiátricas. Nós demonstramos que a atorvastatina reverteu o dano celular hipocampal induzido por  $A\beta_{1-40}$  corroborando estudo prévio do nosso laboratório (Piermartiri et al., 2010) e mostrando que a atorvastatina desencadeia tanto efeito tipo-antidepressivo como neuroprotetor.

O mecanismo de dano celular promovido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo não está bem esclarecido. Apesar disso, estudos já demonstraram aumento do estresse oxidativo (dos Santos et al., 2013) e da neuroinflamação, bem como diminuição da captação de glutamato e da expressão dos transportadores deste neurotransmissor associados ao aumento da morte celular (Piermartiri et al., 2010). Resultados prévios do nosso grupo têm apontado a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina (Ludka et al., 2013; Piermartiri et al., 2010), o que nos encorajou a investigar o papel desta estatina frente as alterações no transporte de glutamato induzido por  $A\beta_{1-40}$ . A infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  diminuiu a captação de glutamato nas fatias de hipocampo, o que muito provavelmente está associado ao aumento dos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica, um evento comumente associado à excitotoxicidade e morte celular (Danbolt et al., 2001). Sugere-se que esta alteração da captação de glutamato pode estar relacionada à diminuição da expressão dos transportadores de glutamato GLAST e GLT-1 (Piermartiri et al., 2010), ou ainda a ativação de receptores NMDA extrassinápticos causando subsequente diminuição da captação de glutamato e neurotoxicidade (Donovan et al., 2015). A alteração da captação de glutamato induzida por  $A\beta_{1-40}$  não foi acompanhada de alteração na atividade da GS, a enzima responsável pela conversão do glutamato em glutamina. A atividade desta enzima já foi associada à neuroproteção (Justin et al., 2014), porém, a atividade da mesma não foi alterada pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  ou pelo tratamento com atorvastatina.

Evidências experimentais indicam o efeito protetor do BDNF frente à neurotoxicidade promovida por peptídeos  $A\beta$  (Nagahara et al., 2009; Poon et al., 2009). Já foi demonstrado que aglomerados de  $A\beta$  são responsáveis pela degeneração sináptica (Lacor et al., 2007) e interferem

na consolidação da memória, desregulando a potenciação de longo prazo (Walsh et al., 2002). A toxicidade do peptídeo A $\beta$  parece estar relacionada à diminuição dos níveis hipocámpais e corticais de BDNF, áreas estas responsáveis pelo processamento da memória e emoção (Garzon; Yu; Fahnstock, 2002; Peng et al., 2005). Neste cenário, a hipótese neurotrófica da depressão tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (Duman, 2002; Duman e Monteggia, 2006). Esta hipótese é baseada na ideia de que pacientes com depressão apresentam baixos níveis séricos de BDNF em relação a controles saudáveis e que os baixos níveis desta neurotrofina poderiam desencadear os sintomas depressivos clássicos, como a anedonia (Lang et al., 2006). Esta ideia é reforçada pelo fato de que usualmente o tratamento com antidepressivos clássicos normaliza os níveis de BDNF (Gonul et al., 2005).

BDNF é uma proteína expressa em todo o encéfalo com níveis elevados nos neurônios do hipocampo, sendo que estímulos como a neurotransmissão glutamatérgica e a despolarização de membrana afetam sua expressão (Aid et al., 2007; Balaratnasingam and Jaca, 2012). Assim como muitas proteínas secretadas, o BDNF é sintetizado como pró-BDNF, uma proteína precursora, que é clivada proteoliticamente para formar a proteína madura, mBDNF (Lee et al., 2001). É bem descrito que enquanto pró-BDNF atua em p75NTR para promover morte celular, mBDNF atua no receptor TrkB para promover sobrevivência celular, de forma que a clivagem ou não desta proteína determina o efeito a ser desencadeado (Lu, 2003).

A conversão proteolítica do pró-BDNF é usualmente facilitada pelo ativador de plasminogênio tecidual (tPA), que converte plasminogênio em plasmina, que por sua vez, cliva o pro-BDNF (Lee et al., 2001; Peng et al., 2005). tPA e plasminogênio, podem ainda interagir com o tetrâmero de anexina II (AII<sub>t</sub>), aumentando a ativação da plasmina (Kim e Hajjar, 2002). AII<sub>t</sub> é um heterotetrâmero composto de duas subunidades p36 de anexina II e duas subunidades p11 (Kassam et al., 1998). p11 também chamada S100A10, é um membro da família das proteínas S100 encontrada no citosol ou na superfície interna da membrana plasmática. Está também presente na superfície extracelular onde se liga a tPA (Svenningsson and Greengard, 2007). Já foi demonstrado que a subunidade p11 é crítica para interação molecular entre AII<sub>t</sub> e plasminogênio e estimula um aumento de 300 vezes na ativação do plasminogênio mediada por tPA (Kassam et al., 1998).

Nós demonstramos que neste protocolo o tratamento com atorvastatina não alterou significativamente a expressão hipocámpal de



pro-BDNF ou mBDNF, bem como não alterou a expressão de BDNF, mas aumentou significativamente a razão mBDNF/pró-BDNF, sugerindo aumento da clivagem de pró-BDNF por atorvastatina. Evidenciamos que o tratamento dos camundongos com atorvastatina promove aumento hipocampal de RNAm para tPA e p11, duas diferentes proteases relacionadas a clivagem de pró-BDNF em mBDNF. Desta forma, sugere-se que a atorvastatina promove aumento da razão entre mBDNF/pró-BDNF, uma vez que aumenta a clivagem de pró-BDNF mediada por tPA e p11.

Foi previamente demonstrado que tanto a atorvastatina, bem como a fluvastatina podem inibir o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), o principal inibidor do sistema tPA-plasmina, responsável pela clivagem de pró-BDNF dependente de plasmina (Lopez et al., 2000; Mussoni et al., 2000). Em 2007, Tsai sugeriu que as estatinas poderiam inibir PAI-1 e conseqüentemente facilitar a atividade do sistema tPA-plasmina, aumentando os níveis de mBDNF e portanto poderiam ser consideradas estratégias farmacológicas para o tratamento de depressão, como demonstrado no Capítulo II, Anexo A e previamente por nosso grupo (Ludka et al., 2013).

A habilidade em modular os níveis ou a expressão de BDNF parece ser um mecanismo comum às estatinas. Estudos já demonstraram que tanto a atorvastatina como a simvastatina aumentam a expressão de BDNF na zona da penumbra de estriado de ratos submetidos a protocolo de hemorragia intracerebral (Yang et al., 2012). Estudo recente também demonstrou que o tratamento prolongado com lovastatina (2 mg/kg, durante 4 semanas consecutivas) levou a um aumento da expressão hipocampal de BDNF em ratos submetidos a um protocolo de hipóxia-hipercapnia (Huo et al., 2014).

A infusão de  $A\beta_{1-40}$  não alterou a razão entre mBDNF e pró-BDNF. Por outro lado, uma diminuição no aumento da razão mBDNF/pró-BDNF foi observada nos grupos tratados com  $A\beta_{1-40}$  e atorvastatina, em comparação com o grupo tratado somente com atorvastatina. É possível que este aumento na razão mBDNF/pró-BDNF possa estar contribuindo para a sinalização evocada por atorvastatina a fim de proteger os camundongos do comportamento tipo-depressivo e da morte celular hipocampal induzida por  $A\beta_{1-40}$ .

Neste ponto, torna-se interessante determinar a existência de correlação entre os resultados obtidos. Foi possível demonstrar que existe correlação positiva entre o tempo de imobilidade dos animais no TSC e a incorporação de iodeto de propídio (utilizado como um indicador de alteração de permeabilidade de membrana, sugerindo morte celular) nas

fatias de hipocampo dos camundongos submetidos à injeção de  $A\beta_{1-40}$ . Esta relação vai de encontro à hipótese de que a morte celular em algumas regiões encefálicas responsáveis pelo processamento e integração da emoção como o hipocampo, está ligada ao aparecimento de depressão. Além disso, demonstramos uma correlação negativa entre mBDNF/pró-BDNF e o tempo de imobilidade, bem como entre mBDNF/pró-BDNF e a incorporação de iodeto de propídio. Esta correlação sugere que enquanto a razão mBDNF/pró-BDNF aumenta, uma diminuição no tempo de imobilidade e morte celular hipocampal é observada. Desta forma, o BDNF parece ser uma proteína chave para i) as alterações comportamentais induzida por  $A\beta_{1-40}$  e ii) para o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina.

O papel do BDNF como uma neurotrofina responsável por mediar tanto o efeito antidepressivo como as alterações na neuroplasticidade induzida por antidepressivos clássicos e cetamina já foi descrito na literatura. Antidepressivos clássicos e cetamina apresentam diferenças no tempo necessário para que a proteína BDNF seja modulada após tratamento farmacológico. Enquanto uma única administração de cetamina, um antagonista de receptores NMDA, aumenta os níveis hipocampais de BDNF, o tratamento agudo com imipramina, um antidepressivo TCA, não altera os níveis desta neurotrofina (Garcia et al., 2008). O aumento dos níveis hipocampais de BDNF em ratos tratados com fluoxetina, um ISRS, somente é observado após período de tratamento igual a 21 dias consecutivos (Casarotto et al., 2015). Neste cenário, o efeito da atorvastatina frente aos níveis hipocampais de BDNF pode ser comparado ao efeito da cetamina. Foi demonstrado previamente pelo nosso grupo, que o tratamento agudo com atorvastatina é capaz de aumentar os níveis hipocampais de BDNF (Ludka et al., 2013) que continuam sendo elevados pelo tratamento repetido com esta estatina (Capítulo II, Anexo A). Estudos sugerem que o aumento hipocampal de BDNF em resposta ao tratamento agudo com cetamina parece ser um dos mecanismos necessários ao efeito antidepressivo rápido desencadeado por este fármaco (Iadarola et al., 2015). Apesar de nenhum experimento apresentado ao longo desta tese permitir estabelecer a rapidez do efeito promovido por atorvastatina o aumento rápido de BDNF é um mecanismo compartilhado entre atorvastatina e cetamina.

A descoberta de que antagonistas de receptores de NMDA desencadeiam efeito antidepressivo rápido e sustentado, trouxe nova esperança na busca de antidepressivos realmente efetivos no tratamento da depressão. Enquanto em outras áreas da medicina significativas

reduções na morbidade e mortalidade têm sido observadas, o mesmo não vem ocorrendo com doenças mentais e suicídio. Além disso, a inserção de novas drogas em neuropsiquiatria corresponde apenas a 5% de todos os fármacos aprovados em 2012 (Mullard, 2013), mostrando o pequeno avanço neste cenário.

Sugere-se que as doenças neuropsiquiátricas em geral estão relacionadas a eventos neurotóxicos que culminam em alterações morfológicas e funcionais, que tanto podem iniciar o processo patológico, bem como impactar a progressão da doença (Sanches et al., 2008). Esses achados nos permitem inferir que utilizando agentes que previnam a ativação de vias neurotóxicas, será possível reduzir a incidência bem como o impacto das doenças mentais. Agentes neuroprotetores têm recebido considerável atenção para o tratamento de transtornos neurológicos principalmente relacionados às doenças de Parkinson e Alzheimer bem como isquemia cerebral. Muitas vias associadas à neuroproteção podem apresentar aplicabilidade frente a diferentes doenças neurodegenerativas, e consequentemente agentes que regulam alterações mediadas por eventos tóxicos podem ser úteis mediante diferentes doenças.

Muitas doenças neurodegenerativas, como a depressão, compartilham eventos como a hiperfunção dos receptores NMDA, a produção de NO, a disfunção do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), a produção exacerbada de ROS como mecanismo patogênico comum (Lee et al., 2010), de forma que a excitotoxicidade e o estresse oxidativo estão diretamente relacionados a diversos processos neuropatológicos (Gliayzova et al., 2013). Em concordância, nos últimos anos numerosas evidências têm sido acumuladas a favor do papel central da transmissão glutamatérgica, no desenvolvimento (Racagni e Popoli, 2008) e no tratamento da depressão (Duman et al., 2012; Li et al., 2010).

Desta forma, para o tratamento da depressão consideramos interessante a identificação de drogas que além de ocasionar melhora nos sintomas depressivos apresentem mecanismo neuroprotetor frente à toxicidade induzida por glutamato. Considerando que mesmo, a fluoxetina, o antidepressivo ISRS mais prescrito no mundo todo para o tratamento da depressão (Wong; Perry; Bymaster, 2005), tem como mecanismo de ação final a modulação do sistema glutamatérgico (Duman, 2014; Sanacora et al., 2012), nossa hipótese é reforçada.

O Capítulo II, Anexo B desta tese, apresenta os resultados referentes ao efeito neuroprotetor da atorvastatina, bem como da fluoxetina frente à toxicidade induzida por glutamato. Os resultados

demonstram que tanto o tratamento com atorvastatina como com fluoxetina protege as fatias de hipocampo de camundongos uma vez que previne a liberação de aminoácidos excitatórios induzida por glutamato, a produção de NO e ROS, bem como as alterações no  $\Delta\Psi_m$  promovendo efeito neuroprotetor frente ao protocolo de indução de excitotoxicidade.

Apesar do nosso grupo de pesquisa ter demonstrado que a administração aguda de atorvastatina promove efeito tipo-antidepressivo que depende da participação do receptor NMDA e da via L-arginina-NO-GMPc bem como acarreta aumento dos níveis hipocampais de BDNF (Ludka et al., 2013), demonstramos que este tratamento não preveniu fatias hipocampais de camundongos da toxicidade induzida por glutamato. Resultado semelhante foi observado quando o tratamento agudo com fluoxetina, em dose capaz de desencadear efeito tipo-antidepressivo (Capítulo I, Anexo A) foi realizado.

O efeito neuroprotetor da atorvastatina frente a diferentes insultos como: toxicidade de NMDA e glutamato em culturas de neurônios corticais (Bösel et al., 2005; Ponce et al., 2008; Zacco et al., 2003); convulsões induzidas por ácido quinolínico (Piermartiri et al., 2009), e toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$  já foi demonstrado (Martins et al., 2015; Piermartiri et al., 2010). Nestes estudos o tratamento repetido com esta estatina se fez necessário para atingir o efeito protetor. Corroborando estudos anteriores, demonstramos que o tratamento repetido com atorvastatina foi efetivo em prevenir as fatias hipocampais da toxicidade glutamatérgica. Um padrão similar de neuroproteção foi observado quando o tratamento repetido com fluoxetina foi realizado. Este achado parece dissociar os mecanismos responsáveis pelo efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor proveniente da administração aguda desta estatina.

Um aumento significativo nos níveis teciduais de glutamato em indivíduos com depressão maior ou depressão bipolar já foi demonstrado em estudo com pacientes *post-mortem* (Hashimoto; Sawa; Iyo, 2007; Lan et al., 2009). Sugere-se que tratamento farmacológico com antidepressivos pode diminuir a concentração plasmática de glutamato dos pacientes (Kucukibrahimoglu et al., 2009; Maes et al., 1998). Neste sentido, demonstramos que ambos os tratamentos prevenem significativamente a liberação de aminoácidos excitatórios induzida pela toxicidade por glutamato. Atorvastatina e fluoxetina são fármacos que pertencem a classes farmacológicas diferentes, porém o efeito em prevenir a liberação dos aminoácidos excitatórios, representa

um componente associado ao efeito neuroprotetor de ambos os fármacos.

O efeito da atorvastatina frente ao transporte de glutamato já havia sido reportada por nosso grupo em estudos prévios (Piermartiri et al., 2009; Vandresen-Filho et al., 2013), porém esta é a primeira evidência de que a atorvastatina pode diminuir a liberação de glutamato, reforçando o papel modulador da atorvastatina frente ao sistema glutamatérgico. Antidepressivos como fluoxetina, desipramina, venlafaxina e agomelatina preveniram o aumento da liberação de glutamato dependente de despolarização e induzida por estresse (Milanese et al., 2013; Musazzi et al., 2010), demonstrando assim, a importância da modulação do transporte de glutamato também no efeito dos antidepressivos clássicos.

O glutamato promove apoptose nas fatias hipocâmpais, via interação com receptores NMDA, kainato e AMPA (Molz et al., 2008). Nós demonstramos que a toxicidade induzida por glutamato foi prevenida por um inibidor de iNOS, sugerindo que a toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo também depende da produção de NO. Este resultado está de acordo com estudo prévio do nosso grupo que demonstrou aumento da expressão de iNOS após exposição ao glutamato (Molz et al., 2011). Em avaliação considerando o curso do tempo, nós observamos que a incubação das fatias hipocâmpais com glutamato por 30 minutos leva a um aumento significativo nos níveis de NO. Este aumento é provavelmente transiente considerando o tempo de meia-vida de NO (Esplugues et al., 2002) porém suficiente para contribuir com o dano celular. Existem várias evidências apontando para o aumento dos níveis de NO na depressão e morte celular (Lee et al., 2006; Suzuki et al., 2001). Sabe-se que diminuindo ou bloqueando a síntese encefálica de NO, efeitos antidepressivos e neuroprotetores podem ser desencadeados (Dhir e Kulkarni, 2007; Joca e Guimarães, 2006). Em estudo prévio evidenciamos que a administração aguda de atorvastatina a camundongos diminui os níveis de NO medidos como conteúdo de nitrito/nitrato, evento associado ao efeito tipo-antidepressivo (Ludka et al., 2013). Uma vez que o tratamento repetido com atorvastatina previne o aumento de NO induzido por glutamato, este evento está também associado à neuroproteção. O mecanismo de neuroproteção da fluoxetina, parece também envolver a modulação de NO, uma vez que este fármaco diminui a expressão de nNOS no hipocampo (Zhang et al., 2010) e a produção promovida por injeção estriatal de NMDA (Crespi, 2010). De maneira similar a atorvastatina,

demonstramos que a fluoxetina também promove diminuição da produção de NO induzida por glutamato em fatias hipocampais.

Uma vez produzido o NO pode interagir com ânions superóxido gerando peroxinitrito uma molécula oxidante muito potente (Moncada e Bolaños, 2006). NO e peroxinitrito podem inibir o complex IV da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que NO compete com o oxigênio para se ligar ao sítio ativo da enzima, alterando desta forma o  $\Delta\Psi_m$ , gerando aumento da produção de ROS o que contribui para o dano excitotóxico (Nicholls e Ward, 2000).

A participação de ROS na toxicidade glutamatérgica foi demonstrada pelo uso de um sequestrador de ROS, que impediu a perda de viabilidade celular das fatias hipocampais incubadas com glutamato. Demonstramos que, corroborando o achado anterior, a produção aumentada de ROS é significativamente observada depois de 2h de exposição ao glutamato. A perda do  $\Delta\Psi_m$  foi demonstrada após 1h de exposição ao glutamato, seguida de 4h de incubação em meio de cultura. O rompimento do  $\Delta\Psi_m$  ocasionado pela exposição ao glutamato foi demonstrado previamente por estudos que utilizaram diferentes protocolos (Abramov e Duchon, 2008; Nicholls e Ward, 2000; Quincozes-Santos et al., 2014; Schindler et al., 1996).

O aumento da produção de ROS e o consequente rompimento do  $\Delta\Psi_m$  podem ser contrabalanceados a fim de diminuir os eventos danosos (Mehta et al., 2013; Popa-Wagner et al., 2013). Já foi demonstrado que a atorvastatina pode atenuar a produção de ROS em modelos *in vitro* de privação de glicose e oxigênio (Vandresen-Filho et al., 2013) e nos modelos *in vivo* de isquemia cerebral (Hong et al., 2006). De maneira similar, o tratamento com fluoxetina reverteu o dano oxidativo no encéfalo de camundongos induzido por estresse crônico (Moretti et al., 2012) ou por lipopolissacarídeo (Chung et al., 2010). Contudo, este é o primeiro relato de que atorvastatina e fluoxetina previnem o rompimento do  $\Delta\Psi_m$  induzido por glutamato.

O efeito neuroprotetor proveniente do tratamento repetido com atorvastatina ou fluoxetina coincide com o efeito tipo-antidepressivo desencadeado por ambos os fármacos. Neste ponto é importante ressaltar duas observações: i) o tratamento agudo com atorvastatina ou fluoxetina promove efeito tipo-antidepressivo, mas não efeito neuroprotetor; ii) o efeito tipo-antidepressivo é mantido com o tratamento repetido de ambos os fármacos e o efeito neuroprotetor frente a toxicidade glutamatérgica é evidenciado. Em face das semelhanças no mecanismo desencadeado por atorvastatina ou fluoxetina frente à

toxicidade glutamatérgica esses fármacos parecem exibir mecanismo de neuroproteção semelhante.

Estudo propôs que a fluoxetina é um antidepressivo com ação neuroprotetora que age como antagonista de NMDA interagindo com a subunidade GluN2B do receptor (Kiss et al., 2012). Em paralelo a este fato, a atorvastatina apresenta efeito neuroprotetor frente ao dano promovido por ácido quinolínico, um agonista que interage com a subunidade GluN2B do receptor NMDA (Piermartiri et al., 2009). Estudo recente demonstrou que a atorvastatina protege as células corticais da morte celular induzida por isquemia focal global via interação com GluN2B (Gutierrez-Vargas et al., 2014). Desta forma, nós especulamos que tanto a fluoxetina como a atorvastatina podem estar desencadeado mecanismo neuroprotetor frente ao protocolo de toxicidade glutamatérgica via interação com a subunidade GluN2B do NMDAR. Entretanto, informação acerca do exato sítio de interação da atorvastatina é escassa, de forma que este deve ainda ser investigado.

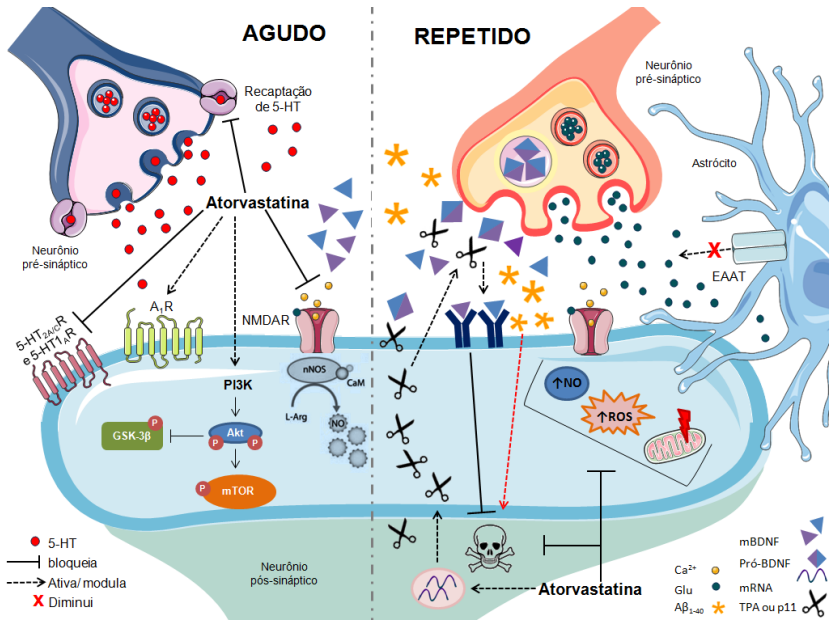
Os resultados apresentados nesta tese de doutorado demonstram os últimos avanços do nosso grupo na tentativa de elucidar os mecanismos celulares e moleculares, bem como a participação de vias de sinalização e sistemas neurotransmissores envolvidos no efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina e a possível associação entre esses efeitos. Evidenciamos ao longo da discussão que a atorvastatina desencadeia tanto efeito tipo-antidepressivo como efeito neuroprotetor, utilizando dois diferentes protocolos de tratamento: agudo (uma única administração) ou repetido (durante 7 dias consecutivos). Demonstramos que a administração aguda de atorvastatina desencadeia efeito tipo-antidepressivo que depende da modulação dos sistemas adenosinérgico, serotoninérgico e da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR, além da modulação do sistema glutamatérgico demonstrado previamente por nosso grupo (Ludka et al., 2013). Apesar destes achados o efeito neuroprotetor frente à toxicidade glutamatérgica não foi observado. Entretanto, utilizando o tratamento repetido, evidenciamos que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina *per se* é mantido e torna-se ainda mais consistente uma vez que é sustentado quando um modelo animal de depressão é aplicado. O efeito tipo-antidepressivo proveniente do tratamento repetido com atorvastatina coincide com o efeito neuroprotetor desencadeado frente ao peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> bem como frente à toxicidade induzida por glutamato. Comprovamos existir correlação entre os efeitos tipo-antidepressivo e neuroprotetor desta estatina, e demonstramos que o

aumento da expressão das proteases tPA e p11 que medeiam a clivagem de pró-BDNF à mBDNF parece ser mecanismo chave para estes efeitos.

Consideramos que os resultados apresentados ampliam a literatura relacionada aos efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina. Ressaltamos a importância de novos trabalhos que visem elucidar as diferenças entre o mecanismo da atorvastatina e dos antidepressivos clássicos e cetamina, uma vez que com os dados apresentados essa evidência não foi esclarecida. O entendimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos pleiotrópicos da atorvastatina é de grande validade considerando que é um fármaco aprovado para uso em humanos, que apresenta efeitos colaterais bem tolerados e é largamente utilizada pela população idosa, que geralmente é a faixa da população polimedicada e que pode apresentar comorbidades importantes. Ponderamos que apesar dos achados relatados nesta tese, novos estudos clínicos, avaliando o efeito de atorvastatina frente ao bem-estar psicológico de pacientes com DA, ou ainda que apresentassem esta comorbidade seriam de extrema importância para que a atorvastatina pudesse ser indicada como monoterapia ou adjuvante farmacológico para o tratamento não somente de depressão, mas também de outras doenças neurodegenerativas que compartilham os mesmos mecanismos de neuropatológicos.

Finalizamos a tese, resumizando as diferenças provenientes do tratamento agudo ou repetido com atorvastatina.





**Figura 2: Desenho representativo do efeito promovido pelo tratamento agudo ou repetido com atorvastatina.** O tratamento agudo consistiu de uma única administração de Atorvastatina (0,1 ou 0,01 mg/kg, p.o.) 1h antes dos ensaios comportamentais. O envolvimento de bloqueio do receptor NMDA, bem como da via nNOS/NO e aumento da expressão de BDNF foi observado em Ludka et al., 2013. Já o tratamento repetido foi realizado através da administração de atorvastatina (10 mg/kg, p.o.), durante 7 dias consecutivos. A administração aguda de atorvastatina desencadeia apenas efeito tipo-antidepressivo, enquanto a administração repetida desencadeia efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor.



## 7 CONCLUSÃO

- A atorvastatina desencadeia efeito tipo-antidepressivo que depende da modulação do sistema adenosinérgico via receptores  $A_1$ , porém independe da interação com receptores  $A_{2A}$  ou dos níveis de adenosina;
- A modulação dos receptores de serotonina (5-HT) dos subtipos  $5\text{-HT}_{1A}$  e  $5\text{-HT}_{2A/C}$ , bem como os níveis encefálicos de 5-HT são indispensáveis ao efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. O efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração de atorvastatina e ISRS também foi demonstrado;
- A via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR está envolvida no efeito tipo-antidepressivo proveniente da administração de atorvastatina em camundongos. A atorvastatina aumenta a fosforilação hipocampal das proteínas Akt e GSK-3 $\beta$  e mTOR;
- A atorvastatina reverte o comportamento tipo-depressivo e tipo-anedônico, bem como a morte celular hipocampal induzida pela infusão i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . O efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor é mediado pelo aumento da clivagem de pró-BDNF à mBDNF decorrente do aumento da expressão das proteases tPA e p11;
- A toxicidade induzida pela incubação de glutamato em fatias hipocampais de camundongos depende, de maneira tempo-dependente, do aumento de NO e ROS, bem como do rompimento do  $\Delta\Psi_m$ . Essas alterações são prevenidas pelo tratamento dos camundongos com atorvastatina ou fluoxetina;
- O tratamento agudo com atorvastatina desencadeou efeito tipo-antidepressivo, mas não neuroprotetor frente à toxicidade glutamatérgica. Entretanto o tratamento repetido com atorvastatina desencadeou efeito tipo-antidepressivo *per se*, bem como frente a um modelo animal de depressão. Este efeito está correlacionado com o efeito neuroprotetor desta estatina.



## 8 PERSPECTIVAS

- Investigar a participação da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR frente ao aumento da razão mBDNF/pró-BDNF proveniente do tratamento repetido com atorvastatina, utilizando antagonistas da referida via de sinalização e a imunodeteção das proteínas fosforiladas;
- Avaliar o efeito da atorvastatina frente aos níveis de adenosina e a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase em regiões encefálicas como hipocampo e córtex frontal;
- Demonstrar se o tratamento agudo com atorvastatina é capaz de reverter as alterações comportamentais e bioquímicas desencadeadas pela infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>;
- Avaliar, através de experimentos comportamentais e bioquímicos, a participação da subunidade NGlu2B do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina.



## REFERÊNCIAS

- Abelaira, H.M.; Réus, G.Z.; Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev Bras Psiquiatr.** v.35, Supl 2, p.S112-S120, 2013.
- Abramov, A.Y.; Duchon, M.R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1777, p.953–964, jul/ago. 2008.
- Ackermann, T.F.; Kempe, D.S.; Lang, F.; Lang, U.E. Hyperactivity and enhanced curiosity of mice expressing pkb/ sgk-resistant glycogen synthase kinase-3 (gsk-3). **Cell Physiol Biochem.** v.25, p.775-786, mai. 2010.
- Aid, T.; Kazantseva, A.; Piirsoo, M.; Palm, K.; Timmusk, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **J Neurosci Res.** v.85, p. 525–535, fev. 2007.
- Amarenco, P.; Bogousslavsky, J.; Callahan, A.; Goldstein, L.B.; Hennerici, M.; Rudolph, A.E.; Silleesen, H.; Simunovic, L.; Szarek, M.; Welch, K.M.; Zivin, J.A. Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Investigators. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. **N Engl J Med.** v.355(6), p.549-559, ago. 2006.
- Amargós-Bosch, M.; Artigas, F.; Adell, A. Effects of acute olanzapine after sustained fluoxetine on extracellular monoamine levels in the rat medial prefrontal cortex. **Eur J Pharmacol.** v.516, p.235-238, jun. 2005.
- Andersen, K.; Lolk, A.; Kragh-Sorensen, P.; Petersen, N.E.; Green, A. Depression and the risk of Alzheimer disease. **Epidemiology.** v.16, p.233–238, mar. 2005.
- Anderson, I.M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. **J Affect Disord.** v.58 (1), p.19–36, abr. 2000.

Andrade, C. Selective serotonin reuptake inhibitor drug interactions in patients receiving statins. **J Clin Psychiatry**. v.75(2), p.95-99, fev. 2014.

Ansorge, M.S.; Hen, R.; Gingrich, J.A. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. **Curr Opin Pharmacol**. v.7, p.8-17, fev. 2007.

Artigas, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol Ther**. v.137, p.119-131, Set. 2012.

Asberg, M.; Traskman, L.; Thoren, P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? **Arch Gen Psychiatry**. v.33, p.1193-1197, out. 1976.

Aubry, J.M.; Schwald, M.; Ballmann, E.; Karege, F. Early effects of mood stabilizers on the akt/gsk-3beta signaling pathway and on cell survival and proliferation. **Psychopharmacology**. v.205, p.419-429, ago/mai. 2009.

Autry, A.E.; Adachi, M.; Nosyreva, E.; Na, E.S.; Los, M.F.; Cheng, P.F.; Kavalali, E.T.; Monteggia, L.M. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**. v.475(7354), p.91-95, jun. 2011.

Balaratnasingam, S.; Janca, A. Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacology & Therapeutics**. v.134(1), p.116-124, abr. 2012.

Ballantyne, C.M.; Davidson, M.H. Possible differences between fibrates in pharmacokinetic interactions with statins. **Arch Intern Med**. v.163(19), p.2394-2395, out. 2003.

Banasr, M.; Valentine, G.W.; Li, X.Y.; Gourley, S.L.; Taylor, J.R.; Duman, R.S. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. **Biol Psychiatry**. v.62(5), p.496-504, set/jun. 2007.

Banerjee, S.; Hellier, J.; Romeo, R.; Dewey, M.; Knapp, M.; Ballard, C. et al. Study of the use of antidepressants for depression in dementia: the HTA-SADD trial—a multicentre, randomised, double-blind, placebo-



controlled trial of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of sertraline and mirtazapine. **Health Technol Assess.** v.17(7), p.1–166, fev. 2013.

Barnes, D.E.; Alexopoulos, G.S.; Lopez, O.L.; Williamson, J.D.; Yaffe, K. Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study. **Arch Gen Psychiatry.** v. 63(3), p.273-279, mar. 2006.

Barone, E.; Di Domenico, F.; Butterfield A. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. **Biochemical Pharmacology.** v.88, p.605–616, abr/nov. 2014.

Beekman, A.T.; Geerlings, S.W.; Deeg, D.J.; Smit, J.H.; Schoevers, R.S.; de Beurs, E.; et al. The natural history of late-life depression: a 6-year prospective study in the community. **Arch Gen Psychiatry.** v.59, p.605–11, jul. 2002.

Berger, C.; Xia, F.; Maurer, M.H.; Schwab, S. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. **Brain Res. Rev.** v.58 (1), p.48–56, jun/nov. 2008.

Berman, R.M.; Cappiello, A.; Anand, A., Oren, D.A.; Heninger, G.R.; Charney, D.S.; et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry.** v.47, p.351–354, Fev. 2000.

Bettio, L.E.; Cunha, M.P.; Budni, J.; Pazini, F.L.; Oliveira, Á.; Colla, A.R.; Rodrigues, A.L. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res.** v.234(2), p.137-48, out. 2012.

Birnbaum, Y.; Ye, Y. Pleiotropic Effects of Statins: The Role of Eicosanoid Production. **Curr Atheroscler Rep.** v.14, p.135–139, jan. 2012.

Blardi, P.; de Lalla, A.; Urso, R.; Auteri, A.; Dell’Erba, A.; Bossini, L.; Castrogiovanni, P. Activity of citalopram on adenosine and serotonin circulating levels in depressed patients. **J Clin Psychopharmacol.** v.25(3), p.262–266, jun. 2005.

Blier, P.; Abbott, F.V.J. Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. **Psychiatry Neurosci.** v.26, p.37-43, jan. 2010.

Boldrini, M.; Underwood, M.D.; Mann, J.J.; Arango, V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. **J Psychiatr Res.** v.42, p.433-442, jun. 2008.

Bösel, J.; Gandor, F.; Harms, C.; Synowitz, M.; Harms Djoufack, P. C.; Megow, D.; Dirnagl, U.; Hortnagl, H.; Fink, K. B.; Endres, M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate induced excitotoxicity in primary cortical neurons. **Journal of Neurochemistry.** v.92, p.1386-1398, mar. 2005.

Bourin, M.; Chenu, F.; Ripoll, N.; David, D.J. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res,** v.164(2), p. 266-269, nov. 2005.

Brambilla, P.; Cipriani A.; Hotopf, M.; Barbui, C. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. **Pharmacopsychiatry.** v.38, p.69-77, mar. 2005.

Bromet, E.; Andrade, L.H.; Hwang, I.; et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Med.** v.26, p.9-90, jul. 2011.

Brown, G.C.; Borutaite, V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1658, p.44-49, jul. 2004.

Budni, J.; Lobato, K.R.; Binfare, R.W.; Freitas, A.E.; Costa A.P.; Martin-de-Saavedra, M.D.; Leal, R.B.; Lopez, M.G.; Rodrigues, A.L. Involvement of PI3K, GSK-3 $\beta$  and PPAR $\gamma$  in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **J Psychopharmacol.** v.26, p.714-723, mai/out. 2012.

Carrillo-Mora, P.; Luna, R.; Colín-Barenque, L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? **Oxid Med Cell Longev.** v.2014, p.1-15, fev. 2014.

Casarotto, P.C.; Santos, P.C.; Lucas, G.A.; Biojone, C.; Pobbe, R.L.; Vilela-Costa, H.H.; Joca, S.R.; Guimarães, F.S.; Zangrossi, H. Jr. BDNF-TRKB signaling system of the dorsal periaqueductal gray matter is implicated in the panicolytic-like effect of antidepressant drugs. **Eur Neuropsychopharmacol.** v.25(6), p.913-922, jun/mar. 2015.

Castro, A.A.; Wiemes, B.P.; Matheus, F.C.; Lapa, F.R.; Viola, G.G., Santos, A.R., et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Res** v.4(1513), p.103–116, jun/mar. 2013.

Ceglia, I.; Acconcia, S.; Fracasso, C.; Colovic, M.; Caccia, S.; Invernizzi, R.W. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT1A receptors. **Br J Pharmacol.** v.142(3), p.469-478, jun/mai. 2004.

Chao, M. V.; Rajagopal, R.; Lee, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clin Sci.** v.110, p.167–173, fev. 2006.

Chen, J.; Zhang, Z.G.; Li, Y.; Wang, Y.; Wang, L.; Jiang, H.; Zhang, C.; Lu, M.; Katakowski, M.; Feldkamp, C.S.; Chopp, M. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. **Ann Neurol.** v.53, p.743–751, jun.2003.

Chen, J.; Zhang, C.; Jiang, H.; Li, Y.; Zhang, L.; Robin, A.; Katakowski, M.; Lu, M.; Chopp, M. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.25(2), p.281-290, fev. 2005.

Chung, E.S.; Chung, Y.C.; Bok, E.; Baik, H.H.; Park, E.S.; Park, J.Y.; Yoon, S.H.; Jin, B.K. Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. **Brain Res.** v.1363, p.143-150, dez/set. 2010.

Citraro, R.; Chimirri, S.; Aiello, R.; Gallelli, L.; Trimboli, F.; Britti, D.; De Sarro, G.; Russo, E. Protective effects of some statins on epileptogenesis and depressive-like behavior in WAG/Rij rats, a genetic

animal model of absence epilepsy. **Epilepsia**. v.55(8), p.1284–1291, mai/jun. 2014.

Colaïanna, M.; Tucci, P.; Zotti, M.; Morgese, M.G.; Schiavone, S.; Govoni, S.; Cuomo, V.; Trabace, L. Soluble  $\beta$  amyloid<sub>1-42</sub>: a critical player in producing behavioural and biochemical changes evoking depressive-related state? **British Journal of Pharmacology**. v.159, p.1704–1715, abr/mar. 2010.

Collins, R.; Armitage, J.; Parish, S.; Sleight, P.; Peto, R. Heart Protection Study Collaborative Group. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. **Lancet**. v.636(9411), p.757-767, mar. 2004.

Compare, A.; Zarbo, C.; Shonin, E.; Van Gordon, W.; Marconi, C. Emotional Regulation and Depression: A Potential Mediator between Heart and Mind. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**. v.2014, p. 1-10, 2014.

Coppen, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry**. v.113, p.1237-1264, nov. 1967.

Crespi, F. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces striatal *in vivo* levels of voltammetric nitric oxide (NO): a feature of its antidepressant activity?. **Neurosci Lett**. v.470, p.95–99, fev/dez. 2010.

Crouse, J.R.; Byington, R.P.; Furberg, C.D. HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. **Atherosclerosis**. v.138(1), p.11-24, mai. 1998.

Cryan, J.F.; Valentino, R.J.; Lucki, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**. v.29(4-5), p.547-69, 2005.

Cui, X.; Chopp, M.; Zacharek, A.; Roberts, C.; Lu, M.; Savant-Bhonsale, S.; Chen, J. Chemokine, vascular and therapeutic effects of combination simvastatin and BMSC treatment of stroke. **Neurobiol. Dis**. v.36 (1), p.35–41, out/jul. 2009.

Cull-Candy, S.; Brickley, S.; Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, p.327-335, jun. 2001

Cunha, R.A.; Ferre, S.; Vaugeois, J.M.; Chen, J.F. Potential therapeutic interest of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in psychiatric disorders. **Curr Pharm Des**. v.14(15), p.1512–1524, 2008.

Cunha MP, Pazini FL, Rosa JM, Ramos-Hryb AB, Oliveira Á, Kaster MP, Rodrigues AL. Creatine, similarly to ketamine, affords antidepressant-like effects in the tail suspension test via adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor activation. **Purinergic Signal**. v.11(2), p.215-27, jan/fev. 2015a.

Cunha, M.P.; Budni, J.; Ludka, F.K.; Pazini, F.L.; Rosa, J.M.; Oliveira, Á.; Lopes, M.W.; Tasca, C.I.; Leal, R.B.; Rodrigues, A.L. Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**. DOI 10.1007/s12035-015-9192-4, mai. 2015b.

Danbolt, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol**. v.65, p. 1–105, set. 2001.

Daneschvar, H.L.; Aronson, M.D.; Smetana, G.W. **Eur J Intern Med**. v.26(9), p.666-669, nov/set. 2015.

Deckert, J.; Gleiter, C.H. Adenosinergic psychopharmaceuticals? **Trends Pharmacol.Sci**. v.10(3), p.99–100, mar. 1989.

De Felice, F.G.; Vieira, M.N.; Bomfim, T.R.; Decker, H.; Velasco, P.T.; Lambert, M.P.; Viola, K.L.; Zhao, W.Q.; Ferreira, S.T.; Klein, W.L. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.106(6), p.1971-1976, fev. 2009.

de Oliveira, C.V.; Funck, V.R.; Pereira, L.M.; Grigoletto, J.; Rambo, L.M.; Ribeiro, L.R.; Royes, L.F.; Furian, A.F.; Oliveira, M.S. Atorvastatin withdrawal elicits oxidative/nitrosative damage in the rat cerebral cortex. **Pharmacol Res**. v.71, p.1-8, mai/fev. 2013.

Dhir, A.; Kulkarni, S.K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**. v.24, p.125–131, abr/fev. 2007.

Dhote, F.; Carpentier, P.; Barbier, L.; Peinnequin, A.; Baille, V.; Pernot, F.; Testylier, G.; Beaup, C.; Foquin, A.; Dorandeu, F. Combinations of ketamine and atropine are neuroprotective and reduce neuroinflammation after a toxic status epilepticus in mice.

**Toxicol Appl Pharmacol**. v.259(2), p.195–209, mar/jan. 2012.

Dodd, S.; Maes, M.; Anderson, G.; Dean, O.M.; Moylan, S.; Berk, M. Putative neuroprotective agents in neuropsychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**.v.42, p.135-145, abr/nov. 2013.

Dolga, A.M.; Nijholt, I.M.; Ostroveanu, A.; Ten, B.Q.; Luiten, P.G.; Eisel, U.L. Lovastatin induces neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathways. **J. Alzheimer's Dis**. v.13, p.111–122, mar. 2008.

Dolga, A.M.; Granic, I.; Nijholt, I.M.; Nyakas, C.; Van der Zee, E.A.; Luiten, P.G.; Eisel, U.L. Pretreatment with Lovastatin prevents N-methyl-D-aspartate induced neurodegeneration in the magnocellular nucleus basalis and behavioral dysfunction. **J. Alzheimer's Dis**. v.17(2), p.327-336, 2009.

Donovan, N.J.; Hsu, D.C.; Dagley, A.S.; Schultz, A.P.; Amariglio, R.E.; Mormino, E.C.; Okereke, O.I.; Rentz, D.M.; Johnson, K.A.; Sperling, R.A.; Marshall, G.A. Depressive Symptoms and Biomarkers of Alzheimer's Disease in Cognitively Normal Older Adults. **J Alzheimers Dis**. v.46(1), p.63-73, 2015.

Dorandeu, F.; Dhote, F.; Barbier, L.; Baccus, B.; Testylier, G. Treatment of status epilepticus with ketamine, are we there yet? **CNS Neurosci Ther**. v.19(6), p.411–427, jun/abr. 2013.

dos Santos, V.V.; Santos, D.B.; Lachc, G.; Rodrigues, A.L.S.; Farina, M.; De Lima, T.C.M.; Prediger, R.D. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- $\beta$ (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) administration in mice. **Behavioural Brain Research**. v.244, p.107–115, mai/fev. 2013.

Drug Bank, **Atorvastatin**. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00857>. Acesso em dezembro de 2015.

Duits, N.; Bos, F.M. Depressive symptoms and cholesterol-lowering drugs. **Lancet**. v.341, p. 114, jan.1993.

Duman, R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. **Eur Psychiatry** (Supplement 3), p.306–310, jul. 2002.

Duman, R.; Monteggia, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psych**. v.59, p.1116-1127, jun/abr. 2006.

Duman, R.S.; Li, N.; Liu, R.J. Duric, V.; Aghajanian, G. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**. v.62, p.35-41, jul/ago, 2012.

Duman, R.S.; Voleti, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences** (Special Issue: Neuropsychiatric Disorders). v.35, p.47-56, jan.2012.

Duman, R.S. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. v.16, p. 11-27, mar. 2014.

ElBatsh, M.M. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. **Can J Physiol Pharmacol**. v.93(8), p.649-656, ago/mar. 2015.

Elhwuegi, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.28, p.435–451, Maio. 2004.

El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Bertorelli, R.; Ongini, E.; Costentin, J.; Vaugeois, J.M. Adenosine<sub>A<sub>2A</sub></sub> receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A<sub>2A</sub> receptor knockout mice. **Br J Pharmacol**. v.134(1), p.68-77, set. 2001.

El Yacoubi, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.M. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors and depression. **Neurology**. v.61(11 Suppl 6), p.S82–S87, dez. 2003.

- Emnett, C.M.; Eisenman, L.N.; Taylor, A.M.; Izumi, Y.; Zorumski, C.F.; Mennerick, S. Indistinguishable synaptic pharmacodynamics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine and ketamine. **Mol Pharmacol**. v.84(6), p.935–947, dez. 2013.
- Enache, D.; Winblad, B.; Aarsland, D. Depression in dementia: epidemiology, mechanisms, and treatment. **Curr. Opin. Psychiatry**. v.24, p.461–472, nov. 2011.
- Esplugues, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br. J. Pharmacol**. v.135, p.1079–1095, mar. 2002.
- Fang, X.; Tao, D.; Shen, J.; Wang, Y.; Dong, X.; Ji, X. Neuroprotective effects and dynamic expressions of MMP9 and TIMP1 associated with atorvastatin pretreatment in ischemia-reperfusion rats. **Neurosci Lett**. v.31, p.60-65, ago/jul. 2015.
- Featherstone, D.E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, v.1, p.4-12, jan/out. 2010.
- Fredholm, B.B.; Battig, K.; Holmen, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**. v.51(1), p.83–133, mar. 1999.
- Fredholm, B.B.; Chen, J.F.; Cunha, R.A.; Svenningsson, P.; Vaugeois, J.M. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**. v.63, p.191–270, 2005a.
- Fredholm, B.B.; Chen, J.F.; Masino, S.A.; Vaugeois, J.M. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.45, p.385–412, 2005b.
- Garcia, L.S.; Comim, C.M.; Valvassori, S.S.; Réus, G.Z.; Barbosa, L.M.; Andreazza, A.C.; Stertz, L.; Fries, G.R.; Gavioli, E.C.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.32(1), p.140-144, jan/ago. 2008.



Garzon, D.; Yu, G.; Fahnestock, M. A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer's disease parietal cortex. **J Neurochem.** v.82(5), p.1058-1064, set. 2002.

Gaw, A.; Packard, C.J. At what level of coronary heart disease risk should a statin be prescribed? **Curr Opin Lipidol.** v.11, p.363-367, ago. 2000.

Germershausen, J.I.; Hunt, V.M.; Bostedor, R.G.; Bailey, P.J.; Karkas, J.D.; Alberts, A.W. Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats *in vivo*. **Biochem Biophys Res Commun.** v.15, p.667-675, fev. 1989.

Ghanizadeh, A.; Hedayati, A. Augmentation of fluoxetine with lovastatin for treating major depressive disorder, a randomized double-blind placebo controlled - clinical trial. **Depression and Anxiety.** v.30, p.1084-1088, nov.set. 2013.

Gigliucci, V.; O'Dowd, G.; Casey, S.; Egan, D.; Gibney, S.; Harkin, A. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. **Psychopharmacology (Berl).** v.228(1), p.157-166, jul/mar. 2013.

Gliyazova, N.S.; Huh, E.Y.; Ibeanu, G.C. A novel phenoxy thiophene sulphonamide molecule protects against glutamate evoked oxidative injury in a neuronal cell model. **BMC Neuroscience.** v.14(93), p.2-13, 2013.

Goedert, M.; Spillantini, M.G. A century of Alzheimer's disease. **Science.** v.314, p.777-781, nov. 2006.

Gong, X.; Ma, Y.; Ruan, Y.; Fu, G.; Wu, S. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. **Exp Gerontol.** v.52, p.9-17, abr/jan. 2014.

Goldstein, L.B. Statins after intracerebral hemorrhage: to treat or not to treat. **Arch Neurol.** v.68(5), p.565-566, mai/jan. 2011.

- Gomes, C.V.; Kaster, M.P.; Tomé, A.R.; Agostinho, P.M.; Cunha, R.A. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **Biophysica Acta**. v.1808, p.1380–1399, mai.dez. 2011.
- Gonda, X. Basic pharmacology of NMDA receptors. **Curr Pharm Des**, v. 18, p.1558-1567, 2012.
- Gonul, A.; Akdeniz, F.; Taneli, F.; Donat, O.; Eker, Ç.; Vahip, S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**. v.255, p.381–386, dez/abr. 2005.
- Gornwood, P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. **Translational research**. v.10(3), p.291-299, 2008.
- Gougol, A.; Zareh-Mohammadi, N.; Raheb, S.; Farokhnia, M.; Salimi, S.; Iranpour, N.; Yekehtaz, H.; Akhondzadeh, S. Simvastatin as an adjuvant therapy to fluoxetine in patients with moderate to severe major depression: A double-blind placebo-controlled trial. **J Psychopharmacol**. v.29(5), p.575-581, mai/mar. 2015.
- Gould, T.D.; Manji, H.K. Glycogen synthase kinase-3: A putative molecular target for lithium mimetic drugs. **Neuropsychopharmacology**. v.30, p.1223-1237, jul. 2005.
- Grundy, S.M.; Cleeman, J.I.; Merz, C.N.; Brewer, H.B. Jr., Clark, L.T.; Hunninghake, D.B.; Pasternak, R.C.; Smith, S.C. Jr.; Stone, N.J. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **J Am Coll Cardiol**. v.44(3), p.720-732, ago. 2004.
- Gu, Q.; Paulose-Ram, R.; Burt, V.L.; Kit, B.K. Prescription cholesterol-lowering medication use in adults aged 40 and over: United States, 2003-2012. **NCHS Data Brief**. v.177, p.1-8, dez. 2014.
- Gutierrez-Vargas, J.A.; Muñoz-Manco, J.I.; Garcia-Segura, L.M.; Cardona-Gómez, G.P. GluN2B N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mediates atorvastatin-Induced neuroprotection after focal

cerebral ischemia. **J Neurosci Res.** v.92(11), p.1529-1548, nov/jun. 2014.

Haass, C.; Selkoe., D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** V. 8, p.101–112, 2007.

Hackam, D.G.; Woodward, M.; Newby, L.K.; Bhatt, D.L.; Shao, M.; Smith, E.E.; Donner, A.; Mamdani, M.; Douketis, J.D.; Arima, H.; Chalmers, J.; MacMahon, S.; Tirschwell, D.L.; Psaty, B.M.; Bushnell, C.D.; Aguilar, M.I.; Capampangan, D.J.; Werring, D.J.; De Rango, P.; Viswanathan, A.; Danchin, N.; Cheng, C.L.; Yang, Y.H.; Verdel, B.M.; Lai, M.S.; Kennedy, J.; Uchiyama, S.; Yamaguchi, T.; Ikeda, Y.; Mrkobrada, M. Statins and intracerebral hemorrhage: collaborative systematic review and meta-analysis. **Circulation.** V.124(20), p.2233-2242, nov/out. 2011.

Haghighi, M.; Khodakarami, S.; Jahangard, L.; Ahmadpanah, M.; Bajoghli, H.; Holsboer-Trachsler, E.; Brand, S. In a randomized, double-blind clinical trial, adjuvant atorvastatin improved symptoms of depression and blood lipid values in patients suffering from severe major depressive disorder. **J Psychiatr Res.** v.58, p.109-114, nov/ago. 2014.

Hardingham, G.E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. **Biochem Soc Trans,** v. 37, p. 1147-1160, dez. 2009.

Harrison, R.W.S.; Ashton, C.H. Do cholesterol-lowering agents affect brain activity? A comparison of simvastatin, pravastatin, and placebo in healthy volunteers. **Br J clin Pharmac.** v.37, p.231-236, 1994.

Hashimoto, K.; Sawa, A.; Iyo, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biol Psychiatry.** v.25, p.1310–1316, dez/jun. 2007.

Hashimoto, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** v.35, p.1558–1568, mai/jun. 2011.

Hensler, J.G. Serotonergic modulation of the limbic system. **Neurosci Biobehav Rev.** v.30, p.203-214, set. 2006.

Hernández-Romero, M.C.; Argüelles, S.; Villarán, R.F.; de Pablos, R.M.; Delgado-Cortés, M.J.; Santiago, M., Herrera, A.J.; Cano, J.; Machado, A. Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. **J. Neurochem.** v.105 (2), p.445–459, abr/nov. 2008.

Hines, D.J.; Schmitt, L.I.; Hines, R.M.; Moss, S.J.; Haydon, P.G. Antidepressant effects of sleep deprivation require astrocyte-dependent adenosine mediated signaling. **Transl Psychiatry.** v.3, p.1-9, ago/nov. 2013.

Hirschfeld, R.M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry.** v. 61 (Suppl 6), p. 4–6, 2000.

Hong, H.; Zeng, J.S.; Kreulen, D.L.; Kaufman, D.I.; Chen, A.F. Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. **Am. J. Physiol, Heart Circ. Physiol.** v.291(5), p.2210–2215, nov/jun. 2006.

Hosaka, A.; Araki, W.; Oda, A.; Tomidokoro, Y.; Tamaoka, A. Statins reduce amyloid  $\beta$ -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. **Neurochem Res.** v.38(3), p.589-600, mar/dez. 2013.

Huo, X.L.; Min, J.J.; Pan, C.Y.; Zhao, C.C.; Pan, L.L.; Gui, F.F.; Jin, L.; Wang, X.T. Efficacy of lovastatin on learning and memory deficits caused by chronic intermittent hypoxia/hypercapnia: through regulation of NR2B-containing NMDA receptor-ERK pathway. **PLoS One.** v.9(4), p.94278.-94278, abr. 2014.

Iadarola, N.D.; Niciu, M.J.; Richards, E.M.; VandeVoort, J.L.; Ballard, E.D.; Lundin, N.B.; Nugent, A.C.; Machado-Vieira, R.; Zarate, C.A. Jr. Ketamine and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the treatment of depression: a perspective review. **Ther Adv Chronic Dis.** v.6(3), p.97-114, mai. 2015.

Jacobi, F.; Wittchen, H.-U.; Holting, C.; Höfler, M.; Pfister, H.; Müller, N.; Lieb, R. Prevalence, co-morbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS). **Psychol Med.** v.34(4), p.597-611, mai. 2004.

Jamwal, S.; Kumar, P. Antidepressants for neuroprotection in Huntington's disease: A review. **Eur J Pharmacol.** v.769, p.33-42, dez/out. 2015.

Joca, S.R.; Guimarães, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology.** v.185, p.298-305, abr/mar. 2006.

Justin, A.; Sathishkumar, M.; Sudheer, A.; Shanthakumari, S.; Ramanathan, M. Non-hypotensive dose of telmisartan and nimodipine produced synergistic neuroprotective effect in cerebral ischemic model by attenuating brain cytokine levels. **Pharmacol Biochem Behav.** v.122, p.61-73, jul/mar. 2014.

Kang, J.H.; Kao, L.T.; Lin, H.C.; Tsai, M.C.; Chung, S.D. Statin use increases the risk of depressive disorder in stroke patients: a population-based study. **J Neurol Sci.** v.348(1-2), p.89-93, jan/nov. 2015.

Kannel, W.B.; Castelli, W.P.; Gordon, T.; McNamara, P.M. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. **Ann. Intern. Med.** v.74, p.1-12, jan. 1971.

Karege, F.; Perret, G.; Bondolfi, G.; Schwald, M.; Bertschy, G.; Aubry, J.M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Res.** v.109, p.143-148, mar. 2002.

Kassam, G.; Le, B.H.; Choi, K.S.; Kang, H.M.; Fitzpatrick, S.L.; Louie, P.; Waisman, D.M. The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. **Biochemistry.** v.37(48), p.16958-16966, dez. 1998.

Kassler-Taub, K.; Woodward, T.; Markowitz, J.S. Depressive symptoms and pravastatin. **Lancet.** v.341(8841), p.371-372, fev. 1993.

Kaster, M.P.; Rosa, A.O.; Rosso, M.M.; Goulart, E.C.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. **Neurosci Lett**. v.355(1-2), p.21-24, jan. 2004.

Kaster, Manuella P. **Envolvimento do sistema adenosinérgico em modelos de estresse e depressão**. 2008. 168f. Tese de doutorado em Neurociências – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

Kaster, M.P.; Budni, J.; Gazal, M.; Cunha, M.P.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. **Purinergic Signal**. v.9(3), p.481-486, set/abr. 2013.

Keelan, J.; Vergun, O.; Duchen, M.R. Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons. **J. Physiol. (London)**. v.3, p.797-813, nov. 1999.

Kenny, P.J., Markou, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v 25, p. 265-272, mai. 2004.

Kessler, R.C.; Berglund, P.; Demler, O.; Jin, R.; Merikangas, K.R.; Walters, E.E. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of *DSM-IV* Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**. v.62, p.593-768, jun. 2005.

Kew, J. N.; Kemp, J. A. Iontropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v.179, p.4-29, abr/fev. 2005.

Kim, J.; Hajjar, K.A. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. **Front Biosci**. v.7, p.341-348, fev. 2002.

Kim, S.W.; Bae, K.Y.; Kim, J.M.; Shin, I.S.; Hong, Y.J.; Ahn, Y.; Jeong, M.H.; Berk, M.; Yoon, J.S. The use of statins for the treatment of depression in patients with acute coronary syndrome. **Transl Psychiatry**. v.5, p.1-7, fev/jun. 2015.

Kiss, J.P.; Szasz, B.K.; Fodor, L.; Mike, A.; Lenkey, N.; Kurkó, D.; Nagy, J.; Vizi, S. GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. **Neurochemistry International**. v.60, p.170-176, jan/dez. 2012.

Kitagishi, Y.; Kobayashi, M.; Kikuta, K.; Matsuda, S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/ mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Depress Res Treat**. v. 752563, p.1-8, ago/nov. 2012.

Koladiya, R.U.; Jaggi, A.S.; Singh, N.; Sharma, B.K. Ameliorative role of atorvastatin and pitavastatin in L-methionine induced vascular dementia in rats. **BMC Pharmacol**. v.8, p.14, ago. 2008.

Koren, M.J.; Hunninghake, D.B. Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the alliance study. **J Am Coll Cardiol**. v.9, p.1772-1779, nov. 2004.

Kotłęga, D.; Gołąb-Janowska, M.; Masztalewicz, M.; Cieciewicz, S.; Nowacki, P. Potential role of statins in the intracerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage. **Neurol Neurochir Pol**. 49(5), p.322-328, ago. 2015.

Kreiss, D.S.; Lucki, I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**. v.274(2), p.866-876, ago. 1995.

Kretz, A.; Schmeer, C.; Tausch, S.; Isenmann, S. Simvastatin promotes heat shock protein expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells *in vivo*. **Neurobiol. Dis**. v.21, p.421-430, fev/set. 2006.

Kriegebaum, C.; Gutknecht, L.; Schmitt, A.; Lesch, K.P.; Reif, A. Serotonin now: part 1. Neurobiology and developmental genetics. **Fortschr Neurol Psychiatr**. v.78, p.319-31, jun. 2010.

Krishnan, V.; Nestler, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. v.16, p.894-902, out. 2008.

Krishnan, V.; Nestler, E.J. Linking Molecules to Mood: New Insight Into the Biology of Depression. **Am J Psychiatry**. v.167, p.1305–1320, nov. 2010.

Kroeze, Y.; Zhou, H.; Homberg, J.R. The genetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacol Ther**. v.136, p.375-400, set. 2012.

Kucukibrahimoglu, E.; Saygin, M.Z.; Caliskan, M.; Kaplan, O.K.; Unsal, C.; Goren, M.Z. The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine-or S-citalopram treated female patients with major depression. **Eur. J. Clin. Pharmacol**. v.65, p.571-577, jun/abr. 2009.

Kulkarni, S.K.; Mehta, A.K. Purine nucleoside—mediated immobility in mice: reversal by antidepressants. **Psychopharmacology**. v.85(4), p.460–463, 1985.

Kumar, A.; Sharma, N.; Gupta, A.; Kalonia, H.; Mishra, J. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. **Brain Res**. v.1471, p.13-22, ago/jul. 2012.

Kurata, T.; Miyazaki, K.; Kozuki, M.; Morimoto, N.; Ohta, Y.; Ikeda, Y.; Abe, K. Atorvastatin and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurol Res**. v.34(6), p.601-610, jul/jun. 2012.

Lacor, P.N. Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in AD. **Curr Genomics**. v.8(8), p.486-508, dez. 2007.

Lan, M.J.; McLoughlin, G.A.; Griffin, J.L.; Tsang, T.M.; Huang, J.T.; Yuan, P.; Manji, H.; Holmes, E.; Bahn, S. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. **Mol. Psychiatry**. v.14, p.269-279, Mar. 2009.

Lang, U.E.; Bajbouj, M.; Gallinat, J.; Hellweg, R. Brain-derived neurotrophic factor serum concentrations in depressive patients during vagus nerve stimulation and repetitive transcranial magnetic stimulation. **Psychopharmacology (Berl)**. v.187(1), p.56-59, jul/abr. 2006.



Lanni, M.; Govoni, S.; Lucchelli A., Boselli, C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. **Cell. Mol. Life Sci.** v.66, p.2985–3008, Set. 2009.

Lara, D.R.; Dall'Igna, O.P.; Ghisolfi, E.S.; Brunstein, M.G. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.** v.30(4), p.617–629, jun/mar. 2006.

Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch.** v.460, p.525-542, jun/mar. 2010.

Lechleitner, M.; Hoppichler, F.; Konwalinka, G, Patsch JR, Braunsteiner H. Depressive symptoms in hypercholesterolaemic patients treated with pravastatin. **Lancet.** v.340(8824), p.910, out. 1992.

Ledo, J.H.; Azevedo, E.P.; Clarke, J.R.; Ribeiro, F.C.; Figueiredo, C.P.; Foguel, D.; De Felice, F.G.; Ferreira, S.T. Amyloid- $\beta$  oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. **Progress in Psychiatry.** p.1-2, out/nov. 2012.

Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K.K.; Hempstead, B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science.** v.394(5548), p.1945-4948, nov. 2001.

Lee, B.H.; Lee, S.W.; Yoon, D.; Lee, H.J.; Yang, J.C.; Shim, S.H.; Kim, D.H.; Seung-Ho, R.; Han, C.; Kim, Y.K. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology.** v.53, p.127–132, abr. 2006.

Lee, S.T.; Chu, K.; Park, J.E.; Hong, N.H.; Im, W.S.; Kang, L.; Han, Z.; Jung, K.H.; Kim, M.W.; Kim, M. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/ Akt pathways. **J. Neurochem.** v.104, p.1190–1200, mar/nov. 2008.

Lee, S.; Jeong, J.; Kwak, Y.; Park, S.K. Depression research: where are we now? **Molecular Brain.** v.10, p.3-8, mar. 2010

Leker, R.R.; Khoury, S.T.; Rafaeli, G.; Shwartz, R.; Eichel, R.; Tanne, D. NASIS Investigators. Prior use of statins improves outcome in patients with intracerebral hemorrhage: prospective data from the National Acute Stroke Israeli Surveys (NASIS). **Stroke**. v.40(7), p.2581-2584, jul/abr. 2009.

Li, G.; Larson, E.B.; Sonnen, J.A.; Shofer, J.B.; Petrie, E.C.; Schantz, A.; Peskind, E.R.; Raskind, M.A.; Breitner, J.C.; Montine, T.J. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. **Neurology**. v.69(9), p.878–885, ago. 2007.

Li, N.; Lee, B.; Liu, R.J.; Banasr, M.; Dwyer, J.M.; Iwata, M.; Li, X.Y.; Aghajanian, G.; Duman, R.S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**. v.329, p.959-964, ago. 2010.

Liang, T.; Li, R.; Cheng, O. Statins for Treating Alzheimer's Disease: Truly Ineffective? **Eur Neurol**. v.73, p.360-366, mai. 2015.

Liao, J. K.; Laufs, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.45, p. 89-118, 2005.

Lim, C.M.; Kim, S.W.; Park, J.Y.; Kim, C.; Yoon, S.H.; Lee, J.K. Fluoxetine Affords Robust Neuroprotection in the Postischemic Brain Via Its Anti-inflammatory Effect. **Journal of Neuroscience Research**. v.87, p.1037–1045, mar. 2009.

Lin, H.Y.; Yeh, W.L.; Huang, B.R.; Lin, C.; Lai, C.H.; Lin, H.; Lu, D.Y. Desipramine protects neuronal cell death and induces heme oxygenase-1 expression in Mes23.5 dopaminergic neurons. **PLoS One**. v.11, p.1-12, nov. 2012.

Lin, P.Y.; Chang, A.Y.; Lin, T.K. Simvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in rats exposed to chronic mild stress. **Pharmacol Biochem Behav**. v.124, p.174-179, set/jun. 2014.

Lipton, S.A. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. **Curr Drug Targets**. v.8(5), p.621-32, mai. 2007.

- Lobato, K.R.; Binfare, R.W.; Budni, J.; Rosa, A.O.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Involvement of the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of zinc in the forced swimming test. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**. v.32(4), p.994–999, mai/jan. 2008.
- Lopez, S.; Peiretti, F.; Bonardo, B.; Juhan-Vague, I.; Nalbone, G. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human endothelial cells. **Atherosclerosis**. v.152(2), p.359-366, out. 2000.
- Lu, B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. **Neuron**. v.39, p.735–738, ago. 2003.
- Ludka, F.K.; Zomkowski, A.D.E.; Cunha, M.P.; Dal-Cim, T.; Zeni, A.L.B.; Rodrigues, A.L.S.; Tasca, C.I. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant like effect in mice via the L-arginine nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**. v.23, p.400–412, mai. 2013.
- Machado-Vieira, R.; Lara, D.R.; Souza, D.O.; Kapczinski, F. Purinergic dysfunction in mania: an integrative model. **Med Hypotheses**. v.58(4), p.297-304, abr. 2002.
- Maes, M.; Verkerk, R.; Vandoolaeghe, E.; Lin, A.; Scharpe, S. Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. **Acta Psychiatr. Scand**. v.97, p.302-308, abr. 1998.
- Maes, M.; Fišar, Z.; Medina, M.; Scapagnini, G.; Nowak, G.; Berk, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates: Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**. v.20(3), p.127-150, jun/jan.2012.
- Maletic, V.; Robinson, M.; Oakes, T.; Iyengar, S.; Ball, S.G.; Russell, J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. **Int J Clin Pract**. v.61(12), p.2030-2040, out. 2007.

- Manosso, L.M.; Moretti, M.; Ribeiro, C.M.; Gonçalves, F.M.; Leal, R.B.; Rodrigues A.L. Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.3, p.59-67, jun. 2015.
- Mansi, I.; Frei, C.R.; Pugh, M.J.; Mortensen, E.M. Psychologic disorders and statin use: a propensity score-matched analysis. **Pharmacotherapy**. v.33(6), p.615-626, jun/abr, 2013.
- Maragakis, N.J.; Rothstein, J.D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nat Clin Pract Neurol**. v. 2(12), p. 679-89, dez. 2006.
- Martins, W.C.; dos Santos, V.V.; dos Santos, A.A.; Vandresen-Filho, S.; Dal-Cim, T.A.; de Oliveira, K.A., Mendes-de-Aguiar, C.B.; Farina, M.; Prediger, R.D.; Viola, G.G.; Tasca, C.I. Atorvastatin Prevents Cognitive Deficits Induced by Intracerebroventricular Amyloid- $\beta_{1-40}$  Administration in Mice: Involvement of Glutamatergic and Antioxidant Systems. **Neurotox Res**. v.28(1), p.32-42, jul-abr. 2015.
- Mathers, C.D.; Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**. v.3(11), p.442, nov. 2006.
- Mayanagi, K.; Katakam, P.V.; Gáspár, T.; Domoki, F.; Busija, D.W. Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab**. v.28 (12), p.1927–1935, dez/jul. 2008.
- McGuinness, B.; Craig, D.; Bullock, R.; Passmore, P. Statins for the prevention of dementia. **Cochrane Database Syst Rev**. v.4(1), p.1-74, jan. 2016.
- McIntyre, R.S.; Fallu, A.; Konarski, J. Z. Measurable outcomes in psychiatric disorders: remission as a marker of wellness. **Clin Ther**, v.28, p. 1882-1891, nov. 2006.
- McIntyre, R.S.; Woldeyohannes, H.O.; Soczynska, J.K.; Maruschak, N.A.; Wium-Andersen, I.K.; Vinberg, M.; Cha, D.S.; Lee, Y.; Xiao, H.X.; Gallagher, L.A.; Dale, R.M.; Alsuwaidan, M.T.; Mansur, R.B.; Muzina, D.J.; Carvalho, A.F.; Jerrell, J.M.; Kennedy, S.H. Anhedonia and cognitive function in adults with MDD: results from the

International Mood Disorders Collaborative Project. **CNS Spectr.** v.30, p.1-5, dez. 2015.

Mehta, A.; Prabhakar, M.; Kumar, P.; Deshmukh, R.; Sharma, P.L. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology.** v.698, p.6–18, jan/out. 2013

Meijer, P.; Oyen, W.J.; Dekker, D.; van den Broek, P.H.; Wouters, C.W.; Boerman, O.C.; Scheffer, G.J.; Smits, P.; Rongen, G.A. Rosuvastatin increases extracellular adenosine formation in humans in vivo: a new perspective on cardiovascular protection. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.29(6), p.963-968, jun/abr. 2009.

Meijer, P.; Wouters, C.W.; van den Broek, P.H.; de Rooij, M.; Scheffer, G.J.; Smits, P.; Rongen, G.A. Upregulation of ecto-5'-nucleotidase by rosuvastatin increases the vasodilator response to ischemia. **Hypertension.** v.56(4), p.722-727, out/ago. 2010.

Merla, R.; Ye, Y.; Lin, Y.; Manickavasagam, S.; Huang, M.H.; Perez-Polo, R.J.; Uretsky, B.F.; Birnbaum, Y. The central role of adenosine in statin-induced ERK1/2, Akt, and eNOS phosphorylation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.293(3), p. H1918-1928, set/jul. 2007.

Metti, A.L.; Cauley, J.A.; Newman, A.B.; Ayonayon, H.N.; Barry, L.C.; Kuller, L.M.; Satterfield, S.; Simonsick, E.M.; Yaffe, K. Plasma beta amyloid level and depression in older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v.68(1), p.74-79, jan/abr, 2013.

Milanese, M.; Tardito, D.; Musazzi, L.; Treccani, G.; Mallei, A.; Bonifacino, T.; Gabriel, C.; Mocaer, E.; Racagni, G.; Popoli, M.; Bonanno, G. Chronic treatment with agomelatine or venlafaxine reduces depolarization-evoked glutamate release from hippocampal synaptosomes. **BMC Neurosci.** v.14(75), p.1-6, jul. 2013.

Millan, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol.** v.500(1-3), p.371-384, out. 2004.

Ministério da Saúde (Brasil). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em dezembro de 2015.

Molz, S.; Decker, H.; Dal-Cim, T.; Cremonez, C.; Cordova, F.M.; Leal, R.B.; Tasca, C.I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. **Neurochem Res.** v.33, p.27-36, jan/jul. 2008.

Moncada, S.; Bolaños, J.P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J. Neurochem.** v.97, p.1676–1689, jun. 2006.

Montgomery, S.A.; Kasper, S. Comparison of compliance between serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants: a meta-analysis. **Int Clin Psychopharmacol Suppl** v.4, p.33–40, jan. 1995.

Moretti, M.; Colla, A.; de Oliveira Balen, G. dos Santos, D.B.; Budni, J.; de Freitas, A.E.; Farina, M.; Severo Rodrigues, A.L. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res.** v.43(3), p.331-340, mar. 2012.

Moretti, M.; Budni, J.; Freitas, A.E.; Rosa, P.B.; Rodrigues, A.L. Antidepressant like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res.** v.48, p.16–24, jan/out. 2014.

Mufson, E.J.; Counts, S.E.; Fahnestock, M.; Ginsberg, S.D. Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. **Curr Alzheimer Res.** v.4, p.340–350, set. 2007.

Muldoon, M.F.; Barger, S.D.; Ryan, C.M.; Flory, J.D.; Lehoczky, J.P.; Matthews, K.A.; Manuck, S.B. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. **Am J Med.** v.108(7), p.538-546, mai. 2000.

Mullard, A. 2012 FDA drug approvals. **Nat Rev Drug Discov.** v.12(2), p.87-90, fev. 2013.

Munhoz, T.N.; Nunes, B.P.; Wehrmeister, F.C.; Santos, I.S.; Matijasevich, A. A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J Affect Disord.** v.1, p.226-233, mar/dez. 2016.

Murray, C. J.; Lopez, A. D. Evidence-based health policy — lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**. v.274, p.740–743, nov. 1996.

Musazzi, L.; Milanese, M.; Farisello, P.; Zappettini, S.; Tardito, D.; Barbiero, V.S.; Bonifacino, T.; Mallei, A.; Baldelli, P.; Racagni, G.; Raiteri, M.; Benfenati, F.; Bonanno, G.; Popoli, M. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. **PLoS One**. v.5(1), p.1-11, jan. 2010.

Mussoni, L.; Banfi, C.; Sironi, L.; Arpaia, M.; Tremoli, E. Fluvastatin inhibits basal and stimulated plasminogen activator inhibitor 1, but induces tissue type plasminogen activator in cultured human endothelial cells. **Thromb Haemost**. v.84(1), p.59-64, jul. 2000.

Nagahara, A.H.; Merrill, D.A.; Coppola, G.; Tsukada, S.; Schroeder, B.E.; Shaked, G.M.; Wang, L.; Blesch, A.; Kim, A.; Conner, J.M.; Rockenstein, E.; Chao, M.V.; Koo, E.H.; Geschwind, D.; Masliah, E.; Chiba, A.A.; Tuszynski, M.H. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. **Nat Med**. v.15(3), p.331-337, mar/fev. 2009.

Namekawa, Y.; Baba, H.; Maeshima, H.; Nakano, Y.; Satomura, E.; Takebayashi, N.; Nomoto, H.; Suzuki, T.; Arai, H. Heterogeneity of elderly depression: Increased risk of Alzheimer's disease and A $\beta$  protein metabolism. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.4, p.203–208, jun/dez. 2013.

Nemeroff, C.B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**. v.41, p.189-206, abr/jun. 2007.

Nestler, E.J.; Barrot, M.; Dileone, R.J.; Eisch, A.J.; Gold, S.J.; Monteggia, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**. v.34, p.13–25, mar. 2002.

Nicholls, D.G.; Ward, M.W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. **Trends Neurosci**. v.23, p.166–174, abr. 2000.

Niciu, M.J.; Kelmendi, B.; Sanacora, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 100(4), p.656-664, fev. 2012.

Nowak, G.; Trullas, R.; Layer, R.T.; Skolnick, P.; Paul, I.A. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. **J Pharmacol Exp Ther**. v.265(3), p.1380-1386, jun. 1993.

Nowak, G.; Legutko, B.; Skolnick, P.; Popik, P. Adaptation of cortical NMDA receptors by chronic treatment with specific serotonin reuptake inhibitors. **Eur J Pharmacol**. v.342(2-3), p.367-370, jan. 1998.

Olesen, J.; Leonardi, M. The burden of brain diseases in Europe. **Eur J Neurol**. v.10(5), p.471-477, set. 2003.

Opie, L.H. Can dementia be lessened by statins? **Lancet**. v.384(9947), p.61623-61628, set. 2014.

Ormiston, T.; Wolkowitz, O.M.; Reus, V.I.; Manfredi, F. Behavioral implications of lowering cholesterol levels: a double-blind pilot study. **Psychosomatics**. v.44(5), p.412-414, set/out. 2003.

Ortiz, R.; Ulrich, H.; Zarate, C.A.; Machado-Vieira, R. Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.57, p.117-131, set/nov. 2015.

Ovbiagele, B.; Saver, J.L.; Starkman, S.; Kim, D.; Ali, L.K.; Jahan, R.; Duckwiler, G.R.; Viñuela, F.; Pineda, S.; Liebeskind, D.S.; Statin enhancement of collateralization in acute stroke. **Neurology**. v.68 (24), p.2129-2131, jun. 2007.

Owens, M.J.; Nemeroff, C.B. Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter. **Gen. Chem**. v.40/2, p. 288-295, nov. 1994.

Pae, C.U. Comment on: the relationship between statins and depression: a review of the literature. **Expert Opin Pharmacother**. v.14(17), p.2449-2451, dez/set, 2013.



Paoletti, P.; Bellone, C.; Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 383-400, jun. 2013.

Parsaik, A.K.; Singh, B.; Murad, M.H.; Singh, K.; Mascarenhas, S.S.; Williams, M.D.; Lapid, M.I.; Richardson, J.W.; West, C.P.; Rummans, T.A. Statins use and risk of depression: a systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**. v.160, p.62-67, mai/dez, 2014.

Parsey, R.V.; Oquendo, M.A.; Simpson, N.R.; Ogden, R.T.; Van Heertum, R Arango, V. et al. Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding potential measured by PET using [C-11] WAY-100635. **Brain Res**. v.954, p.173–182, nov. 2002.

Paul, I.A.; Nowak, G.; Layer, R.T.; Popik, P.; Skolnick, P. Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. **J Pharmacol Exp Ther**. v.269(1), p.95-102, abr. 1994.

Paula-Lima, A.C.; Brito-Moreira, J.; Ferreira, S.T. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**. v.126, p.191-202, jul/mai. 2013.

Paulzen, M.; Veselinovic, T.; Gründer, G. Effects of psychotropic drugs on brain plasticity in humans. **Restor Neurol Neurosci**. v.32(1), p.163-181, jan. 2014.

Peng, S.; Wu, J.; Mufson, E.J.; Fahnstock, M. Precursor form of brain derived neurotrophic factor and mature brain derived neurotrophic factor are decreased in the pre clinical stages of Alzheimer's disease. **J Neurochem**. v.93, p.1412–1421, jun. 2005.

Pessoa, L. On the relationship between emotion and cognition. **Nat. Rev. Neurosc**. v.9, p.148-158, fev. 2008.

Phillis, J.W.; O'regan, M.H. Energy utilization in the ischemic/reperfused brain. **Int Rev Neurobiol**. v.51, p.377-414, 2002.

Picchini, A.M.; Manji, H.K.; Gould, T.D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**. v.1, p.419-428, 2004.

Piermartiri, T.C.B.; Vandresen-Filho, S.; Herculano, B.A.; Martins, W.C.; Dal'Agnolo, D.; Stroech, 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.** v.16, p.106-115, ago/mai. 2009.

Piermartiri, T.C.B.; Figueiredo, C.P.; Rial, D.; Duarte, F.S.; Bezerra, S.C.; Mancini, G.; De Bem, A.F.; Prediger, R.D.S.; Tasca, C.I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta_{1-40}$  administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v.226, p. 274-284, dez/set. 2010.

Pittenger, C.; Bloch, M.H.; Williams, K. Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment. **Pharmacol Ther.** v. 132(3), p.314-332. Dez/set. 2011.

Ponce, J.; de la Ossa, N.P.; Hurtado, O.; Millan, M.; Arenillas, J.F.; Dávalos, A.; Gasull, T. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol mediated effect in neuroprotection. **Stroke**. v.39, p.1269-1275, abr/mar. 2008.

Poon, W.W.; Blurton-Jones, M.; Tu, C.H.; Feinberg, L.M.; Chabrier, M.A.; Harris, J.W.; Jeon, N.L.; Cotman, C.W.  $\beta$ -Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. **Neurobiol Aging**. v.32(5), p.821-833, mai/jun. 2011.

Popa-Wagner, A.; Mitran, S.; Sivanesan, S.; Chang, E.; Buga, A.M. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2013 p.1-14, ago/nov. 2013.

Popoli, M.; Musazzi, L.; Perego, C.; Mallei, A.; Villa, A.; Milanese, M.; Treccani, G.; Tardito, D.; Corbelli, A.; Racagni, G.; Bonanno, G. Acute behavioural stress affects the readily releasable pool of vesicles in prefrontal/frontal cortex. **Soc. Neurosci. Abstr.** v.667, 2010.

Prince, M.; Patel, V.; Saxena, S.; Maj M.; Maselko, J.; Phillipi, M. R.; Rahman, A. No health without mental health. **Lancet**. v.370, p.859-877, 2007.

Quincozes-Santos, A.; Bobermin, L.D.; Tramontina, A.C.; Wartchow, K.M.; Tagliari, B.; Souza, D.O.; Wyse, A.T.S.; Gonçalves, C.A. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol. **Toxicology in Vitro**. v.28(4), p.544-551, jun/jan. 2014.

Racagni, G.; Popoli, M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. **Dialogues Clin Neurosci**. v.10, p. 385-400, dez. 2008.

Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M.N.; Naviliat, M.; Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radic.Biol.Med**. v.30, p.463-488, mar. 2001.

Rapp, M.A.; Schnaider-Beeri, M.; Grossman, H.T.; Sano, M.; Perl, D.P.; Purohit, D.P.; et al. Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression. **Arch Gen Psychiatry**. v.63, p.161-167, fev. 2006.

Renshaw, P.F.; Parsegian, A.; Yang, C.K.; Novero, A.; Yoon, S.J.; Lyoo, I.K.; Cohen, B.M. Carlezon, W.A. Lovastatin Potentiates the Antidepressant Efficacy of Fluoxetine in Rats. **Pharmacol Biochem Behav**. v.92(1), p.88-92, mar. 2009.

Roensch, J.; Crisby, M.; Nordberg, A.; Xiao, Y.; Zhang, L.; Guan, Z.Z. Effects of statins on alpha7 nicotinic receptor, cholinesterase and alpha-form of secreted amyloid precursor peptide in SH-SY5Y cells. **Neurochem Int**. v.50(6), p.800-806, mai/fev. 2007.

Rodrigues, A.L.; Rocha, J.B.; Mello, C.F.; Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**. v.79(3), p.150-156, set. 1996.

Rodrigues, A.L.; da Silva, G.L.; Mateussi, A.S.; Fernandes, E.S.; Miguel, O.G.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B.; Santos, A.R. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the

hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.** v.70(12), p.1347-1358, fev. 2002.

Rosenberg, P.B.; Drye, L.T.; Martin, B.K.; Frangakis, C.; Mintzer, J.E.; Weintraub, D.; et al. Sertraline for the treatment of depression in Alzheimer disease. **Am J Geriatr Psychiatry.** v.18(2), p.136–145, fev. 2010.

Roudier, E.; Mistafa, O.; Stenius, U. Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. **Mol Cancer Ther.** v.5(11), p.2706-2715, nov.2006.

Roy, A.; De Jong, J.; Linnoila, M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. **Arch Gen Psychiatry.** v.46, p.609–612, jul. 1989.

Sanacora, G.; Saricicek, A. GABAergic contributions to the pathophysiology of depression and the mechanism of antidepressant action. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets.** v.6, p.127-140, Abr. 2007.

Sanacora, G.; Zarate, C.A.; Krystal, J.H.; Manji, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov.** v.7(5), p.426-437, mai. 2008.

Sanacora, G.; Treccani, G.; Popoli, G. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology.** v.62, p.63-77, ago. 2012.

Sanches, M.; Keshavan, M.S.; Brambilla, P.; Soares, J.C. Neurodevelopmental basis of bipolar disorder: a critical appraisal. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v.32, p. 1617-1627, out/mai. 2008.

Sahay, A.; Hen, R. Hippocampal neurogenesis and depression. **Novartis Found Symp.** v.289, p.152-164, 2008.

Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol.** v.19, p.117-125, fev. 2004.

Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry.** v.122, p. 509-522, 1965.

Schinder, A.F.; Olson, E.C.; Spitzer, N.C.; Montal, M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J Neurosci.** v.16(19), p.6125-6133, out. 1996.

Schwartz, G.G.; Olsson, A.G.; Ezekowitz, M.D.; Ganz, P.; Oliver, M.F.; Waters, D.; Zeiher, A.; Chaitman, B.R.; Leslie, S.; Stem, T.; Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. **JAMA.** v.285, p.1711–1718, abr. 2001.

Sghendo, L.; Mifsud, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, p.317–325, nov. 2011.

Shahsavarian, A.; Javadi, S.; Jahanabadi, S.; Khoshnoodi, M.,; Shamsaee, J.; Shafaroodi, H.; Mehr, S.; Dehpour, A. Antidepressant-like effect of atorvastatin in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. **Eur J Pharmacol.** v.745, p.52-58, dez/out. 2014.

Shaltiel, G.; Chen, G.; Manji H.K. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Curr Opin Pharmacol.** v.7, p.22-26, fev. 2007.

Shitara, Y.; Sugiyama, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacology & Therapeutics.** v.112, p.71–105, 2006.

Shu, L.; Li, T.; Han, S.; Ji, F.; Pan, C.; Zhang, B.; Li, J. Inhibition of neuron-specific CREB dephosphorylation is involved in propofol and ketamine-induced neuroprotection against cerebral ischemic injuries of mice. **Neurochem Res.** v.37(1), p.49–58, jan/set, 2013.

Siegel, G.J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**. 7th ed., Elsevier Academic Press: Burlington, 2006.

Skolnick, P.; Layer, R.T.; Popik, P.; Nowak, G.; Paul, I.A.; Trullas, R. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. **Pharmacopsychiatry**. v.29(1), p.23-26, jan. 1996.

Skolnick, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**. v.375(1-3), p.31-40, jun.1999.

Smiałowska, M.; Szewczyk, B.; Woźniak, M.; Wawrzak-Wleciał, A.; Domin, H. Glial degeneration as a model of depression. **Pharmacol Rep**. v.65(6), p.1572-1579, 2013.

Smith, D.J. From depression to where are my keys: unlocking the behavioral disorders of old age. **Am J Geriatr Psychiatry**. v.14(12), p.989-992, dez. 2006.

Song, T.; Liu, J.; Tao, X.; Deng, J.G. Protection effect of atorvastatin in cerebral ischemia-reperfusion injury rats by blocking the mitochondrial permeability transition pore. **Genet Mol Res**. v. 13(4), p.10632-10642, dez. 2014.

Sparks, D.L.; Sabbagh, M.N.; Connor, D.J.; Lopez, J.; Launer, L.J.; Petanceska, S.; Browne, P.; Wassar, D.; Johnson-Traver, S.; Lochhead, J.; Ziolkowski C. Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. *Curr Alzheimer Res*. v.2(3), p.343-353, jul. 2005.

Sparks, D.L.; Connor, D.J.; Sabbagh, M.N.; Petersen, R.B.; Lopez, J.; Browne P. Circulating cholesterol levels, apolipoprotein E genotype and dementia severity influence the benefit of atorvastatin treatment in Alzheimer's disease: results of the Alzheimer's Disease Cholesterol-Lowering Treatment (ADCLT) trial. **Acta Neurol Scand Suppl**. v.185, p.3-7, 2006.

Spijker, J.; de Graaf, R.; Bijl, R.V. et al. Determinants of persistence of major depressive episodes in the general population. Results from the

Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). **J Affect Disord.** v. 81, p.231–240, 2004.

Stamler, J.S.; Lamas, S.; Fang, F.C. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell.** v.106, p.675–83, set. 2001.

Steru, L.; Chermat, R.; Thierry, B.; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** v.85, p.367–370, 1985.

Stewart, R.A.; Sharples, K.J.; North, F.M.; Menkes, D.B.; Baker, J.; Simes, J. Long-term assessment of psychological well-being in a randomized placebo-controlled trial of cholesterol reduction with pravastatin. The LIPID Study Investigators. **Arch Intern Med.** v.160(20), p.3144-3152, nov. 2000.

Stockmeier, C.A.; Shapiro, L.A.; Dilley, G.E.; Kolli, T.N.; Friedman, L.; Rajkowska, G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression postmortem evidence for decreased serotonin activity. **J Neurosci.**v.18, p.7394–7401, Set. 1998.

Sun, X.; Chiu, C.C.; Liebson, E.; Crivello, N.A.; Wang, L.; Claunch, J. et al. Depression and plasma amyloid beta peptides in the elderly with and without the apolipoprotein E4 allele. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** v.23, p.238–244, jul/set. 2009.

Suzuki, E.; Yagi, G.; Nakaki, T.; Kanba, S.; Asai, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **J. Affect Disord.** v.63, p.221–224, mar. 2001.

Svenningsson, P.; Greengard, P. p11 (S100A10)-an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.7, p.27-32, fev/nov. 2007.

Takamori, S. VGLUTs: ‘exciting’ times for glutamatergic research? **Neurosci Res.** v.55, p.343–351, ago/jun. 2006.

Taler, M.; Miron, O.; Gil-Ad, I.; Weizman, A. Neuroprotective and procognitive effects of sertraline: in vitro and in vivo studies. **Neurosci Lett.** v.29, p.93-97, ago/jul. 2013.

- Tang, B.L.; Liou, Y.C. Novel modulators of amyloid-beta precursor protein processing. **J Neurochem.** v.100(2), p.314-323, jan. 2007.
- Tani, H.; Dulla, C.G.; Farzampour, Z.; Taylor-Weiner, A.; Huguenard, J.R.; Reimerl, R.J. A Local Glutamate-Glutamine Cycle Sustains Synaptic Excitatory Transmitter Release. **Neuron.** v.81, p.888-900, fev/dez. 2014.
- Tizabi, Y. Duality of Antidepressants and Neuroprotectants. **Neurotox Res.** DOI 10.1007/s12640-015-9577-1. Set/nov. 2015
- Trivedi, M.; Rush, A.J.; Wisniewski, S.R.; et al. STAR\*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. **Am J Psychiatry.** v. 163, p.28-40, jan. 2006.
- Trullas, R.; Skolnick, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur. J. Pharmacol.** v.185, p.1-10, Ago. 1990.
- Tsai, S.-J.; Statins may enhance the proteolytic cleavage of proBDNF: Implications for the treatment of depression. **Medical Hypotheses.** v. 68, p.1296-1299, set. 2007.
- Tuccori, M.; Lapi, F.; Testi, A.; Coli, D.; Moretti, U.; Vannacci, A.; Motola, D.; Salvo, F.; Rivolta, A.L.; Blandizzi, C.; Mugelli, A.; Del Tacca, M. Statin-associated psychiatric adverse events: a case/non-case evaluation of an Italian database of spontaneous adverse drug reaction reporting. **Drug Saf.** v.31(12), p.1115-1123, 2008.
- Üstün, T.B.; Ayuso-Mateos, J.L.; Chatterji, S.; Mathers, C.; Murray, C.J. Global burden of depressive disorders in the year 2000. **Br J Psychiatry.** v.184, p.386-392, maio, 2004.
- Vajda, F.J. Neuroprotection and neurodegenerative disease. **J Clin Neurosci.** v.9(1), p.4-8, jan. 2002.
- Van der Most, P.J.; Dolga, A.M.; Nijholt, I.M.; Luiten, P.G.; Eisel, U.L. Statins: mechanisms of neuroprotection. **Prog Neurobiol.** v.88(1), p.64-75, mai/fev. 2009.



Van de Velde, S.; Bracke, P.; Levecque, K. Gender differences in depression in European countries. Cross-national variation in the gender gap in depression. **Soc Sci Med.** v.71(2), p.305-313, jul. 2010.

Vandresen-Filho, S.; Martins, W.C.; Bertoldo, D.B.; Mancini, G.; Herculano, B.A.; de Bem, A.F.; Tasca, C.I. Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Neurochem Int.** v.62(7), p.948-955, jun/mar. 2013.

Xu, Y.;Cao, D.H.; Wu, G.M.; Hou, X.Y. Involvement of P38MAPK activation by NMDA receptors and non-NMDA receptors in amyloid- $\beta$  peptide-induced neuronal loss in rat hippocampal CA1 and CA3 subfields. **Neurosci Res.** v.85, p.51-57, ago/jun. 2014.

Walsh, D.M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J.V.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. **Biochem Soc Trans.** v.30(4), p.552-557, ago. 2002.

Wang, Y.; Qin, Z-H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis.** v.15, p.1382–1402, mar. 2010.

Wang, Q.; Yan, J.; Chen, X.; Li, J.; Yang, Y.; Weng, J.P.; Deng, C.; Yenari, M.A. Statins: Multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurology.** v.230, p.27–34, ago. 2011.

Wang, Y.Q.; Tu, Z.C.; Xu, X.Y.; Li, R.; Qu, W.M.; Urade, Y.; Huang, Z.L. Acute administration of fluoxetine normalizes rapid eye movement sleep abnormality, but not depressive behaviors in olfactory bulbectomized rats. **J Neurochem.** v.120(2), p.314-324, jan/nov. 2012.

Wardle, J.; Armitage, J.; Collins, R.; Wallendszus, K.; Keech, A.; Lawson A. Randomised placebo controlled trial of effect on mood of lowering cholesterol concentration. Oxford Cholesterol Study Group. **BMJ.** v.313(7049), p.75-78, jul. 1996.

Whitlock, J.R.; Heynen, A.J.; Shuler, M.G.; Bear, M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science.** v.313, p.1093–1097, ago. 2006.

Wirleitner, B.; Sperner-Unterweger, B.; Fuchs, D. Statins to reduce risk of depression. *J Am Coll Cardiol*. v.43(6), p.1132-1133, mar. 2004.

Wong, D.T.; Perry, K.W.; Bymaster, F.P. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews*. v.4, p. 764-774, Set. 2005.

Wu, H.; Lu, D.; Jiang, H.; Xiong, Y.; Qu, C.; Li, B.; Mahmood, A.; Zhou, D.; Chopp, M. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. v.25, p.130–139, fev. 2008.

Wu, C.K.; Yang, Y.H.; Lin, T.T.; Tsai, C.T.; Hwang, J.J.; Lin, J.L.; Chen, P.C.; Chiang F.T.; Lin, L.Y. Statin use reduces the risk of dementia in elderly patients: a nationwide data survey and propensity analysis. *J Intern Med*. v.277(3), p.343-352, mar/mai. 2015.

Wuwongse, S.; Cheng, S.S.; Wong, G.T.; Hung, C.H.; Zhang, N.Q.; Ho, Y.S.; Law, A.C.; Chang, R.C. Effects of corticosterone and amyloid-beta on proteins essential for synaptic function: implications for depression and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. v.1832(12), p.2245-2256, dez/ago. 2013.

Yamada, K.; Kobayashi, M.; Kanda, T. Involvement of adenosine A<sub>2</sub>A receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol*. v.119, p.373–393, 2014.

Yang, C.C.; Jick, S.S.; Jick, H. Lipid-Lowering drugs and the risk of depression and suicidal behavior. *Arch Intern Med*. v.163, p.1926-1932, set. 2003.

Yang, D.; Han, Y.; Zhang, J.; Chopp, M.; Seyfried, D.M. Statins Enhance Expression of Growth Factors and Activate the PI3K/Akt-mediated Signaling Pathway after Experimental Intracerebral Hemorrhage. *World J Neurosci*. v.29(2), p.74-80, mai. 2012.

Ye, Y.; Abu Said, G.H.; Lin, Y.; Manickavasagam, S.; Hughes, M.G.; McAdoo, D.J.; Perez-Polo, R.J.; Birnbaum, Y. Caffeinated coffee blunts the myocardial protective effects of statins against ischemia-

reperfusion injury in the rat. **Cardiovasc Drugs Ther.** v.22(4), p.275-282, ago/mar. 2008.

Yoon, H.K.; Kim, Y.K. Association between glycogen synthase kinase-3beta gene polymorphisms and major depression and suicidal behavior in a Korean population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v.34(2), p.331-334, mar/dez. 2009.

You, H.; Lu, W.; Zhao, S.; Hu, Z.; Zhang, J. The relationship between statins and depression: a review of the literature. **Expert Opin Pharmacother.** V.14(11), p.1467-1476, ago/jun. 2013.

Young-Xu, Y.; Chan, K.A.; Liao, J.K.; Ravid, S.; Blatt, C.M. Long-term statin use and psychological well-being. **J Am Coll Cardiol.** v.20, p.690-697, ago. 2003.

Zacco, A.; Togo, J.; Spence, K.; Ellis, A.; Lloyd, D.; Furlong, S.; Piser, T. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Protect Cortical Neurons from Excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience,** v.35, p.11104–11111, dez. 2003.

Zarate, Jr. C.A.; Singh, J.B.; Carlson, P.J.; Brutsche, N.E.; Ameli, R.; Luckenbaugh, D.A.; et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry.** v.63, p.856–864, ago. 2006.

Zhang, L.; Zhang, Z.G.; Liu, X.S.; Hozeska-Solgot, A.; Chopp, M. The PI3K/Akt pathway mediates the neuroprotective effect of atorvastatin in extending thrombolytic therapy after embolic stroke in the rat. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.27, p.2470–2475, nov/ago. 2007.

Zhang, J.; Huang, X.Y.; Ye, M.L.; Luo, C.X.; Wu, H.Y.; Hu, Y.; Zhou, Q.G.; Wu, D.L.; Zhu, L.J.; Zhu, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. **J. Neurosci.** v.30, p.2433–2441, fev. 2010.

Zhang, Q.; Yang, Y.J.; Wang, H.; Dong, Q.T.; Wang, T.J.; Qian, H.Y.; Xu, H. Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated protein kinase/mammalian

target of rapamycin pathway. **Stem Cells Dev.** v.21(8), p.1321-1332, mai/mar. 2012.

Zhang, Y.Y.; Fan, Y.C.; Wang, M.; Wang, D.; Li, X.H. Atorvastatin attenuates the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in the hippocampus of an amyloid  $\beta$ 1-42-induced rat model of Alzheimer's disease. **Clinical Interv Aging.** v.8, p.103-110, jan. 2013.

Zhao, Q.F.; Tan, L.; Wang, H.F.; Jiang, T.; Tan, M.S.; Tan, L.; Xu, W.; Li, J.Q.; Wang, J.; Lai, T.J.; Yu, J.T. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord.** v.15 (190), p.264-271, jan/out, 2016.

Zlomuzica, A.; Burghoff, S.; Schrader, J.; Dere, E. Superior working memory and behavioural habituation but diminished psychomotor coordination in mice lacking the ecto-5'-nucleotidase (CD73) gene. **Purinergic Signal.**v.9(2), p.175-82, jun/dez. 2013.

Zureik, M.; Courbon, D.; Ducimetière, P. Serum cholesterol concentration and death from suicide in men: Paris prospective study I. **BMJ.** v.313(7058), p.649-651, set. 1996.

**ANEXOS**



## ANEXO A: Trabalhos realizados em colaboração durante o período de execução do doutorado

- **Artigos publicados como co-autor:**

- Dal-Cim T; Ludka FK; Martins WC; Reginato C; Parada E; Egea J; López MG; Tasca CI. *Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotectio of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions*. **Journal of Neurochemistry**. v.126, p.437-450, 2013.

- Cunha MP; Saavedra MDM; Romero A; Egea J; Ludka FK; Tasca CI; Farina M; Rodrigues ALS; Lopez MG. *Both creatine and its product phosphocreatine reduce oxidative stress and afford neuroprotection in an in vitro Parkinson´s mode*. **ASN Neuro**, 2014.

- Molz S, Olescowicz G, Kraus JR, Ludka FK, Tasca CI. *Purine receptors are required for DHA-mediated neuroprotection against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices*. **Purinergic Signal**. 2015.

- Cunha MP1, Pazini FL, Ludka FK, Rosa JM, Oliveira Á, Budni J, Ramos-Hryb AB, Lieberknecht V, Bettio LE, Martín-de-Saavedra MD, López MG, Tasca CI, Rodrigues AL. *The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is implicated in the anti-immobility effect of creatine in the tail suspension test*. **Amino Acids**. 2015

- Constantino LC; Pamplona FA; Matheus FC; Ludka FK; Ciruela F; Boeck CR; Prediger RDS; Tasca CI. *Adenosine A1 receptor activation modulates N-methyl-d-aspartate (NMDA) preconditioning phenotype in the brain*. **Behav Brain Res**. 2015.

- Cunha MP; Budni J; Ludka FK; Pazini FL; Rosa JM; Oliveira A; Lopes MW; Tasca CI; Leal RB; Rodrigues ALS. *Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine*. **Mol Neurobiol**. 2015.

- Cunha MP; Lieberknecht V; Ramos-Hryb AB; Olescowicz G; Ludka FK; Tasca CI; Gabilan NH; Rodrigues AL. *Creatine affords protection against glutamate-induced nitrosative and oxidative stress.* **Neurochem Int.** 2016.