

Wagner Carbolin Martins

**Estudo do efeito protetor da atorvastatina e dos eventos iniciais da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) em camundongos.**

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

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

Florianópolis  
2017

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

Martins, Wagner

Estudo do efeito protetor da atorvastatina e dos eventos iniciais da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta_{1-40}$ ) em camundongos / Wagner Martins ; orientador, Carla Inês Tasca, 2017.  
85 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

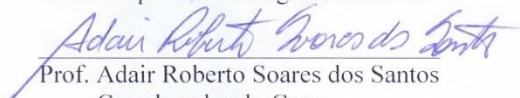
1. Neurociências. 2. doença de Alzheimer. 3. peptídeo  $\beta$ -amilóide. 4. estresse oxidativo. 5. neuroproteção. I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

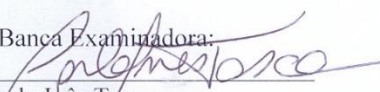
**WAGNER CARBOLIN MARTINS**

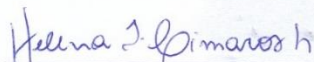
**“ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DA ATORVASTATINA  
E DOS EVENTOS INICIAIS DA NEUROTOXICIDADE  
INDUZIDA PELO PEPTÍDEO  $\beta$ -AMILÓIDE ( $A\beta_{1-40}$ ) EM  
CAMUNDONGOS”**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e  
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina

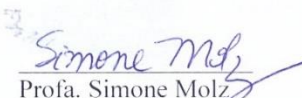
Florianópolis, 08 de agosto de 2017.

  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:  
  
Prof. Carla Inês Tasca  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Helena Iturvides Cimarosti  
Membro - UFSC

  
Prof. Marcelo Farina  
Membro – UFSC

  
Prof. Simone Molz  
Membro externo



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à minha família, meu pai, Múcio, minha mãe Margareth e minha irmã Lizia por todo o amor e apoio.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Inês Tasca, pela experiência, oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência e principalmente por não ter desistido de mim durante esse período de minha vida.

Aos amigos de dentro e fora do laboratório que de alguma forma ajudaram a completar este trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

.  
.  
.  
.  
.  
.  
.  
.  
.  
.



## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurológica que afeta grande parte da população mundial. É caracterizada por perda de memória, demência progressiva, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Histopatologicamente, a DA apresenta a formação de placas pela agregação de peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares, devido à hiperfosforilação da proteína tau. O objetivo deste estudo foi investigar alterações na expressão gênica e proteica envolvidas na DA e avaliar os mecanismos envolvidos em eventos iniciais da toxicidade do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  após infusão intracerebroventricular (i.c.v.). Além disto, avaliar se o pré-tratamento com atorvastatina previne os efeitos tóxicos deste peptídeo. Camundongos albinos Swiss machos adultos foram tratados com atorvastatina 10 mg/kg/dia, oralmente, ou veículo (solução salina, 0,9%) durante 7 dias. No sétimo dia a forma agregada de  $A\beta_{1-40}$  (i.c.v., 400 pmol/sítio) ou salina (veículo) foi administrada. Após 24h, os animais foram eutanasiados para as análises bioquímicas. Os resultados mostram que a atorvastatina é capaz de prevenir a redução da expressão gênica da proteína pós-sináptica PSD-95, da subunidade GluN1 do receptor NMDA e dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1 provocados pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo. O  $A\beta$  promoveu diminuição na expressão proteica de BDNF e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). O pré-tratamento com atorvastatina foi capaz de reduzir o aumento de EROs e ERNs. Através da avaliação da funcionalidade mitocondrial por respirometria de alta resolução, observamos que o  $A\beta_{1-40}$  não alterou significativamente parâmetros de consumo de oxigênio. No entanto, a atorvastatina aumentou a capacidade respiratória mitocondrial avaliada em homogenatos de hipocampo. Em conclusão, observamos que a toxicidade do  $A\beta_{1-40}$  apresenta como eventos iniciais alterações em proteínas da neurotransmissão glutamatérgica e estresse oxidativo. A atorvastatina previne o estresse oxidativo inicial e aumenta a capacidade respiratória mitocondrial, por um mecanismo de ação ainda não elucidado e que necessita estudos adicionais.

**Palavras-chave:** atorvastatina, peptídeo  $\beta$ -amilóide, doença de Alzheimer, transmissão glutamatérgica, estresse oxidativo, neuroproteção.





## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder that affects a large part of the world's population. It is characterized by memory loss, progressive dementia, behavioral changes and inability to perform routine activities. Histopathologically, AD presents the formation of plaques by the aggregation of amyloid- $\beta$  peptides ( $A\beta$ ) and neurofibrillary tangles, due to hyperphosphorylation of tau protein. The aim of this study was to investigate alterations in gene and protein expression related to AD and to evaluate the mechanisms involved in initial events of  $A\beta_{1-40}$  peptide toxicity after intracerebroventricular (i.c.v.) infusion. In addition, it was evaluated whether pre-treatment with atorvastatin prevents the toxic effects of this peptide. Adult male Swiss albino mice (3 months / 40-50g) were treated with atorvastatin 10 mg / kg / day, orally, or vehicle (0.9% saline) for 7 days. On the seventh day the aggregate form of  $A\beta_{1-40}$  (i.c.v., 400pmol / site) or saline was administered. After 24h, the animals were euthanized for biochemical analysis. The results show that atorvastatin is able to prevent the gene expression reduction of the postsynaptic protein PSD-95, the NMDA receptor GluN1 subunit and glutamatergic transporters GLAST and GLT-1 induced by  $A\beta_{1-40}$  infusion in the hippocampus.  $A\beta$  promoted a decrease in BDNF expression and an increase in reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species levels. Pretreatment with atorvastatin was able to prevent the increased ROS and RNS. Through the evaluation of mitochondrial functionality by high resolution respirometry, we observed that  $A\beta_{1-40}$  did not significantly alter parameters of oxygen consumption. However, atorvastatin increased the mitochondrial respiratory capacity assessed in hippocampal homogenates. In conclusion, we observed that  $A\beta_{1-40}$  toxicity presents as initial events changes in proteins related to glutamatergic neurotransmission and oxidative stress. Atorvastatin prevents initial oxidative stress and increases mitochondrial respiratory capacity by an as yet unknown action mechanism, requiring further studies.

**Keywords:** atorvastatin, amyloid- $\beta$  peptide, Alzheimer's disease, glutamate transmission, oxidative stress, neuroprotection.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Formação do <math>\beta</math>-amilóide.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2. Transmissão glutamatérgica na doença de Alzheimer.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3. Visão geral da patogênese da doença de Alzheimer.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. Efeitos neuroprotetores da atorvastatina.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5. Conformação da agregação do peptídeo <math>\beta</math>-amilóide<sub>1-40</sub>.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Visão geral da sequência dos procedimentos experimentais.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7. Avaliação dos níveis de RNAm de GluN1 e PSD-95 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 8. Avaliação dos níveis de RNAm de NOS1 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 9. Avaliação dos níveis de RNAm de BDNF em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 10. Avaliação dos níveis de RNAm de GLAST e GLT-1 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 11. Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 12. Avaliação dos níveis de sinaptofisina, PSD-95 e doublecortina no hipocampo de camundongos submetidos a pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 13. Avaliação dos níveis de EROs, NO e NOS2 no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>54</b>

<b>Figura 14. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial e da atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 15. Padrão de respiração do grupo controle.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 16. Avaliação do consumo de oxigênio no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de <math>A\beta_{1-40}</math>.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 17. Efeitos da atorvastatina e <math>A\beta_{1-40}</math> em células do sistema nervoso.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$ :  $\beta$ -amilóide

AICD: Domínio intracelular da APP

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amilóide

BACE1:  $\beta$ -secretase

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

COX-2: Ciclooxygenase-2

DA: Doença de Alzheimer

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GLAST: Transportador de glutamato e aspartato

GLT-1: Transportador de glutamato-1

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

HBSS: Solução salina balanceada de Hank

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

i.c.v.: Intracerebroventricular

IL-6: Interleucina-6

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$

KA: Ácido caínico

KRB: Krebs-Ringer bicarbonato

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NOS1: Óxido nítrico sintase neuronal

NOS2: Óxido nítrico sintase induzível

PBS: Tampão de fosfato salina

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

SOD: Superóxido dismutase

SNC: Sistema nervoso central

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral- $\alpha$

v.o.: Via oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	21
1.2 GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE	25
1.3 NEUROTROFINAS	26
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO	28
1.5 COLESTEROL	30
1.6 ATORVASTATINA	31
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS I	35
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS II	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1 ANIMAIS	37
4.2 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	37
4.3 ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	39
4.4 RT-PCR QUANTITATIVA	40
4.5 PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE HIPOCAMPO PARA ENSAIO COM SONDAS FLUORESCENTES	41
4.6 SONDAS FLUORESCENTES	41
4.7 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS	42
4.8 PREPARAÇÕES DOS HOMOGENATOS DE HIPOCAMPO PARA AS AVALIAÇÕES DE FUNÇÃO MITOCONDRIAL	42
4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I	43
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II	43
4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO IV	44
4.12 CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	44
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
5.1 RESULTADOS REFERENTES AOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS I DA TESE	46
5.2 RESULTADOS REFERENTES AOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS II DA TESE	50
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	<b>70</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>





# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurológica que afeta grande parte da população mundial, em especial pessoas idosas. Em 2015, foi estimado que 46,8 milhões de pessoas foram diagnosticadas com essa condição em todo o mundo e prognósticos prevêm que este número duplicará a cada 20 anos, atingindo cerca de 74,7 milhões de pessoas até 2030 e 131,5 milhões até 2050 (Prince et al., 2015). Atualmente estão disponíveis apenas tratamentos sintomáticos para esta doença, portanto a identificação de mecanismos envolvidos na mesma e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DA representam alvos urgentes de investigação, a fim de promover uma melhora no tratamento das deficiências cognitivas causadas pela DA, ou eventualmente, a identificação de fármacos que previnam ou reduzam a progressão desta enfermidade degenerativa.

A DA é caracterizada por perda de memória, demência progressiva, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Foi descrita inicialmente em 1906, pelo médico alemão Alois Alzheimer, que viria mais tarde descrever também os aspectos histopatológicos da doença, que consistem em duas particularidades conhecidas atualmente: (1) formação de placas senis promovidas pela agregação de peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e (2) emaranhados neurofibrilares induzidos pela hiperfosforilação da tau, proteína associada aos microtúbulos (Grundke-Iqbal et al., 1986; Haass & Selkoe, 2007). Ainda não se conhece todos os detalhes do mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo  $A\beta$ . A deposição dos peptídeos  $A\beta$  e a ativação de células gliais ao redor das placas senis em áreas cerebrais envolvidas em funções cognitivas, parecem ser os responsáveis pelo início de uma cascata de eventos que resultam em disfunção e perda sináptica, levando a subsequente morte neuronal (Master & Selkoe, 2012; Karran & De Strooper, 2016).

A DA é resultante de uma combinação de fatores ambientais e genéticos. A forma esporádica da doença representa cerca de 90-95% dos casos. O avanço da idade, bem como fatores externos, como sexo feminino, depressão, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, hiperinsulinemia, tabagismo, sedentarismo, dieta rica em gorduras e fatores genéticos (Hazar et al., 2016) são considerados os principais fatores de risco que podem aumentar o risco associado à doença. A

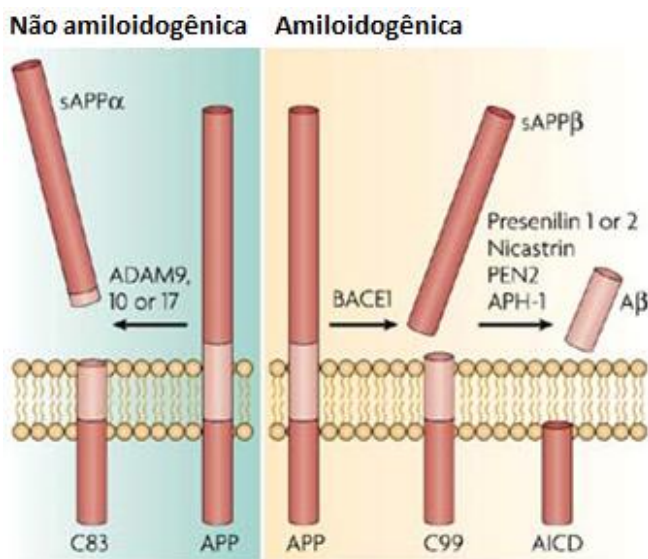
forma genética da DA tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente ocorrem antes dos 65 anos de idade, sendo considerada mais rara (5-10% dos casos) (Poirier, 2005). Neste caso, estudos apontam a presença de mutações em genes codificadores para a proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amilóide (APP), presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), proteínas associadas com a formação dos fragmentos tóxicos de amilóide, bem como a apolipoproteína E (ApoE) (alelo  $\epsilon 4$ ) e a proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) como os principais responsáveis pelos casos da forma familiar da DA (Levy-Lahad et al., 1995; Blennow et al., 2006).

As placas senis e os emaranhados neurofibrilares podem ser encontrados normalmente em humanos durante o envelhecimento, porém em menor quantidade e distribuição menos extensa quando comparados com os pacientes portadores de DA (Walsh & Selkoe, 2004). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente, nas regiões do cérebro envolvidas no aprendizado, memória e comportamento emocional, como o córtex, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004).

A proteína tau tem como função facilitar a polimerização da tubulina na célula, de maneira que se formem os microtúbulos. Nos emaranhados neurofibrilares a agregação de tau se dá pela fosforilação irreversível sofrida por essa proteína. Isso impede a sua função normal e por vez facilita sua agregação em fibrilas. O efeito destes eventos é a alteração da estrutura dos microtúbulos que junto com o empacotamento da proteína tau provoca implicações no mecanismo de transporte neuronal. Foi demonstrado que a acumulação de  $A\beta$  pode levar a patologia tau *in vivo* em camundongos (Lee et al., 2006).

A formação do  $A\beta$  ocorre a partir de uma clivagem proteolítica da glicoproteína transmembrana APP (Fig. 1). Essa clivagem pode ser mediada por três enzimas, sendo elas a  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -secretases (Haas & Selkoe, 2007). A clivagem da APP pela  $\alpha$ -secretase seguido por clivagem da  $\gamma$ -secretase, acarreta na formação de três proteínas, sendo elas a  $sAPP\alpha$ ,  $p3$  e um domínio intracelular da APP (AICD), que estão relacionadas a processos de neuroproteção e neuroplasticidade. Em situação patogênica, a APP é clivada pela  $\beta$ -secretase e em seguida pela  $\gamma$ -secretase, ocorrendo também a formação de AICD. No entanto outros peptídeos resultantes desta clivagem, como  $sAPP\beta$  e  $A\beta$  possuem características tóxicas, sendo que as formas mais conhecidas deste peptídeo contêm principalmente 40 ou 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-40}$  ou  $A\beta_{1-42}$ ) (Chow et al., 2011). Estes peptídeos podem então se acumular e formar fibrilas e/ou outros agregados de baixo peso molecular (Fig. 1).

Atualmente, a forma oligomérica do A $\beta$  tem sido descrita como sendo relativamente solúvel e difusível, resultando em um aumento nos níveis de toxicidade (Karran et al., 2011). Além disso, tanto as formas fibrilares quanto as formas solúveis têm sido implicadas em várias disfunções celulares, como o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), a perda de homeostase do cálcio intracelular, a alteração em vias de sinalização celular, alterações em modificações pós-traducionais de proteínas, neuroinflamação e excitotoxicidade (Butterfield & Lauderback, 2002; Demuro et al, 2010; Masters & Selkoe, 2014).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 1. Formação do peptídeo  $\beta$ -amilóide.** O A $\beta$  é formado através da proteólise da proteína precursora de amiloide (APP), uma proteína transmembranar de tipo 1, que consiste de 695-770 aminoácidos. A APP pode ser submetida a processamento proteolítico por uma de duas vias. A maioria é processada através da via não-amiloidogênica, o que impede a formação de A $\beta$ . A primeira clivagem enzimática é mediada por  $\alpha$ -secretase, dos quais foram identificados três candidatos putativos que pertencem à família da Proteína Adam (ADAM). A clivagem pela  $\alpha$ -secretase ocorre dentro do domínio do A $\beta$ , evitando assim a geração e a liberação do peptídeo. Dois fragmentos são liberados, o ectodomínio maior (sAPP $\alpha$ ) e o fragmento menor do terminal

carboxi (C83), que é clivado pela  $\gamma$ -secretase para gerar P3 (não mostrado). Moléculas de APP clivadas pela  $\beta$ -secretase (BACE1), liberam um ectodomínio (sAPP $\beta$ ), e retem os últimos 99 aminoácidos da APP (conhecido como C99) no interior da membrana. O C99 é então clivado pelo complexo  $\gamma$ -secretase, que é composta de presenilina 1 ou 2, nicastrina, PEN2 e APH-1. Esta clivagem produz predominantemente A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>. AICD: domínio intracelular da APP; PEN2: potenciador de presenilina2 (LaFerla et al., 2007).

A deposição de peptídeos A $\beta$  em áreas do cérebro envolvidas em funções cognitivas, culminando em sua agregação em espécies oligoméricas e ativação de células gliais, podem iniciar a cascata que resulta em disfunção dos diversos processos celulares descritos anteriormente e perda sináptica. Estas disfunções são observadas tanto em modelos transgênicos de DA como em um modelo de indução de toxicidade através da infusão intracerebroventricular (i.c.v.) de A $\beta$ <sub>1-40</sub>, protocolo que mimetiza a fase inicial da DA (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008; Piermatiri et al., 2010; Martins et al., 2015). Mesmo sendo incapaz de induzir todas as características patológicas da DA, como placa amilóide e hiperfosforilação da tau (Van Dam & De Deyn, 2006; Takeda et al., 2009), essa infusão aguda de peptídeo A $\beta$  em cérebro de roedores vem sendo utilizada como um modelo experimental para a caracterização da toxicidade do A $\beta$ , induzindo uma resposta inflamatória associada a prejuízos cognitivos no aprendizado e memória (Martins et al., 2015).

O processo inflamatório está relacionado a diversas enfermidades neurodegenerativas. Uma disfunção na resposta imune pode levar a anormalidades como a degeneração neurofibrilar na DA. Foi observado que o peptídeo A $\beta$  pode induzir a expressão de citocinas como, interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em cultura de astrócitos, células microgliais (Gitter et al., 1995; Chong, 1997) e em modelos animais (Zhang et al., 2013). Além disso, outro trabalho mostra uma relação entre a ativação da via TNF- $\alpha$  e a expressão de óxido nítrico sintase induzível (NOS2), onde esta última encontra-se aumentada 24h após infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo e córtex pré-frontal (Medeiros et al., 2007). Essa liberação anormal de ILs pode afetar os padrões de fosforilação da proteína tau e outros eventos intracelulares ligados à neurodegeneração (Quintanilla et al., 2004).

Estudos recentes demonstram uma interação de oligômeros de A $\beta$  e receptores de insulina. A infusão i.c.v. deste peptídeo causa a inibição de receptores de insulina através de uma ativação da via de

sinalização do TNF- $\alpha$ , resultando em disfunção sináptica (Lourenço et al., 2013).

## 1.2 GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE

Glutamato é um aminoácido de fundamental importância para os seres vivos, participando na produção de metabólitos como o piruvato ou oxaloacetato, envolvidos em vias como a gliconeogênese e a glicólise. Além disso, atua como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e desempenha importante papel na manutenção da atividade nervosa central e fenômenos plásticos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória. O glutamato é sintetizado e estocado em neurônios especializados denominados glutamatérgicos e liberado sob diferentes estímulos na fenda sináptica, onde se une a uma série de receptores situados nas membranas pré e pós-sinápticas e também na astrogliia (Meldrum, 2000; Danbolt, 2001).

Existem dois tipos de receptores de glutamato: ionotrópicos, que formam canais iônicos e são subdivididos de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas, como os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido cáinico (KA) e os sensíveis ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropionico (AMPA) (Michaelis, 1998), e metabotrópicos, ligados às proteínas G. Aos receptores AMPA e cainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória.

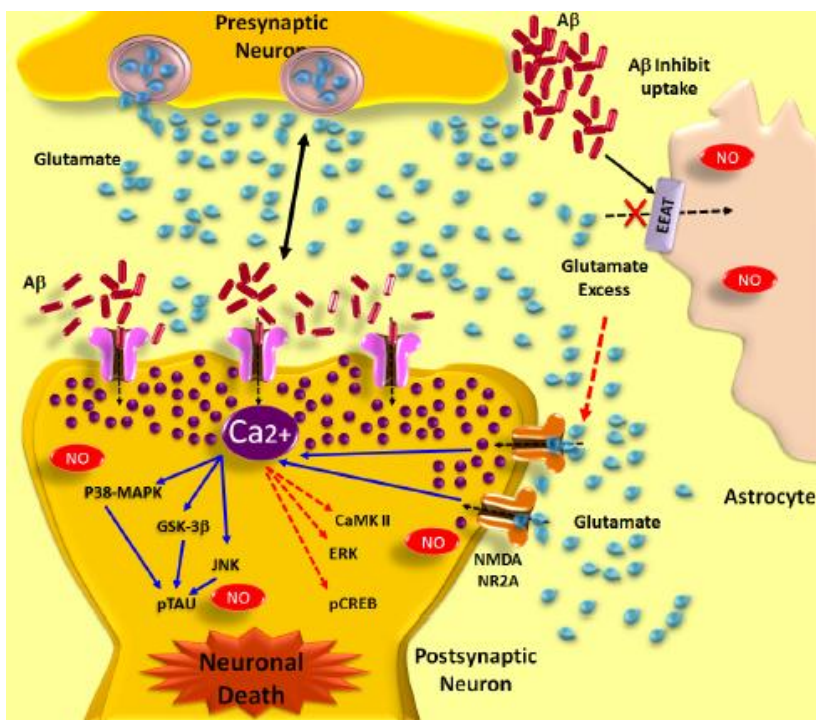
O glutamato liberado extracelularmente é inativado através da recaptação principalmente pelas células gliais, por um processo mediado por transportadores de alta afinidade (GLAST e GLT-1), o que pode ser modulado pelo estado redox da célula (Kim et al., 2011). Nos astócitos o glutamato retirado da fenda sináptica é convertido em glutamina através da enzima glutamina sintetase, podendo ser transportada aos neurônios para uma nova conversão a glutamato e futura neurotransmissão. Assim, a captação de glutamato é essencial para a finalização da transmissão sináptica durante condições fisiológicas (Danbolt, 2001; Bonde et al.,

2003), pois quando em excesso na fenda sináptica, o glutamato pode se tornar uma potente neurotoxina. As células neurais afetadas por essa excitotoxicidade glutamatérgica podem liberar glutamato em grandes quantidades através de processos não controlados que envolvem a liberação vesicular e/ou a reversão dos carreadores de membrana. Quando ocorre essa reversão dos carreadores, o glutamato em vez de ser captado é liberado para o meio, aumentando a sua concentração na fenda sináptica e consequentemente aumentando o dano celular (Grewer et al., 2008). Assim, o funcionamento adequado dos transportadores é essencial para manter os níveis extracelulares deste neurotransmissor suficientemente baixos, e dessa forma restringir a superestimulação dos receptores glutamatérgicos prevenindo o dano neuronal. A disfunção desses transportadores resulta em um acúmulo de glutamato na fenda sináptica induzindo um aumento no influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , os quais ativam processos intracelulares como hidrólise proteica, formação de EROs e peroxidação lipídica, desencadeando assim, a formação de uma “onda excitotóxica” que leva à morte das células neurais circundantes (Mark et al, 2001). A figura 2 ilustra uma transmissão glutamatérgica na DA.

### 1.3 NEUROTROFINAS

As neurotrofinas são fatores de crescimento envolvidos em diversas funções no sistema nervoso. Em 1949, após transplantar um fragmento de um tumor maligno em embriões de galinha, Rita Levi-Montalcini observou que o tecido cancerígeno estimulava o crescimento e a diferenciação de neurônios em desenvolvimento. A hipótese colocada foi a de que o tumor liberava um fator solúvel capaz de estimular o crescimento neuronal. Com a colaboração de Stanley Cohen, isolou e purificou o NGF (fator de crescimento do nervo) (Levi-Montalcini e Cohen, 1956). Posteriormente, foram identificadas outras neurotrofinas em mamíferos, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (Barde et al., 1982), a NT-3 (neurotrofina-3) (Hohn et al., 1990) e a NT-4 (neurotrofina-4) (Hallböök et al., 1991).

Estas moléculas têm um papel de destaque no SNC, na medida em que são mediadoras de diversas funções incluindo a regulação do crescimento axonal, modulação da atividade sináptica, diferenciação, mielinização, sobrevivência e regulação de morte neuronal. Alterações na sinalização mediada pelas neurotrofinas estão presentes em patologias neurodegenerativas, como na DA (Shin et al., 2014).



**Figura 2. Transmissão glutamatérgica na doença de Alzheimer.** Peptídeos Aβ aumentam a liberação pré-sináptica de glutamato juntamente com o bloqueio simultâneo da captação de glutamato por seus transportadores (EAAT) astrocitários, consequentemente aumentando a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica. Além disso, Aβ formam complexos com receptores nicotínicos alfa7, aumentando a liberação de glutamato. A ativação de receptores NMDA aumenta o influxo de cálcio, ativando vias de sinalização responsáveis pela redução neuronal e perda sináptica (p38-MAPK, GSK-3β, JNK), levando a fosforilação de tau e morte neuronal. Finalmente, há uma inibição das vias de sobrevivência (CAMK II, ERK, pCREB) (Campos-Peña e Meraz-Ríos 2014).

O BDNF é descrito como a neurotrofina mais abundante no SNC, tanto com relação à quantidade quanto à distribuição, sendo seus mais altos níveis encontrados no hipocampo, cerebelo e córtex. É sintetizado no retículo endoplasmático como uma proteína precursora que é convertida em pro-BDNF por remoção de um peptídeo sinal. Por fim, o pro-BDNF é clivado para gerar a forma madura/ativa desta

neurotrofina (BDNFm). Foi demonstrado que a infusão de BDNF *in vivo* em modelos de DA acarreta em uma melhora da disfunção cognitiva nestes animais (Iwasaki et al., 2012). Assim, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelas neurotrofinas, bem como as alterações das mesmas em situações de patologias, é fundamental para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Além disso, a proliferação de células progenitoras no cérebro adulto também é afetada por fatores de crescimento. Foi demonstrado que o pro-BDNF é capaz de inibir a proliferação neuronal e neurogênese no hipocampo de camundongos idosos, contribuindo para uma diminuição da cognição desses animais (Chen et al., 2015). Outro estudo mostram aumento de doublecortina, um marcador de neurogênese, em pacientes e em modelo de DA. Entretanto o avanço da doença não é revertido, muito provavelmente pela quantidade de perda neuronal ser maior que a neurogênese promovida ou pelo próprio microambiente dos cérebros acometidos pela DA serem tóxicos para as novas células geradas (Jin et al., 2004).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) são normalmente produzidos em níveis baixos e como importantes mensageiros fisiológicos da sinalização intracelular (Finkel, 2011). Contudo, a exposição a toxinas ou mesmo o processo normal de envelhecimento cerebral pode desencadear um desequilíbrio entre a produção de EROs/ERNs e a disponibilidade de sistemas de defesa celular, incluindo enzimas antioxidantes, glutatona e chaperonas, resultando em um aumento demasiado de EROs/ERNs que provocam estresse oxidativo e nitrosativo. O estresse oxidativo/nitrosativo por sua vez, parece influenciar em outras alterações celulares, incluindo perda sináptica e morte celular neuronal, sugerindo que essas vias podem ser um determinante comum da patogênese e progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA (Nakamura & Lipton, 2007).

Doenças neurodegenerativas com mutações genéticas hereditárias podem levar a aumento da produção basal de EROs/ERNs, tornando neurônios mais vulneráveis a estresse oxidativo/nitrosativo adicionais. A superexpressão de superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) em camundongos transgênicos Tg19959 que superexpressam APP mutante diminui a oxidação de proteínas e aumenta a capacidade de defesa antioxidante enquanto reduz a formação de placas amilóides e reestabelece déficits de memória (Dumont et al.,



2009). Além disso, a deleção da superóxido dismutase dependente de cobre/zinco (Cu-Zn-SOD, SOD1) em camundongos Tg2576 aumentam a oligomerização de A $\beta$  enquanto aceleram a perda de memória e aprendizagem neste modelo de DA (Murakami et al., 2011). Estes resultados sugerem que a produção de A $\beta$ /formação de placas, assim como oligomerização do A $\beta$  por estresse oxidativo é importante para a iniciação e desenvolvimento da DA. O aumento do estresse oxidativo na DA pode ativar cascatas de sinalização celulares sensíveis ao redox, incluindo vias como a JNK, que promove a expressão de BACE1 e PSEN1, aumentando eventualmente a produção de A $\beta$  e a deterioração da função cognitiva (Yao et al., 2005).

As mitocôndrias são essenciais para diversas funções celulares, incluindo síntese de ATP, homeostase do Ca<sup>+2</sup>, sobrevivência e morte celular. A cadeia respiratória mitocondrial é um importante local de produção de EROs na célula, entretanto essas organelas são extremamente vulneráveis ao dano oxidativo (Onyango et al., 2017). Estudos extensivos têm demonstrado que a disfunção mitocondrial é um importante fator envolvido na patogênese da DA. Um número de anormalidades mitocondrial e metabólicas foi identificado nos neurônios de pacientes e em modelos animais de DA (Reddy & Reddy, 2017; Swerdlow et al., 2017). Deficiência na atividade da citocromo oxidase (complexo IV), enzima chave do transporte de elétrons, pode levar ao aumento da produção de EROs e redução nas reservas de energia, contribuindo para o processo neurodegenerativo (Mutisya et al., 1994).

Evidências sugerem que o A $\beta$  pode desregular diretamente as funções mitocondriais e contribui para a deficiência metabólica de energia e levar à morte neuronal na DA. Foi demonstrada uma colocalização de A $\beta$  e mitocôndrias em cérebros de pacientes e modelos experimentais da DA. A presença de A $\beta$  nessas mitocôndrias foi associada a uma disfunção no metabolismo mitocondrial, bem como aumento da produção de EROs (Manczak et al., 2006).

A diminuição da atividade de enzimas antioxidantes de defesa tais como MnSOD podem aumentar ainda mais os níveis de EROs e comprometer a função das mitocôndrias, contribuindo para a perda de potencial da membrana mitocondrial e, eventualmente, a ativação de caspases e apoptose (Anantharaman et al., 2006). O A $\beta$  também pode causar disfunções em outros mecanismos de proteção celular contra danos oxidativos às mitocôndrias, como nas proteínas desacopladoras, que transportam ânions na mitocôndria e estão localizadas na membrana mitocondrial interna com diversas funções fisiológicas. Tem sido demonstrado essas proteínas podem ser ativadas

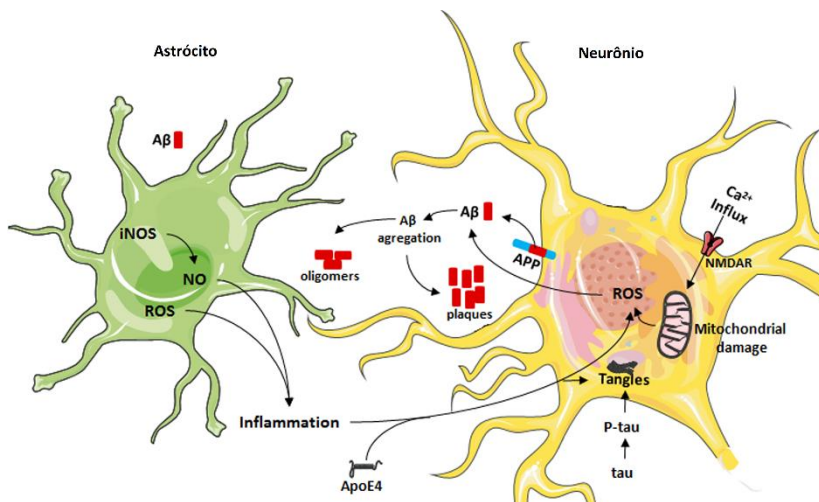
por EROs ou produtos de peroxidação lipídica para diminuir a força protomotriz, o potencial de membrana mitocondrial e produção de ATP, causando o desacoplamento das mitocôndrias, diminuindo a geração de EROs mitocondrial (Echtay, 2007).

Foi observado que a associação entre o A $\beta$  e mitocôndrias, junto ao aumento de peróxido de hidrogênio e diminuição da atividade da citocromo oxidase foi detectada antes do aparecimento de placas amilóides, sugerindo que os defeitos na mitocôndria ocorrem mais cedo na patogênese da DA. Portanto, intervenções terapêuticas direcionadas às mitocôndrias podem ser eficazes no retardo e progressão da DA (Caspersen et al., 2005; Manczak et al., 2006).

## 1.5 COLESTEROL

Além de alterações de sinalização celular, agregação proteica e balanço oxidativo, tem sido demonstrado uma relação entre alterações no metabolismo de lipídeos e DA. A ApoE é uma das principais apolipoproteínas no plasma e a principal proteína transportadora de colesterol no cérebro. Foi evidenciado que a variação do gene que codifica para a ApoE4 com a expressão do alelo recessivo  $\epsilon$ 4 é um fator de risco para a DA, sugerindo um papel do colesterol na patogênese da DA (Puglielli, 2007). No cérebro, a apoE é predominantemente produzida por astrócitos e associada a lipoproteínas de alta densidade. A ApoE interage com múltiplos receptores de lipoproteínas e desempenha um papel importante no transporte de colesterol e metabolismo lipídico. A ApoE4 é menos eficiente que as outras isoformas de ApoE na reciclagem de lípidos de membrana e reparo neuronal (Poirier, 1994; Rapp et al., 2006), possivelmente por causa das diferenças estruturais entre as isoformas, que determinam suas propriedades de ligação a lípidos e receptores.

A ApoE está relacionada a um aumento da produção de A $\beta$ . Entretanto a própria A $\beta$  age positivamente sobre a regulação da ApoE, estimulando o aumento da expressão de proteína e RNAm da ApoE em astrócitos (Rossello et al., 2012). Estudos também demonstraram que elevados níveis de colesterol acarretam em um aumento de A $\beta$  em modelos animais e celulares. Nestes modelos, foi observado que fármacos como as estatinas conseguem reduzir os altos níveis de A $\beta$  (Whitfield, 2006; Hartmann, et al., 2007). A figura 3 ilustra uma visão geral da patogênese de DA.



**Figura 3. Visão geral da patogênese da doença de Alzheimer.** Aβ e proteína tau levam ao aumento do influxo de cálcio, que por sua vez pode desregular a função mitocondrial. Espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas por este dano na mitocôndria, por produtos inflamatórios ou por alelos da apolipoproteína E4 (ApoE4) que reduzem a atividade antioxidante, induzindo um excesso de dano oxidativo aos lípidos. EROs também podem aumentar os níveis de Aβ, levando a um efeito de toxicidade cíclica. Além disso, o envelhecimento por si só está associado à redução da resistência à oxidação e aumento dos níveis de proteínas Aβ e tau (Martins et al., 2016).

## 1.6 ATORVASTATINA

Estatinas são inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. A HMG-CoA redutase tem como função reduzir o HMG-CoA em mevalonato na via de biossíntese do colesterol e isoprenóides, sendo então consideradas como enzimas marca-passo deste processo (Nelson & Cox, 2000; Lee et al., 2008), por esse motivo, esses fármacos são utilizados atualmente como tratamento para a hipercolesterolemia. Estudos retrospectivos sugerem que a prevalência da DA e demência vascular é menor em pacientes que são tratados com estatinas (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000), reduzindo até mesmo os níveis de peptídeos Aβ em um modelo de trauma cerebral induzido (Abrahamson et al., 2009). Dados recentes demonstraram efeitos anti-inflamatórios com o tratamento de estatinas em pacientes com esclerose múltipla, X-adrenoleucodistrofia, modelos

de encefalomielite auto-imune e de lesão da medula espinal em ratos (Stanislaus et al, 1999; Nath et al, 2004; Paintlia et al, 2005; Pannu et al, 2007), sugerindo um amplo efeito neuroprotetor diante de diversas condições patológicas.

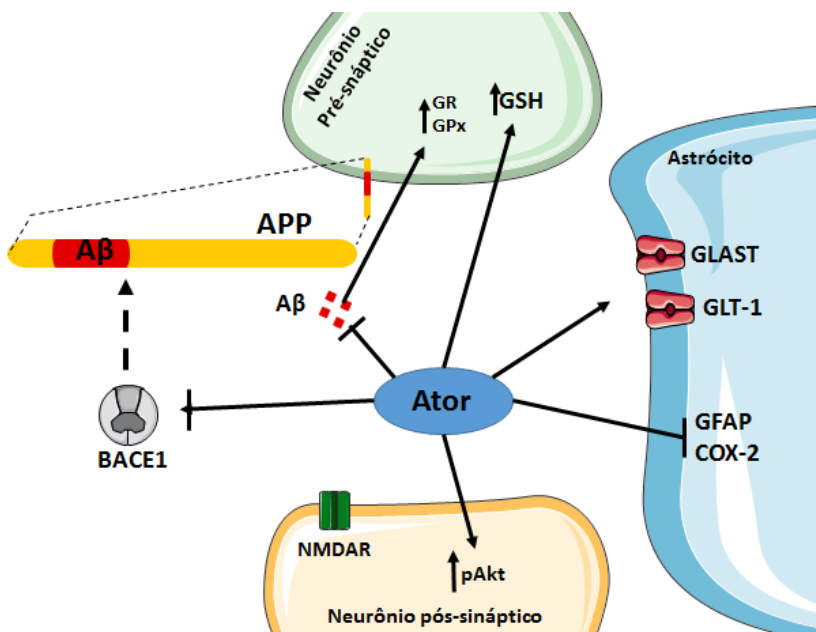
A atorvastatina, um membro da família das estatinas, é relativamente mais lipofílica e possui uma atividade mais prolongada na inibição da HMG-CoA redutase quando comparada a outras estatinas (Schachter, 2005). Além disso, a segurança de seu uso, mesmo em altas dosagens, já foi demonstrada em pessoas adultas (Waters, 2005). Um vasto número de trabalhos tem estudado esta estatina em questão pelos seus efeitos pleiotrópicos, onde demonstrou efeitos neuroprotetores em várias condições patológicas do SNC, como na isquemia, convulsões, transtornos de tipo depressivo e doença de Parkinson (Piermartiri et al., 2009, Castro et al., 2013, Ludka et al., 2013, Barone et al., 2014).

De particular importância, foi demonstrado que a administração de atorvastatina (10 mg / kg, p.o.) durante 7 dias consecutivos após infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> apresenta um efeito neuroprotetor contra a degeneração celular induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Essa neuroproteção pode ser devida a uma extensa gama de respostas encefálicas, tais como, uma redução das respostas inflamatórias, onde a atorvastatina reverteu o aumento da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Piermartiri et al., 2010) e/ou na reorganização astrocitária em resposta ao insulto, visto que a atorvastatina reverteu o aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína que compõe o citoesqueleto astrocitário. Adicionalmente a atorvastatina pode estar envolvida na captação glutamatérgica, através do aumento da expressão dos transportadores astrocitários deste neurotransmissor (GLAST e GLT-1), visto que, quando em excesso na fenda sináptica o glutamato gera excitotoxicidade e consequente dano neuronal (Piermartiri et al., 2010).

Dados obtidos a partir de modelos animais da DA também demonstraram que a atorvastatina reduz os níveis de A $\beta$  oligomerizados (Kurata et al., 2011), bem como os níveis e a atividade da proteína  $\beta$ -secretase (Murphy et al., 2010). A atorvastatina também exerce efeitos do tipo antioxidantes através da ativação dos sistemas da glutatona e da heme oxigenase-1/biliverdina-A redutase, auxiliando na redução do estresse oxidativo (Barone et al., 2011; 2012).

Além disso, a administração de atorvastatina durante 7 dias antes da infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> impediu déficits cognitivos induzidos pela toxicidade de A $\beta$ . Adicionalmente, a infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos promoveu atividade aumentada de enzimas antioxidantes

no córtex cerebral após 16 dias. Estas alterações podem levar ao aumento nos níveis de radicais livres nas células neuronais destes animais, enquanto o pré-tratamento com atorvastatina impede este efeito, sugerindo que a estatina poderia regular a produção de EROs induzida por A $\beta$  (Martins et al., 2015). Estes dados demonstram que o tratamento com atorvastatina pode exercer efeitos diferentes em regiões específicas do cérebro e de um modo tempo-dependente. A figura 4 ilustra os efeitos neuroprotetores observados no tratamento com atorvastatina.



**Figura 4. Efeitos neuroprotetores da atorvastatina.** A atorvastatina reduz níveis tanto da BACE1 como de A $\beta$  (Murphy et al., 2010; Kurata et al., 2011). O tratamento com esta estatina acarreta em um aumento da expressão dos transportadores de glutamato e aumento da fosforilação da via Akt. A atorvastatina reverte o aumento da expressão de GFAP e COX-2 e previne o aumento da atividade de enzimas antioxidantes induzidos pelo A $\beta$  (Piermartiri et al., 2010; Martins et al., 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase têm se mostrado como drogas potencialmente neuroprotetoras, inclusive na diminuição dos níveis de  $A\beta$  e sua toxicidade em modelos de DA. Este estudo utilizou a atorvastatina visto que em relação às outras estatinas, ela é relativamente mais lipofílica e possui uma maior meia-vida de inibição da HMG-CoA redutase, além da segurança na aplicação de altas dosagens em indivíduos adultos (Waters, 2005). Além disso, a administração de atorvastatina durante 7 dias antes da infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  impediu déficits cognitivos induzidos pela toxicidade de  $A\beta$ . Adicionalmente, a atorvastatina impede o aumento da atividade de enzimas antioxidantes no córtex cerebral promovido pelo  $A\beta_{1-40}$ , sugerindo que esta estatina poderia regular a produção de EROs induzida por  $A\beta$  (Martins et al., 2015).

Deste modo, utilizando um pré-tratamento por 7 dias com atorvastatina e um protocolo de infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  em camundongos adultos, esta tese foi dividida em dois objetivos. No primeiro foi observado as alterações gênicas de proteínas envolvidas nos estágios iniciais da DA causadas pelo  $A\beta$  24h após sua infusão e os efeitos promovidos pelo tratamento com atorvastatina. Como segundo objetivo, foi avaliado o pré-tratamento com atorvastatina na prevenção de alterações na expressão de proteínas relacionadas a DA, nos níveis de radicais livres e no dano mitocondrial promovidos pela toxicidade do  $A\beta$ . Nesta fase inicial de indução de toxicidade, ainda não ocorre morte neuronal, porém é provável que já ocorram gatilhos para a toxicidade e danos celulares subsequentes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o pré-tratamento com atorvastatina apresenta efeito neuroprotetor sobre os eventos iniciais da toxicidade promovida pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  em camundongos, bem como estudar mecanismos envolvidos neste processo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS I

- Analisar as alterações nos níveis de RNAm da subunidade GluN1 do receptor de glutamato NMDA e da proteína pós-sináptica de ancoragem PSD-95 no hipocampo e córtex de camundongos promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  e do pré-tratamento com atorvastatina;

- Observar as alterações nos níveis de RNAm da proteína NOS1 no hipocampo e córtex de camundongos promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  e do pré-tratamento com atorvastatina;

- Determinar as alterações nos níveis de RNAm da proteína BDNF no hipocampo e córtex de camundongos promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  e do pré-tratamento com atorvastatina;

- Avaliar as alterações nos níveis de RNAm dos transportadores de glutamato GLAST e GLT-1 no hipocampo e córtex de camundongos promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$  e do pré-tratamento com atorvastatina.

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS II

- Observar os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina na expressão de proteínas relacionadas ao funcionamento e manutenção sinápticos, como BDNF, PSD-95, sinaptofisina e doublecortina no hipocampo de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ ;

- Avaliar a ação da atorvastatina sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em fatias hipocámpais de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ ;

- Determinar se o pré-tratamento com atorvastatina apresenta ação na atividade da enzima NOS2 no hipocampo de camundongos após infusão de  $A\beta_{1-40}$ .

- Verificar a ação da atorvastatina sobre as atividades dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória em homogenatos de hipocampo de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ ;

- Observar os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina no consumo de oxigênio mitocondrial em homogenatos de hipocampo de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ .



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

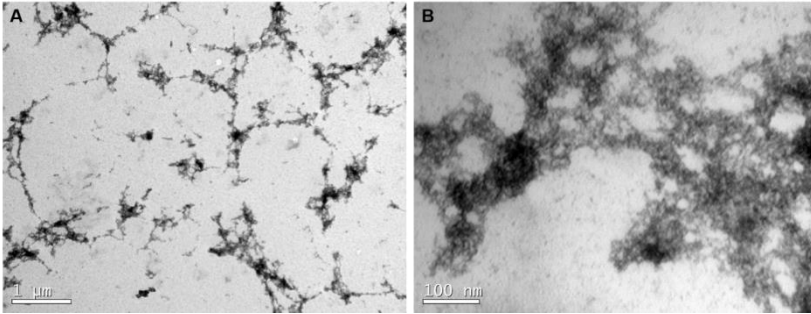
### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos (3 meses/ 40–50g), 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, em caixas plásticas com água e ração disponíveis *ad libitum*. Os protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC – PP00575). Os experimentos foram realizados durante o período diurno para evitar a variação circadiana.

### 4.2 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

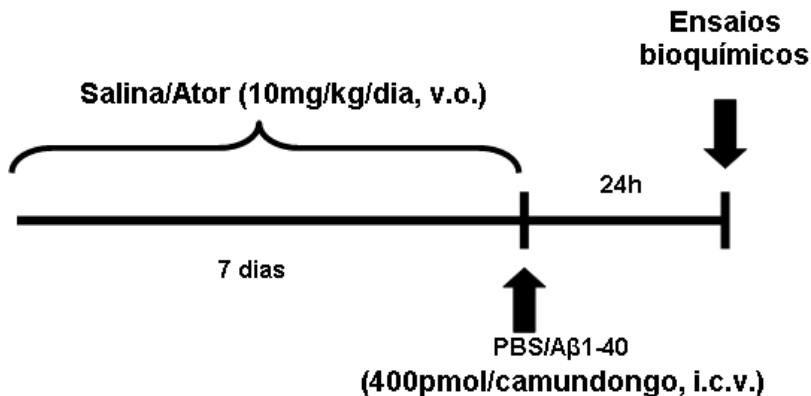
Foi preparada uma solução de  $A\beta_{1-40}$  humano (Tocris, Ellisville, MO, USA) em concentração de 1 mg/ml em 0,1 M de um tampão salina tamponado por fosfato (PBS) (pH 7,4) estéril e alíquotas foram armazenadas a  $-20^\circ \text{C}$ . Soluções de  $A\beta$  foram incubados a  $37^\circ \text{C}$  por 4 dias antes do uso para agregação dos peptídeos, como descrito previamente (El Khoury et al., 1996). Uma alíquota foi utilizada para identificação do perfil de agregação através de visualização ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (Fig. 5). A forma agregada de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo) foi administrada i.c.v. como descrito anteriormente (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) usando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, E.U.A.) e, em seguida, suavemente retidos por mão para a administração i.c.v. A esterilização do local da injeção foi realizada com uma gaze embebida em 70% de etanol. Sob anestesia leve (ou seja, apenas o necessário para a perda do reflexo postural), a agulha foi introduzida unilateralmente 1mm a direita do ponto equidistante médio de cada olho e 1 mm posterior a uma linha traçada através da base anterior dos olhos (usada como referência externa). Um volume de 3  $\mu\text{l}$  de  $A\beta_{1-40}$  ou PBS foi injetado no ventrículo lateral, com as seguintes coordenadas do bregma: ântero-posterior (AP) = -0,1 mm, médio-lateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral (DV) = - 3 mm. A localização exata do local da injeção foi confirmada no momento da dissecação dos animais para a realização dos

testes bioquímicos. Resultados de camundongos apresentando qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística.



**Figura 5. Visualização do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> após o protocolo de agregação por Microscopia Eletrônica de Transmissão.** O A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi diluído em tampão PBS (pH 7,4; 1 mg/mL) e incubado em banho-maria a 37°C por 4 dias. 2  $\mu$ L da solução foram adicionados à superfície de telas Formvar de cobre revestidas com parlódio, contrastados com ácido fosfotúngstico 2% e levados para observação ao Microscópio Eletrônico de Transmissão. (A) Imagem obtida com ampliação de 15.000x (escala: 1  $\mu$ m); (B) Imagem obtida com ampliação de 100.000x (escala: 100 nm) (Lanznaster et al., 2017).

Para estudar o papel das estatinas nas alterações moleculares e comportamentais induzidas por A $\beta$ <sub>1-40</sub>, os animais foram tratados via oral (v.o.) com atorvastatina (Lipitor atorvastatina cálcica, Pfizer) 10 mg/kg/dia dissolvida em salina, uma vez por dia durante sete dias consecutivos antes da infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou PBS. Um grupo de animais controle foram tratados com veículo (NaCl a 0,9%) via oral no mesmo período. O tratamento foi feito pela administração de 10  $\mu$ l/g de peso dos animais, tanto para as soluções de atorvastatina como para as de salina. O protocolo experimental deste estudo está apresentado na figura 6.



**Figura 6.** Visão geral da sequência dos procedimentos experimentais.

#### 4.3 ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Os animais foram sacrificados e os córtices pré-frontais e hipocampus foram dissecados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram fragmentadas por adição de Trizol (Invitrogen) e a extração de RNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante com pequenas modificações. A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas por leitura espectrofotométrica a 260 nm e calculadas as razões 260/280 e 260/230, respectivamente (Espectrofotômetro NanoDrop ND -1000). A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose a 1,2%. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (desoxirribonuclease I, Invitrogen) para remover resíduos de DNA genômico. A reação de transcrição inversa foi realizada utilizando 1 $\mu\text{g}$  de RNA total. A mistura de reação foi composta por: Oligo dT<sub>(12-18)</sub> (500 ng), Mix dNTP (0,2 mM), 1X First-Strand Buffer, DTT (5 mM), RNaseOUT (40 U/ $\mu\text{L}$ ), Superscript III RT, (200 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen), e água livre de RNase para completar 20  $\mu\text{L}$ . Para cada amostra foi realizada uma segunda reação na ausência da transcriptase reversa, para verificação de possível presença de DNA genômico. A reação foi realizada conforme instruções do fabricante pela incubação por 1 hora a  $50^{\circ}\text{C}$  seguida de 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 4.4 RT-PCR QUANTITATIVA

Para avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada gene-alvo, foram realizadas diluições seriadas de um pool de cDNA contendo todas as amostras. As concentrações avaliadas foram 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. As amostras foram amplificadas em duplicatas de acordo com recomendações do fabricante. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para RT-qPCR (SYBR Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific) na presença do conjunto de primers para cada gene (Tabela 1). 2 µL de cDNA foram amplificados em um volume final de reação de 10 µL. Alternativamente, a amostra foi substituída por água (NTC) para confirmação da especificidade da amplificação. As análises de quantificação foram baseadas no método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , tendo como controle endógeno o gene GAPDH (Livak and Schmittgen, 2001). A estabilidade do gene controle foi verificada pela ferramenta *RefFinder* online, programa que integra diferentes programas computacionais comparando e ordenando os melhores candidatos a gene de referência.

**Tabela 1.** Genes desenhados para RT-qPCR, número de acesso no Genbank, sequência dos conjuntos de primers (5' → 3') empregados na reação de amplificação e o tamanho esperado de cada amplicon.

Gene alvo	Número Genbank	Primer forward (F)/reverse (R)	Amplicon (pb)
GAPDH	NM_008084.3	(F) CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	153
		(R) ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG	
BDNF	NM_001048141.1	(F) CATAGACAAAAGGCACTGGAAGCTC	62
		(R) TAAGGGCCCGAACATACGAT	
PSD-95	D50621.1	(F) GGACATTCAGGCGCACAAAG	59
		(R) TCCCGTAGAGGTGGCTGTTC	
NMDA	BC039157.1	(F) CACACAGGAGCGGGTAAACA	57
		(R) TCTCCCATCATTCGGTTCCA	

---

		(F) TCTGAGCTGGACACCATTGACT	
GLT-1	NM_001077514.3	(R) CGTCTTGGTCATTTTCGATGTCTT	63
		(F) GCTCACGGTCACTGCTGTCA	
GLAST	AK045716.1	(R) CGGTCGGAGGGCAAATC	55
		(F) TCAAGGGTATTTGGGTGACATTT	
NOS1	NM_008712.3	(R) GGAATGAAAAGCAGCTACCCTATT	119

---

#### 4.5 PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE HIPOCAMPO PARA ENSAIO COM AS SONDAS FLUORESCENTES

Animais foram decaptados e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4. As fatias (250µm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain, seguido por transferência e separação em fatias individuais para uma pré-incubação em KRB durante 30 min.

#### 4.6 SONDAS FLUORESCENTES

Para monitorar o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente etil éster de tetrametilrodamina (TMRE), que entra e se acumula nas mitocôndrias ativas devido à sua carga negativa. Mitocôndrias despolarizadas ou inativas possuem o potencial de membrana menor, deixando de sequestrar o TMRE. Assim, uma diminuição da fluorescência desta sonda estaria apontando uma maior despolarização da membrana mitocondrial ou inatividade desta organela. Já para verificar os níveis de EROs e óxido nítrico (NO) foram utilizadas as sondas diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) e diaminofluoresceína (DAF), respectivamente, que após a hidrólise no meio intracelular emitem fluorescência na presença dos radicais livres citados anteriormente. Após 24 h da infusão de Aβ<sub>1-40</sub> os hipocampus foram removidos e as fatias (250 µm) foram pré-incubadas durante 30

min com KRB. Após este período foi utilizado o protocolo descrito previamente por Thomaz e colaboradores (2016). Em resumo, as fatias foram incubadas por 30 min com DCFDA (80  $\mu$ M), TMRE (100 nM) ou 1 h com DAF (10  $\mu$ M). Em seguida as fatias foram lavadas com KRB e a fluorescência foi avaliada num leitor de placas TECAN a 488/525 nm para DCFDA, 549/575 nm para TMRE e 495/515 nm para DAF.

#### 4.7 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Hipocampos de camundongos foram solubilizados em tampão de extração de proteínas contendo 4 % SDS, 2 mM EDTA, 8%  $\beta$ -mercaptoetanol, e 50 mM Tris (pH 6,8). As proteínas (30  $\mu$ g/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de acrilamida com concentração dependente da proteína analisada, e gel de entrada 4% (Bunn et al., 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis) durante aproximadamente 2h. Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45  $\mu$ m). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1h com albumina 2% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram então incubadas com os anticorpos seletivos para a imunodeteção de  $\beta$ -actina (1:2000, Sigma), BDNF (1:500, Cell Signaling), doublecortina (1:1000 Sigma), NOS2 (1:1000 Cell Signaling), PSD-95 (1:1000 Sigma), sinaptofisina (1:1000 Sigma). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o respectivo anticorpo secundário. Após lavagens com TBS-T as membranas foram reveladas por emissão de quimioluminescência (Kit ECL), seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.8 PREPARAÇÕES DOS HOMOGENATOS DE HIPOCAMPO PARA AS AVALIAÇÕES DE FUNÇÃO MITOCONDRIAL

Para a atividade dos complexos da cadeia respiratória, os animais foram mortos por decapitação. O hipocampo foi dissecado numa placa de vidro gelada e homogeneizado utilizando um homogeneizador de vidro em 20 volumes de tampão respiração 1 pH 7,4 (sacarose 300 mM, EGTA 10 mM, MOPS 5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, Albumina 1 mg/ml). O homogeneizado hipocampal foi centrifugado a 800 g durante 10 min a

4°C, o pellet foi descartado e o sobrenadante mantido a -70°C até a determinação da atividade enzimática.

Para as análises de respirometria, após dissecação o tecido hipocámpal fresco foi pesado e homogeneizado utilizando um homogeneizador de vidro em 500 µl de solução tampão respiração 2 (Sacarose 320 mM, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Tris HCl 10 mM). O homogeneizado foi mantido em gelo para utilização imediatamente.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I (NADH-DESIDROGENASE)

Para a determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória, foi utilizado o método de Cassina e Radi (1996), com modificações. O fundamento consiste na diminuição da absorbância à 420 nm em função da redução do férric-cianeto (FeCN) pela NADH desidrogenase a partir do NADH. As amostras (cerca de 0,2 - 0,4 mg de proteínas) foram adicionadas a um meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, rotenona 80 µM, FeCN 500 µM. A reação foi iniciada após a adição 0,2 mM de NADH e monitorada por 5 min. Os resultados foram expressos em nmols de FeCN reduzido por min por mg de proteína. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o FeCN.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II (SUCCINATO DESIDROGENASE)

Para a determinação da atividade do complexo II da cadeia respiratória, foi medida a diminuição da absorbância em função da redução do 2,6-dicloindofenol (DCIP) pela succinato desidrogenase à 600 nm como descrito por Fischer e col. (1985). As amostras foram pré-incubadas por 20 min à 37°C em meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 6,2 mM, pH 7,4, succinato de sódio 16 mM e DCIP 8,0 µM. Após incubação, 4,0 mM de azida sódica e 7,0 µM de rotenona foram adicionados, e posteriormente a reação foi iniciada pela adição de 40 µM de DCIP, sendo monitorada por 5 min à 37°C. Os resultados forma expressos em nmols de DCIP reduzido por min por mg de proteína. Para os cálculos foram utilizados o coeficiente de extinção molar de 20,5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o DCIP.

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO IV (CITOCROMO c OXIDASE)

A determinação da atividade do complexo IV da cadeia respiratória foi feita de acordo com Rustin e col. (1994), sendo calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm. As amostras (cerca de 0,2 - 0,4 mg de proteínas) foram adicionadas a um meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 50 mM. Os resultados foram expressos em nmols de citocromo c reduzido por min por mg de proteína. Para os cálculos foram utilizados o coeficiente de extinção molar de  $19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o citocromo c.

#### 4.12 CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial em homogenato de hipocampo, 1 mg/ml de tecido fresco foi transferido para o oxímetro 2K (respirometria de alta resolução, por Oroboros Instrumentos, Áustria) com 2 ml por câmaras, e foram adicionados 1mg/ml de albumina livre de ácidos graxos. Foram determinados a taxa de consumo de  $\text{O}_2$  (OCR, do inglês *oxygen consumption rate*) ou fluxo de  $\text{O}_2$  por massa de tecido ( $\text{pmol O}_2/\text{s}/\text{mg}$ ), mensurado em tempo real utilizando o software DatLab (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Áustria), como descrito anteriormente (Burtscher et al., 2015).

De acordo com o protocolo SUIT (substrate uncoupling inhibitor titration) (Gnaiger, 2012), após a estabilização do OCR, substratos para o complexo I da cadeia respiratória foram adicionados. O LEAK do complexo I ( $\text{CI}_L$ ) foi determinado pela adição de piruvato (5 mM) e malato (0,5 mM), em seguida foi determinado o OCR associado à produção de ATP do complexo I ( $\text{CI}_P$ ) ao adicionar 2 pulsos de ADP (0,5 mM e 1 mM). Para avaliar a contribuição do complexo I e II para a síntese de ATP ( $\text{CI}\&\text{II}_P$ ) foi adicionado succinato (10 mM). Na sequência, a taxa máxima de consumo de  $\text{O}_2$  (ETS, do inglês *electron transport system*) para os complexos I e II foram determinadas pela titulação com o ionóforo carbonilcianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP, do inglês *carbonilcyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone*), uma base fraca capaz de carrear os prótons do espaço intermembranas através das membranas, agindo como um desacoplador da fosforilação oxidativa. A taxa máxima de consumo de  $\text{O}_2$  para os dois complexos ( $\text{CI}\&\text{II}_E$ ) foi alcançada com concentrações de FCCP entre 0,2 e 0,5  $\mu\text{M}$ . Para medir a contribuição do complexo II na capacidade



máxima respiratória ( $CII_E$ ) foi adicionado rotenona (ROT) (inibidor do complexo I) ( $2.2 \mu\text{M}$ ). Por fim, o consumo de  $\text{O}_2$  mitocondrial foi inibido de forma irreversível pela adição de antimicina-A (AA) ( $12.5 \mu\text{M}$ ), inibidor do complexo III. Nesta última etapa, a taxa de consumo de  $\text{O}_2$  residual resultante (ROX) representa o consumo de  $\text{O}_2$  extramitocondrial, ou seja, o consumo realizado por outras organelas e processos bioquímicos celulares independentes da mitocôndria (Amôêdo et al., 2011). Para os cálculos, o OCR associado ao ROX foi subtraído de todos os outros OCR.

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

## 5. RESULTADOS

Em nosso estudo analisamos o pré-tratamento com atorvastatina em um modelo de DA, onde é administrada a forma agregada do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta_{1-40}$ ) i.c.v. em camundongos. Este modelo mesmo sendo incapaz de induzir todas as características patológicas de DA, como placa amilóide, hiperfosforilação da tau e perda neuronal bruta (Van Dam & De Deyn, 2006; Takeda et al., 2009), vem sendo utilizada para a caracterização da toxicidade do peptídeo  $A\beta$ , induzindo uma resposta tóxica com característica oxidativa, inflamatória e associada a déficits de aprendizagem e memória (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008; Martins et al., 2015).

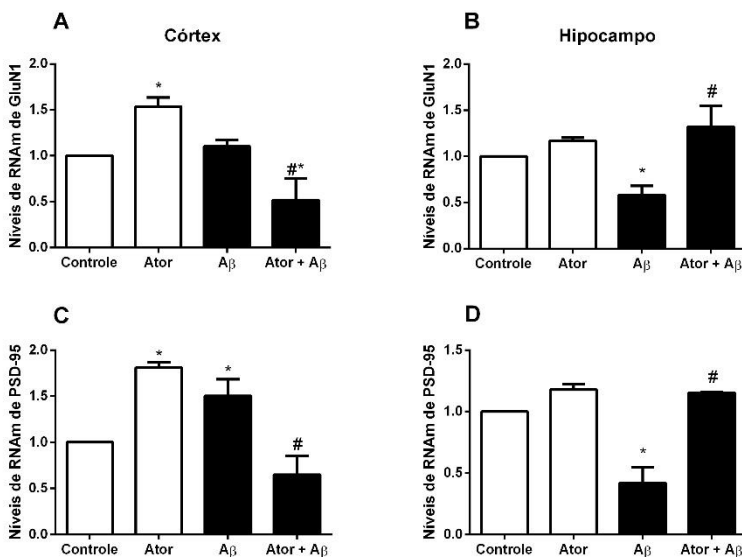
### 5.1 RESULTADOS REFERENTES AO OBJETIVO I DA TESE

Camundongos foram tratados oralmente com atorvastatina (10 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. Três horas após a última administração de atorvastatina, os animais receberam a infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). O tecido cortical e hipocampal para a avaliação dos níveis de RNAm foi obtido 24h após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ . A expressão gênica da subunidade GluN1 do receptor NMDA, dos transportadores de glutamato GLAST e GLT-1, a proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDa (PSD-95), a oxido nítrico sintase neuronal (NOS1) e o BDNF no córtex e hipocampo de camundongos foram avaliados utilizando RT-PCR quantitativa em tempo real. As expressões gênicas medidas foram normalizadas com GAPDH.

#### 5.1.1 NÍVEIS DE RNAm DE GluN1 E PSD-95

Os níveis de RNAm da subunidade GluN1 do receptor de NMDA no córtex cerebral de camundongos (Fig. 7A) apresentou um aumento significativo no grupo tratado com atorvastatina. A infusão de  $A\beta_{1-40}$  não alterou a expressão gênica basal (controle) desta proteína nesta estrutura cerebral, enquanto a presença de ambos os tratamentos (Ator +  $A\beta$ ) diminuiu o RNAm de GluN1 abaixo dos níveis do controle. Tanto o pré-tratamento com atorvastatina, como a administração de  $A\beta_{1-40}$  levou a um aumento dos níveis de RNAm da proteína de ancoramento PSD-95 no córtex (Figura 7C), enquanto que o grupo Ator +  $A\beta$  manteve os níveis iguais ao grupo controle. No hipocampo, o  $A\beta_{1-40}$  promoveu uma diminuição nos níveis de RNAm de GluN1 (Fig. 7B) e

PSD-95 (Fig. 7D), sendo que o pré-tratamento com atorvastatina preveniu estas reduções promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$ .

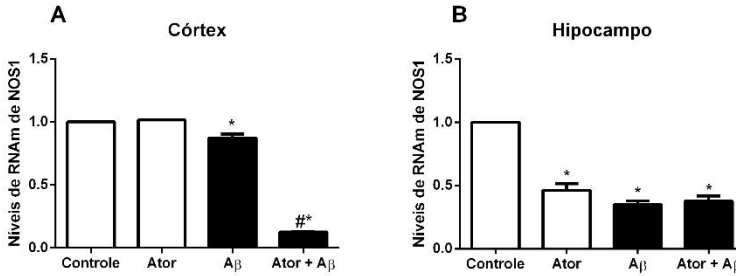


**Figura 7. Avaliação dos níveis de RNAm de GluN1 e PSD-95 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ .** Os animais receberam um pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol / sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ . Os gráficos representam os níveis de RNAm de NMDA no córtex (A), hipocampo (B) e níveis de RNAm de PSD-95 na região do córtex (C) e hipocampo (D). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  S.D (n=2). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo de controle,  $p < 0,05$ , # indica diferença significativa do grupo  $A\beta_{1-40}$ ,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

### 5.1.2 NÍVEIS DE RNAm DE NOS1

Nenhuma alteração nos níveis de RNAm de NOS1 no grupo pré-tratado com atorvastatina foi observada na região cortical. Contudo, os camundongos infundidos com  $A\beta_{1-40}$  apresentaram uma redução em relação ao grupo controle na região cortical. Já os camundongos que receberam atorvastatina mais  $A\beta_{1-40}$  (Ator +  $A\beta$ ) apresentaram uma redução significativa nos níveis de RNAm de NOS1 (Fig. 8A). Na

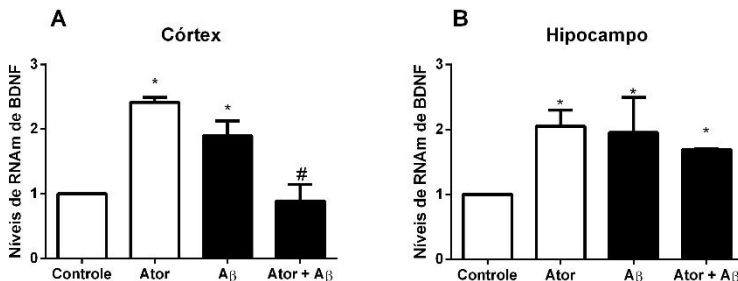
região do hipocampo, os tratamentos com atorvastatina,  $A\beta_{1-40}$  e atorvastatina mais  $A\beta_{1-40}$  diminuíram os níveis de RNAm desta enzima em relação ao grupo controle (Fig. 8B).



**Figura 8. Avaliação dos níveis de RNAm de NOS1 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ .** Os animais receberam um pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol / sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ . Os gráficos representam os níveis de RNAm de NOS1 no córtex (A) e hipocampo (B). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  S.D (n=2). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo de controle,  $p < 0,05$ , # indica diferença significativa do grupo  $A\beta_{1-40}$ ,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

### 5.1.3 NÍVEIS DE RNAm DE BDNF

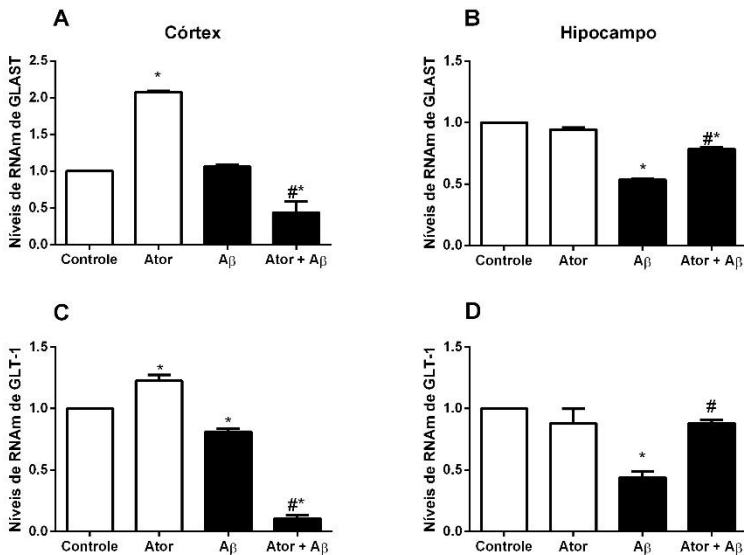
O fator neurotrófico derivado do cérebro, também conhecido como BDNF, age nos neurônios no sistema nervoso central e periférico. No cérebro tem maior atividade em regiões relacionadas à aprendizagem e memória, auxiliando no crescimento, diferenciação e sobrevivência de neurônios e sinapses. Os dados obtidos mostraram aumento dos níveis de RNAm de BDNF tanto no córtex (Fig. 9A) como no hipocampo (Fig. 9B) quando os animais são tratados com atorvastatina ou infundidos com  $A\beta_{1-40}$ . No entanto, os camundongos tratados com atorvastatina previamente à infusão de  $A\beta_{1-40}$  mostraram uma redução nos níveis de RNAm de BDNF quando comparados com os efeitos promovidos por estes tratamentos isoladamente, voltando aos níveis de controle no córtex (Fig. 9A) mas não no hipocampo (Fig. 9B).



**Figura 9. Avaliação dos níveis de RNAm de BDNF em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.** Os animais receberam um pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol / sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os gráficos representam os níveis de RNAm de BDNF no córtex (A) e hipocampo (B). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  S.D (n=2). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo de controle, p <0,05, # indica diferença significativa do grupo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, p <0,05 (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

#### 5.1.4 NÍVEIS DE RNAm DE GLAST E GLT-1

Os níveis de RNAm de ambos os transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1 apresentaram aumento significativo no córtex de animais tratados com atorvastatina (Fig. 10A e 10C, respectivamente). A infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub> não alterou os níveis gênico basal (controle) de GLAST apesar de promover uma redução do RNAm de GLT-1. A presença de ambos os tratamentos (Ator + A $\beta$ ) diminuiu tanto os níveis de GLAST como de GLT-1. No hipocampo o A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu uma diminuição tanto nos níveis de RNAm de GLAST (Fig. 10B) como de GLT-1 (Fig. 10D), além disso, o pré-tratamento com atorvastatina durante 7 dias foi capaz de prevenir completamente o efeito promovido pela infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub> nos níveis gênicos do transportador GLT-1 (Fig. 10D) e parcialmente nos de GLAST (Fig. 10C).



**Figura 10. Avaliação dos níveis de RNAm de GLAST e GLT-1 em córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.** Os animais receberam um pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol / sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os gráficos representam os níveis de RNAm de GLAST no córtex (A), hipocampo (B) e níveis de RNAm de GLT-1 na região do córtex (C) e hipocampo (D). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  S.D (n=2). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo de controle,  $p < 0,05$ , # indica diferença significativa do grupo A $\beta$ <sub>1-40</sub>,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

## 5.2 RESULTADOS REFERENTES AO OBJETIVO II DA TESE

Camundongos foram tratados oralmente com atorvastatina (10 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. Três horas após a última administração de atorvastatina os animais receberam uma única infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou veículo. Após 24 h, os animais foram sacrificados e os hipocampus foram dissecados para posterior avaliação bioquímica. A expressão proteica de BDNF, PSD-95, sinaptofisina, doblecortina e NOS2 foram avaliadas utilizando imunodeteção de proteínas. Também foram avaliados os níveis de EROs, NO, potencial de membrana mitocondrial e seus complexos (I, II, IV), bem como o

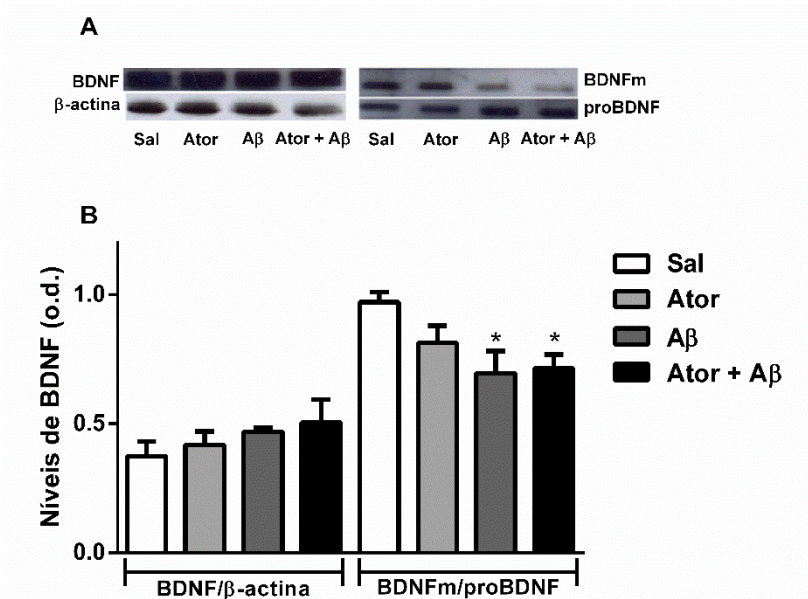
consumo de oxigênio no hipocampo de animais infundidos com A $\beta$  por respirometria de alta resolução em um oxígrafo (Oroboros).

### 5.2.1 EXPRESSÃO PROTEICA DE BDNF

Os dados obtidos não mostraram alteração na expressão total de BDNF entre os grupos experimentais. Contudo, quando analisado a razão BDNFm (maduro/ativo) e proBDNF (precursor), os camundongos que receberam a infusão i.c.v. de A $\beta$  demonstram uma redução significativa na expressão de BDNFm. Já os camundongos pré-tratados com atorvastatina não mostraram diferença estatística em relação ao grupo controle, porém atorvastatina não preveniu as alterações promovidas pelo A $\beta$  (Fig. 11).

### 5.2.2 EXPRESSÃO PROTEICA DE PSD-95, SINAPTOFISINA E DOUBLECORTINA

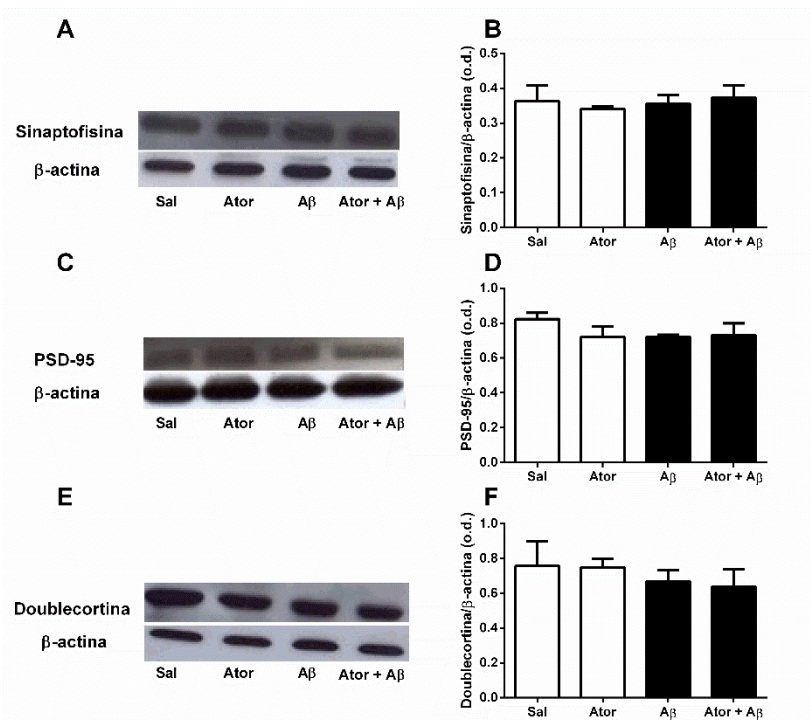
Com o objetivo de analisar uma possível perda sináptica promovida pela infusão A $\beta_{1-40}$ , avaliou-se a expressão de sinaptofisina e PSD-95 no hipocampo de animais infundidos com A $\beta_{1-40}$  e tratados com atorvastatina. A sinaptofisina é uma proteína associada a vesículas sinápticas em neurônios pré-sinápticos e usada como um marcador para contatos sinápticos, enquanto que a PSD-95 está localizada principalmente em neurônios pós-sinápticos funcionando como âncora para receptores de glutamato. Tem sido sugerido que uma diminuição na expressão destas proteínas pode ser indicativa de dano ou falha na transmissão sináptica. Entretanto, os dados não mostraram alteração tanto na sinaptofisina (Fig. 12A e B) como na PSD-95 (Fig. 12C e D) 24 horas após o tratamento com A $\beta$ , assim como nenhuma resposta foi observada pelo pré-tratamento com atorvastatina em comparação ao grupo controle.



**Figura 11. Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ .** Camundongos receberam o pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol /sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ . Os resultados estão apresentados como médias + SEM (n=5). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Tukey).

A doublecortina é uma proteína que promove estabilização de microtúbulos, estando geralmente associada à migração neuronal e neurogênese. Deste modo, a expressão desta proteína foi avaliada para observar se há ou não neurogênese após nossos tratamentos. 24 horas após a infusão i.c.v. com o peptídeo  $A\beta$  não há diferença significativa em qualquer dos grupos tratados em comparação com o controle (Fig. 12E e F).



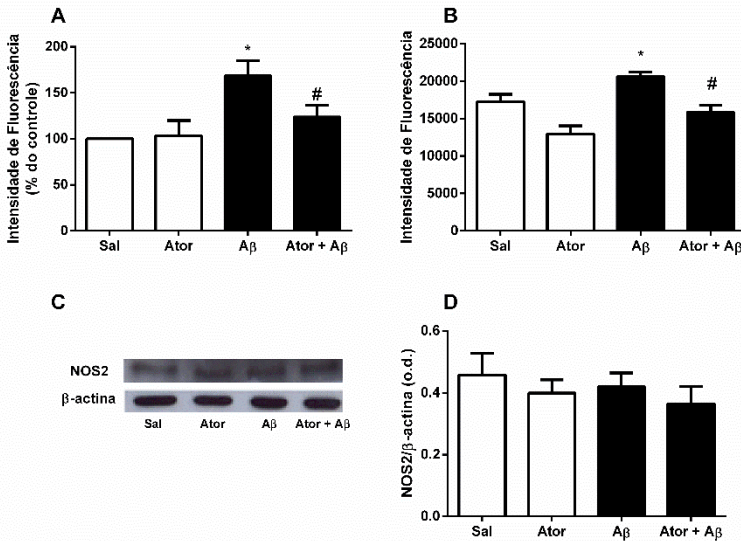


**Figura 12.** Avaliação dos níveis de sinaptofisina, PSD-95 e Doublecortina no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e a Infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . Camundongos receberam o pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol / sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ . Os gráficos representam a expressão proteica da sinaptofisina (A e B), PSD-95 (C e D) e doublecortina (E e F). Os resultados estão apresentados como médias + SEM (n=5). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

### 5.2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Um processo que pode exacerbar a perda de sinapses e consequente morte neuronal, levando a problemas cognitivos em muitas doenças neurodegenerativas é a produção de radicais livres. Assim, utilizando as sondas fluorescentes DCFDA e DAF, avaliamos os níveis de EROs e NO, respectivamente. Os dados mostraram que após infusão de  $A\beta$  há um aumento de fluorescência em fatias de hipocampo

incubadas com DCFDA (Fig. 13A) e DAF (Fig. 13B) em comparação com o grupo controle. O aumento de ROS e NO em camundongos infundidos com A $\beta$  foi completamente prevenido pelo tratamento com atorvastatina. Com o aumento dos níveis de NO promovido pelo A $\beta$ , foi avaliado também a NOS2, enzima associada a processos inflamatórios que podem gerar NO, ajudando no processo de formação de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito. Contudo, no nosso modelo experimental, não houve nenhuma alteração na expressão da enzima NOS2 entre os grupos (Fig. 13C e D).

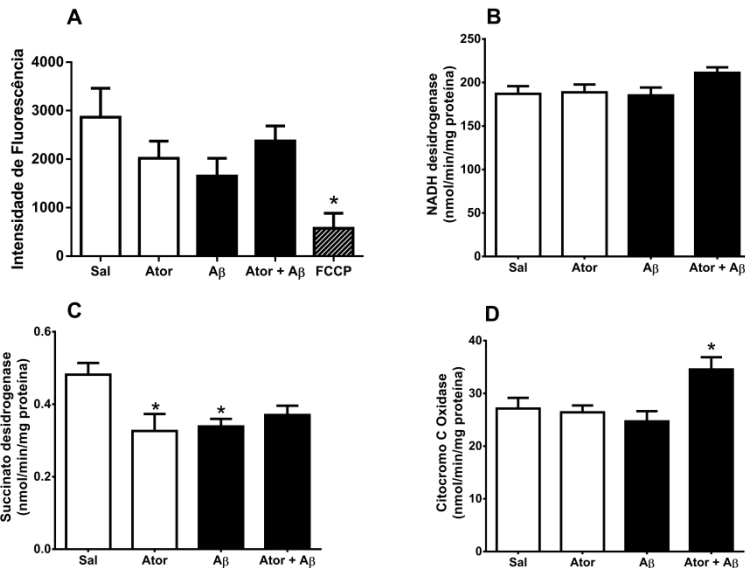


**Figura 13. Avaliação dos níveis de EROs, NO e NOS2 no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.** Camundongos receberam o pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os gráficos representam os níveis de EROs (A), níveis de NO (B) e expressão da proteína NOS2 (C e D). Os resultados estão apresentados como médias + SEM (n=5-7). \* Indica diferença significativa do grupo controle, p <0,05, # indica diferença significativa do grupo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, p <0,05 (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

#### 5.2.4 FUNÇÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são uma fonte importante de EROs intracelular e os danos mitocondriais estão intrinsecamente envolvidos na progressão da DA. Assim, utilizamos a sonda fluorescente TMRE para verificar o potencial da membrana mitocondrial no hipocampo de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ . Na figura 14A observamos que não houve alteração significativa no potencial de membrana mitocondrial nos animais tratados com atorvastatina e  $A\beta$ . No entanto, observamos uma significativa redução da emissão de fluorescência pelo desacoplador mitocondrial FCCP (utilizado como controle positivo), demonstrando a eficiência da sonda utilizada para a medida do potencial de membrana mitocondrial.

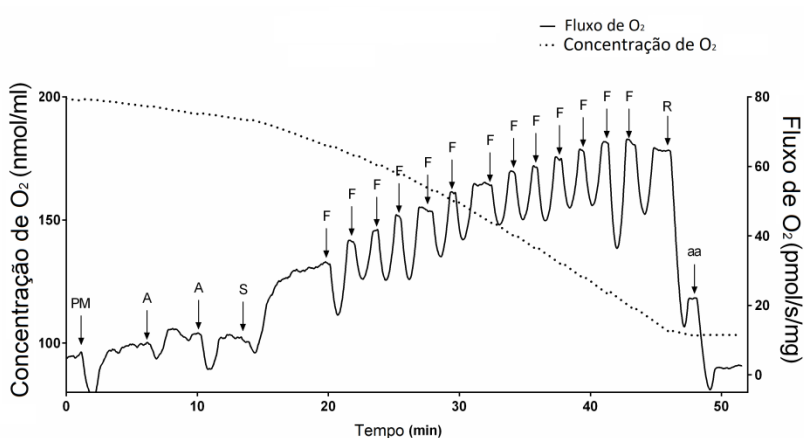
A atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial também foi avaliada. Utilizaram-se homogenatos de hipocampo de camundongos para avaliar a atividade de complexo I (redução dependente de NADH de ferricianeto), complexo II (succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP) -oxidoreductase) e complexo IV (citocromo c oxidase). No ensaio do complexo I, a atividade da NADH-desidrogenase não foi alterada em nenhum dos tratamentos (Fig. 14B). Já atividade da enzima succinato desidrogenase encontra-se reduzida tanto nos grupos tratados com atorvastatina como com  $A\beta$ , entretanto não foi obtida qualquer alteração significativa quando os tratamentos foram co-administrados (Fig. 14C). Além disso, na atividade de complexo IV, citocromo c oxidase, foi observado um aumento apenas no grupo atorvastatina +  $A\beta$  (Fig. 14D).



**Figura 14. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial e da atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.** Camundongos receberam o pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os gráficos representam a intensidade de fluorescência de TMRE (A), atividade da NADH desidrogenase (Complexo I) (B), atividade da Succinato desidrogenase (Complexo II) (C) e atividade da Citocromo C Oxidase (Complexo IV) (D). Os resultados estão apresentados como médias + SEM (n=5). \* Indica diferença significativa do grupo controle, p <0,05, (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

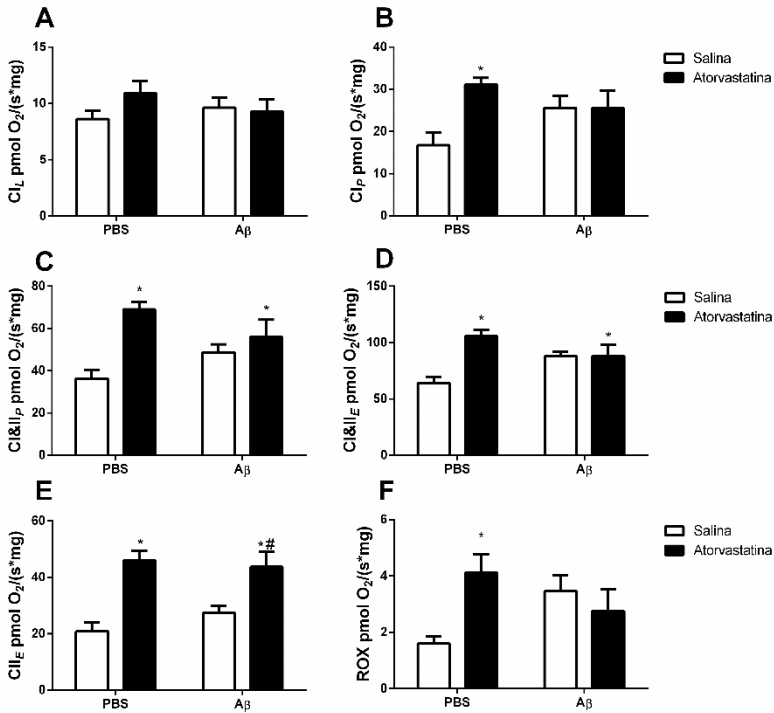
### 5.2.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

Outro parâmetro avaliado para observar a disfunção mitocondrial foi o consumo de oxigênio em homogenatos de tecido hipocampal de camundongos infundidos com A $\beta$  e tratados com atorvastatina por meio de respirometria de alta resolução em um oxígrafo (Oroboros). A Figura 15 mostra o padrão de respiração do grupo controle após a adição dos substratos e inibidores dos complexos mitocondriais como descrito nos *Materiais e Métodos*.



**Figura 15. Padrão de respiração do grupo controle.** Leitura da respiração após adição de piruvato e malato (PM), ADP (A), succinato (S), FCCP (F), rotenona (R) e antimicina A (AA)

Nos dados obtidos, observamos que não há alteração no consumo basal de oxigênio entre os grupos (Fig. 16A). No entanto, a presença de atorvastatina em camundongos infundidos tanto com PBS quanto com A $\beta_{1-40}$  conduz a um aumento no consumo de oxigênio após estimulação do complexo I (adição de piruvato/malato) (Fig. 16B) e do complexo II (adição de succinato) (Fig. 16C), associados à fosforilação oxidativa (adição de ADP). Além disto, a atorvastatina aumentou a capacidade respiratória máxima (Fig. 16D) e manteve-se elevada após inibição do complexo I com rotenona (Fig. 16E) e do complexo II com antimicina A (Fig. 16F).



**Figura 16. Avaliação do consumo de oxigênio no hipocampo de camundongos submetidos ao pré-tratamento com atorvastatina e infusão i.c.v. de A $\beta_{1-40}$ .** Camundongos receberam o pré-tratamento de 7 dias com atorvastatina (10 mg / kg, v.o.) ou solução salina e uma única infusão i.c.v. de A $\beta_{1-40}$  (400 pmol /sítio) ou PBS. As amostras de tecido foram obtidas 24 horas após a infusão de A $\beta_{1-40}$ . Os gráficos representam o consumo basal de oxigênio (A), a fase LEAK (ausência de ATP) (B), a fosforilação oxidativa (ATP e presença de substratos) (C), consumo máximo de oxigênio (D), inibição do complexo I (E) e inibição do complexo I e II da cadeia respiratória (F). Os resultados estão apresentados como médias + SEM (n=4-7). \* Indica diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$ , # indica diferença significativa do grupo A $\beta_{1-40}$ ,  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos tóxicos promovidos pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  24 horas após a sua infusão i.c.v. em camundongos adultos. Nesta fase inicial de indução de toxicidade pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , ainda não ocorre morte neuronal (Piermatiri e colaboradores, dados não publicados), porém é provável que já tenha ocorrido um gatilho para a toxicidade e danos celulares subsequentes, que são observados a partir de duas semanas após a infusão do  $A\beta_{1-40}$  (Piermatiri et al., 2010; Martins et al., 2015). Também foi estudado o possível efeito neuroprotetor de um pré-tratamento por 7 dias com atorvastatina (10 mg/kg, v.o.) frente a toxicidade induzida pelo  $A\beta_{1-40}$ . Neste curto período de tempo, o  $A\beta_{1-40}$  promoveu algumas disfunções celulares que podem acarretar em danos aos neurônios e células adjacentes e que estão relacionados a várias patologias distintas, inclusive a DA. Um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio foi detectado. Além disso, a expressão de BDNF maduro encontra-se reduzida no hipocampo de animais infundidos com  $A\beta$  e alterações na expressão gênica de proteínas possivelmente relacionadas à progressão da DA no córtex e hipocampo foram observadas. A atorvastatina por sua vez, novamente mostrou-se como um possível agente antioxidante, diminuindo os níveis das espécies reativas, o que pode culminar na redução do dano oxidativo neuronal. A atorvastatina também foi capaz de prevenir a diminuição da expressão gênica de proteínas promovidas pela toxicidade do  $A\beta$  e aumentar a capacidade respiratória mitocondrial, quando avaliado o consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução.

Estudos anteriores demonstram que previamente à morte neuronal, ocorre uma falha pré-sináptica seguido de uma falha pós-sináptica. Deste modo foi analisada uma proteína pré e outra pós-sináptica, relacionadas à plasticidade sináptica, sendo elas a sinaptofisina e a PSD-95 respectivamente. As diminuições dos níveis destas proteínas acarretam na disfunção sináptica neuronal e já foi observada em córtex e hipocampus de pacientes que apresentam DA (Yuki et al., 2014). Em nosso protocolo não houve alterações na expressão das proteínas citadas anteriormente. Uma diminuição na expressão de sinaptofisina já foi observada neste modelo de infusão de  $A\beta$  i.c.v., porém, a mudança na expressão desta proteína foi obtida no oitavo (Bicca et al., 2011) ou décimo quarto dia (Bernardi et al., 2012) após a administração do peptídeo. A PSD-95 é uma proteína que tem função de ancoramento para receptores de glutamato na membrana,

como os receptores NMDA e AMPA. Como descrito acima, uma diminuição da PSD-95 seria esperada após perda de sinaptofisina. Assim, como a toxicidade promovida pelo A $\beta$  em 24h não foi suficiente para alterar os níveis de sinaptofisina, também não houve alteração na expressão da PSD-95. Estudos mostram que a expressão de receptores NMDA na superfície celular é essencial para a formação de EROs induzida por oligômeros de A $\beta$  (Decker et al., 2010). Este receptor é composto por várias subunidades, sendo a que caracteriza o receptor NMDA, a GluN1. O receptor NMDA é um heterotetrâmero formado por um homodímero de GluN1 e dímeros de NGlu2A, 2B, 2C, 2D, ou 3A, 3B (Regan et al., 2015). Quando o receptor NMDA encontra-se acoplado à membrana ele é funcional e pode permear o influxo de cálcio.

Uma disfunção na neurotransmissão glutamatérgica em modelos experimentais de DA, como redução dos níveis basais de glutamato, bem como seus transportadores astrocíticos e captação de glutamato já foram descritas (Piermartiri et al., 2010; Cassano et al., 2012). É possível que as alterações no transporte de glutamato possam interferir com a expressão dos receptores de glutamato. Nossos dados avaliando a expressão gênica na região do hipocampo, corroboram com a idéia de que a toxicidade de A $\beta$  pode levar a disfunção na neurotransmissão glutamatérgica, mais especificamente na transcrição da subunidade GluN1 canônica do receptor NMDA, enquanto que a atorvastatina previne a redução promovida por A $\beta$ . Contudo, no córtex cerebral a infusão de A $\beta$  não mostrou alteração no RNAm de NMDA-GluN1 em relação ao grupo controle, enquanto que os animais pré-tratados com atorvastatina que também receberam A $\beta$  mostram uma redução nesta expressão gênica.

Resultados semelhantes foram obtidos para expressão de RNAm de PSD-95, a proteína de ancoragem pós-sináptica para receptores de NMDA, em ambas as estruturas analisadas. Os níveis diminuídos de RNAm de PSD-95 promovidos por A $\beta$  no hipocampo podem agravar a expressão de receptores NMDA na superfície celular resultando em perda de plasticidade sináptica (Zhang et al., 2016). O pré-tratamento com atorvastatina bloqueou a redução do RNAm de PSD-95 por A $\beta$ . Outras estatinas como a simvastatina têm sido implicadas no aumento da ligação do receptor de NMDA em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo (Wang et al., 2009). Estes dados demonstram que a expressão de RNAm de GluN1 e de PSD-95 respondem de forma semelhante a A $\beta$  e atorvastatina em ambas as estruturas cerebrais, embora se tenham observado efeitos diferentes



entre o hipocampo e o córtex cerebral como resposta aos eventos iniciais de toxicidade de A $\beta$ .

Como a depuração do glutamato da fenda sináptica é um mecanismo importante para prevenir a excitotoxicidade causada por uma disfunção na neurotransmissão glutamatérgica, foi também analisada a expressão gênica de GLAST e GLT-1, os principais transportadores gliais envolvidos na recaptação deste neurotransmissor. A infusão de A $\beta$  reduziu o RNAm de GLT-1 em ambas as regiões estudadas e RNAm de GLAST no hipocampo. O pré-tratamento com atorvastatina impediu esta redução promovida por A $\beta$  na região hipocampal, demonstrando um possível mecanismo de neuroproteção para diminuir a excitotoxicidade induzida pelo glutamato. Diferenças no transporte de glutamato, específicas em regiões cerebrais e idade dos roedores, já foram demonstradas na literatura (Schallier et al., 2011; Martins et al., 2015). Além disso, evidências do nosso grupo de pesquisa mostram que A $\beta$  reduz a expressão proteica de ambos os transportadores gliais no hipocampo após 16 dias e o tratamento com atorvastatina pode prevenir este efeito, o que é consistente com os nossos resultados (Piermartiri et al., 2010).

A ativação de receptores NMDA está também envolvida com a liberação de BDNF (Leal et al., 2015), que por sua vez é sugerido como um regulador da atividade de NOS (Riccio et al., 2006). O BDNF, um membro da família das neurotrofinas, ativa vias de sinalização como ERK1/2 e PI3K/Akt. O BDNF desempenha um papel central no crescimento, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, bem como na aprendizagem e memória.

Essa neurotrofina encontra-se significativamente reduzida no cérebro de pacientes com DA e em modelos animais para esta doença (Peng et al., 2005; Shin et al., 2014). No entanto, o BDNF não penetra a barreira hematoencefálica facilmente, deste modo fármacos que possam induzir a formação endógena de BDNF necessitam de investigação. Assim como na literatura, nossos resultados demonstram que o A $\beta$  induz uma diminuição na expressão de BDNF maduro/ativo 24h após a infusão do peptídeo, porém o pré-tratamento com a atorvastatina por 7 dias não preveniu esta redução. O BDNF maduro exerce seus efeitos neuroprotetores ligando-se a receptores tirosina cinase B (TrkB), já seu precursor (pró-BDNF) pode ligar-se a um receptor alternativo, o p75<sup>NTR</sup>. Já foi demonstrado que o BDNF maduro reduz a perda neuronal sensorial em gânglios da raiz dorsal após lesão do nervo periférico, enquanto que sua forma precursora (pró-BDNF) aumenta a morte de neurônios axotomizados (Zhou et al., 2005). Desta forma, a redução dos

níveis de BDNFm observada em nosso trabalho (24 horas) pode ser um dos efeitos tóxicos promovidos pelo A $\beta$  em fases iniciais de toxicidade. Além disso, foi demonstrado que o pró-BDNF pode inibir a proliferação neuronal no hipocampo de camundongos idosos, contribuindo para uma diminuição da cognição destes animais (Chen et al., 2015).

Em relação à expressão gênica de BDNF, observamos um aumento nos níveis de RNAm para BDNF em ambas as regiões do cérebro em animais tratados com atorvastatina ou A $\beta$  apenas. No córtex, o pré-tratamento com atorvastatina após a infusão de A $\beta$  não mudou em relação aos níveis de controle, diferente do observado em hipocampo, o que também aumentou os níveis deste gene. Poderia-se esperar uma redução nos níveis de RNAm de BDNF pela toxicidade do A $\beta$ , uma vez que estudos demonstraram que o BDNF pode melhorar déficits de aprendizagem e de memória e exercer neuroprotecção em alguns modelos de DA (Zhang et al., 2015). Contudo, outros estudos mostraram variações nos níveis de RNAm de BDNF dependendo da linhagem de rato utilizada (Peng et al., 2009). Além disso, temos que ter em mente que após a transcrição, o BDNF (pré-pró-BDNF) deve sofrer processamento até sua forma madura que leva à neuroprotecção. A forma pró-BDNF foi descrita como um indutor de déficits de aprendizagem e de memória em camundongos idosos e uma possível sinergia com a toxicidade do A $\beta$  foi sugerida (Chen et al., 2015; Lim et al., 2015). De outro ponto de vista, o aumento dos níveis de RNAm de BDNF pelo tratamento com A $\beta_{1-40}$  podem ser interpretados como uma resposta compensatória à sua toxicidade.

É sabido que há uma relação inversa entre o estresse oxidativo e os níveis de BDNF (Numakawa et al., 2011), e ambos estão interligados a uma maior neurodegeneração e prejuízo cognitivo em pacientes com DA. Assim, avaliamos os níveis de espécies reativas em animais infundidos com A $\beta$ . Em nossos resultados, observamos que após 24h o A $\beta$  promove aumento de EROs e NO nas fatias hipocampais de animais que receberam a infusão deste peptídeo, mostrando o estresse oxidativo e nitrosativo como um dos primeiros passos para uma possível sinaptotoxicidade e subsequente morte neuronal. O pré-tratamento com a atorvastatina demonstrou-se eficaz, prevenindo o aumento destas espécies reativas. O equilíbrio entre os efeitos benéficos e nocivos dos radicais livres é um aspecto de extrema importância para o organismo. Assim, substâncias endógenas e exógenas que atuam como agentes pró- e antioxidantes são necessários para manter uma homeostase desse estado redox celular, que podem estar desreguladas em condições patológicas. A infusão de A $\beta$  em camundongos promove aumento da

atividade das enzimas antioxidantes, como a glutathione redutase e glutathione peroxidase, podendo levar a alterações nos níveis de radicais livres nas células neuronais destes animais. Entretanto o pré-tratamento com atorvastatina previne esse aumento das atividades enzimáticas, sugerindo que esta estatina diminui a produção de EROs induzida pelo A $\beta$  (Martins et al., 2015). Estes efeitos pleotrópicos das estatinas contra o estresse oxidativo vêm sendo demonstrados em diversos estudos na literatura, tanto em modelos animais da DA como outras enfermidades neurodegenerativas (Kurata et al., 2013; Barone et al., 2014).

O NO é um radical reativo que atua como uma importante molécula sinalizadora oxidativa, participando de uma grande variedade de processos fisiológicos, como neurotransmissão, mecanismos de defesa, relaxamento muscular, regulação da pressão arterial e regulação do sistema imune (Bergendi et al., 1999). Uma superprodução desses radicais levam a um estresse nitrosativo que podem acarretar em deterioração de estruturas de proteínas, impedindo seu funcionamento fisiológico normal. Deste modo avaliamos a expressão de NOS2, uma das enzimas responsáveis pela produção de NO, no hipocampo de animais infundidos com A $\beta$ . Esta isoforma está associada a processos inflamatórios, que já foram bem estabelecidos em pacientes com DA. Entretanto em nosso modelo experimental não houve alterações na expressão desta proteína entre os grupos estudados. Apesar destes resultados, a produção de NO pode estar ocorrendo de outra forma, como por exemplo, através da NOS1, onde a produção do radical livre NO é estimulada pelo influxo de Ca<sup>2+</sup> celular, mostrando uma relação com receptores de glutamato, em especial o NMDA. De fato, dados da literatura demonstram que uma via bem estabelecida para a produção de NO em várias doenças neurodegenerativas envolve a ativação dos receptores NMDA. No cérebro, NOS1 é predominantemente expressa em neurônios e fisicamente ligada a receptores NMDA devido a interações mútuas com a PSD-95 na densidade pós-sináptica (Nakamura et al., 2013). Além disso, estudos sugerem que a atorvastatina possui efeito na modulação de receptores NMDA (Bösel et al., 2005) e que estatinas interagem com receptores NMDA (Wang et al., 2009).

A enzima NOS1 é o principal produtor de óxido nítrico (NO) no cérebro e uma das isoformas NOS que exibem padrões aberrantes de expressão na DA, alterando a sinalização intracelular ea homeostase redox, levando ao dano ao estresse nitroso (Hannibal, 2016). A ativação de NOS1 através de receptores NMDA (NMDAR) requer interação com a proteína PSD-95, que forma um complexo NMDAR / PSD-95 / NOS1. A associação NMDAR / PSD-95 / NOS1 desempenha um papel

importante em várias funções neuronais normais, incluindo plasticidade sináptica e aprendizagem e memória, bem como desordens fisiopatológicas do cérebro (Doucet et al., 2011). Nossos dados mostram uma redução nos níveis de RNAm de NOS1 após o tratamento com atorvastatina, A $\beta$  e atorvastatina + A $\beta$  no hipocampo. Este efeito promovido pela atorvastatina era esperado uma vez que é bem conhecido que a atorvastatina possui propriedades antioxidantes (Martins et al., 2015, Ludka et al., 2016). Foi demonstrado que a atorvastatina melhora as fases de consolidação e recuperação da memória em um estudo de indução de prejuízo cognitivo com escopolamina. A adição de L-arginina, um precursor de NO, potencializa os efeitos da atorvastatina mostrando que o NO pode estar envolvido na melhoria da consolidação da memória espacial promovida por esta estatina (Rayatnia et al., 2011). A atorvastatina não foi capaz de alterar a expressão do gene NOS1 no córtex frontal. Curiosamente, a redução obtida pela infusão de A $\beta$  em nossos dados está em conflito com a literatura, uma vez que a maioria dos estudos mostra aumento da expressão gênica e da atividade da NOS1 em modelos de DA (Zara et al., 2011; Nakamura et al., 2013). Isto pode ser explicado pelo período inicial em que os níveis de RNAm foram avaliados após a infusão de A $\beta$ . Assim como nos resultados de BDNF, a diminuição dos níveis de RNAm de NOS1 por A $\beta$ <sub>1-40</sub> pode ser interpretado como uma resposta compensatória à sua toxicidade.

A mitocôndria é uma importante fonte de EROs intracelular, além disso, a toxicidade promovida por A $\beta$  e acúmulo excessivo de NO podem acarretar em disfunção desta organela (Rönnbäck et al., 2015). A aplicação de A $\beta$  em culturas mistas de neurônios e astrócitos induz uma despolarização mitocondrial lenta e progressiva em astrócitos e uma perda transiente de potencial de membrana mitocondrial (Angelova et al., 2014).

A indução de mudanças no potencial de membrana pelo A $\beta$  necessitam de uma sinalização de cálcio e/ou EROs, produzidos pela NADPH oxidase (Abramov et al., 2005). Assim, analisamos possíveis mudanças no potencial de membrana mitocondrial e nos complexos da cadeia respiratória em animais infundidos com A $\beta$ , bem como os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina. A toxicidade promovida pelo A $\beta$  por 24h não alterou o potencial de membrana mitocondrial de modo significativo em relação aos animais controle, sendo que o mesmo foi observado em animais tratados com atorvastatina. Nenhuma alteração foi obtida na atividade do complexo I da cadeia respiratória, onde os níveis de NADH desidrogenase permaneceram iguais em todos os

grupos. Entretanto quando avaliado o complexo II, observou-se uma diminuição da atividade da enzima succinato desidrogenase nos grupos tratados com atorvastatina ou A $\beta$ . Os animais que receberam ambos os tratamentos também tiveram uma diminuição na atividade desta enzima, porém não estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. No complexo IV o grupo tratado com atorvastatina + A $\beta$  apresentou um aumento na atividade da citocromo C oxidase. Estudos mostram anormalidades e diminuição da atividade de todas as enzimas da cadeia respiratória, especialmente na atividade de NADH desidrogenase (complexo I) e citocromo C oxidase (complexo IV) em pacientes e modelos de DA (Hroudová et al., 2016).

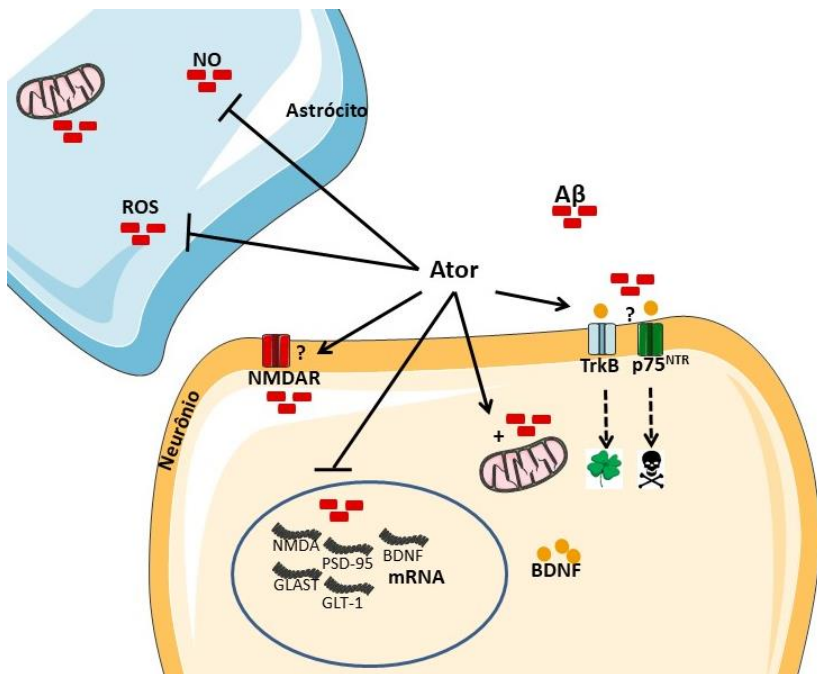
A modulação da atividade dos complexos da cadeia mitocondrial pela toxicidade do A $\beta$ , pode levar a um aumento do estresse oxidativo, através de uma maior produção de superóxidos e/ou comprometimento bioenergético mitocondrial, que por sua vez aumenta a produção de A $\beta$ , gerando um ciclo vicioso (Parks et al., 2001). Como em nosso protocolo a toxicidade do A $\beta$  foi avaliada após um curto período de tempo, talvez ainda não seja o suficiente para causar alterações visíveis na atividade de todos os complexos. De fato foi demonstrado que a neurotoxicidade induzida por A $\beta$  inicialmente requer uma cadeia respiratória mitocondrial funcional (Cardoso et al., 2001; 2004) e é exacerbada em sinergia com a disfunção mitocondrial em modelos celulares híbridos de DA.

A medição do consumo de oxigênio em homogenato de tecido hipocampal de animais infundidos com A $\beta$  por respirometria de alta resolução em um oxígrafo (Oroboros) é uma técnica relativamente nova e permite avaliar a funcionalidade da mitocôndria na presença de seus substratos, bem como avaliar a respiração máxima e independente da produção de ATP e fosforilação oxidativa (Gnaiger, 2012). Apesar de não possuir muitos trabalhos na literatura, a utilização de homogenato de tecido apresentam valores consistentes com os resultados obtidos com preparados de mitocôndrias isoladas. Além disso, tem sido discutido que os procedimentos de isolamento mitocondrial podem ter impacto sobre a função mitocondrial ou podem representar uma seleção para determinadas subpopulações mitocondriais, o que não ocorre em homogenato de tecido, que pode ser obtido sem prejuízo da membrana mitocondrial externa (Makrecka-Kuka et al., 2015). Pelo o que sabemos este estudo é o primeiro a utilizar esta técnica em um modelo animal da DA através da infusão de A $\beta$ .

Observamos que a respiração mitocondrial basal não se encontra alterada pelo tratamento com atorvastatina e/ou A $\beta$ . A infusão

de A $\beta$  não alterou respiração mitocondrial/consumo de oxigênio em nenhuma das etapas do ensaio, possivelmente pelo curto espaço de tempo analisado. Dados na literatura mostram uma diminuição nas taxas de consumo de oxigênio basal, capacidade respiratória máxima, síntese de ATP e tendência para diminuir a capacidade de reserva de oxigênio após injeção i.c.v. aguda de estreptozotocina em ratos. Este mesmo estudo mostrou também uma diminuição dependente da idade (3-6, 12 e 18 meses) em todos os parâmetros avaliados no teste em animais transgênicos 3TgAD e não transgênicos (Dias et al., 2014). Em nosso estudo, o pré-tratamento com atorvastatina *per se* aumenta a respiração mitocondrial após a adição de ADP e succinato. Nesta etapa os complexos I e II encontram-se ativados e o transporte de elétrons está acoplado a fosforilação oxidativa (síntese de ATP). Além disso, este aumento se mantém elevado até o final do ensaio quando os complexos são inibidos e então avalia-se o consumo de oxigênio extra-mitocondrial. Desta forma, demonstramos que após 24 horas da infusão com A $\beta$  ainda não são observadas alterações significativas na funcionalidade mitocondrial. No entanto, identificamos que o tratamento com atorvastatina é efetivo em aumentar a capacidade respiratória mitocondrial no hipocampo de camundongos.

As estatinas têm sido implicadas em diversos efeitos protetores, como antioxidantes, diminuição de cálcio intramitocondrial, diminuição do estresse oxidativo, além de evitar a abertura dos poros da transição da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c das mitocôndrias (Parihar et al., 2012, Zhao et al. 2015). Por outro lado, tem sido relatado que o uso clínico de estatinas para redução dos níveis de colesterol sérico, pode causar miopatias em uma parcela pequena, de menos de 10% dos usuários e estas miopatias estariam associadas a uma alteração na capacidade mitocondrial do músculo esquelético (Apostolopoulou et al., 2015). Um estudo em cachorros envelhecidos, demonstrou que o tratamento com alta dose de atorvastatina reduz a capacidade cognitiva e os níveis séricos de coenzima Q10, sugerindo uma alteração mitocondrial (Martin et al., 2011). No entanto, nesta tese identificamos que o tratamento com atorvastatina melhora a função mitocondrial no hipocampo de roedores, mesmo após a infusão do peptídeo A $\beta$ . O mecanismo de ação da atorvastatina ainda não está esclarecido, portanto estudos adicionais são necessários para compreender tanto os mecanismos de neuroproteção da atorvastatina, como os de toxicidade do peptídeo A $\beta$ . A Figura 17 ilustra os principais achados desta tese.



**Figura 17. Efeitos da atorvastatina e Aβ<sub>1-40</sub> em células do sistema nervoso.**

A infusão do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> promoveu alterações em diferentes mecanismos celulares em um curto período de tempo. Causou diminuição de RNAm de PSD-95, NMDAR e dos transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1) no hipocampo, sendo que a atorvastatina foi capaz de prevenir estas alterações. Aβ<sub>1-40</sub> aumentou também os níveis de espécies reativas de oxigênio e a atorvastatina se mostrou eficaz na prevenção do estresse oxidativo. A expressão de BDNF maduro encontra-se reduzida no hipocampo de animais infundidos com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> e sua expressão gênica está aumentada no hipocampo e no córtex. Com estes dois últimos dados pode-se inferir que ocorre um aumento de pró-BDNF, que se liga à receptores p75<sup>NTR</sup>, levando a dano neuronal. A atorvastatina promoveu aumento na capacidade de respiração mitocondrial.

## 7. CONCLUSÕES

- A infusão de  $A\beta_{1-40}$  diminuiu os níveis de RNAm da subunidade GluN1 do receptor de glutamato NMDA, da PSD-95 e dos transportadores GLAST e GLT-1 no hipocampo. A atorvastatina preveniu os efeitos do  $A\beta$ .

- No córtex a atorvastatina *per se* aumentou a expressão gênica destas proteínas, entretanto o co-tratamento com  $A\beta$  promoveu uma redução na expressão gênica destas proteínas.

- A infusão de  $A\beta_{1-40}$  reduziu os níveis de RNAm de NOS1 na região cortical, enquanto o tratamento prévio com atorvastatina nestes animais parece potencializar o efeito de  $A\beta$ . Na região do hipocampo ambos os tratamentos com atorvastatina,  $A\beta_{1-40}$  e atorvastatina +  $A\beta_{1-40}$  diminuíram os níveis de RNAm desta enzima.

- A atorvastatina, o  $A\beta$  e a atorvastatina +  $A\beta$  aumentaram a expressão gênica de BDNF na região hipocampal. No córtex o mesmo padrão foi observado nos grupos da atorvastatina e  $A\beta$ . Entretanto, não houve alteração nos níveis de RNAm para BDNF na região cortical após o tratamento de atorvastatina +  $A\beta_{1-40}$ .

- A infusão de  $A\beta_{1-40}$  reduziu a expressão proteica de BDNF maduro no hipocampo de camundongos. A atorvastatina não preveniu este efeito. Nenhuma alteração foi observado no imunoconteúdo de PSD-95, sinaptofisina e doublecortina.

- A atorvastatina preveniu o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas fatias hipocampais promovidas pela infusão de  $A\beta_{1-40}$ .

- O potencial de membrana mitocondrial não foi alterado no hipocampo de camundongos submetidos à infusão de  $A\beta_{1-40}$ .



- A atividade da enzima succinato desidrogenase (complexo II da cadeia respiratória) foi reduzida pelo tratamento com atorvastatina e infusão de A $\beta$ . Além disso, o co-tratamento com as drogas aumentou a atividade da citocromo c oxidase (complexo IV).

- O tratamento com atorvastatina aumentou a capacidade respiratória mitocondrial em homogenatos de hipocampo. A infusão de A $\beta$ <sub>1-40</sub> não apresentou nenhum efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial.

## 8. PERSPECTIVAS

- Estudar a ação da atorvastatina sobre as atividades dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória em homogenatos de hipocampo de camundongos 7 dias após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ , quando se sabe que estes apresentam déficits cognitivos.

- Observar os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina na expressão das proteínas BDNF, PSD-95, sinaptofisina e doublecortina no hipocampo de camundongos após 48h e 7 dias a infusão de  $A\beta$ , quando já se sabe que estes apresentam déficits cognitivos.

- Avaliar a interação NOS1/PSD-95/NMDAR em nosso protocolo, analisando a funcionalidade do receptor NMDA.

- Observar os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina no consumo de oxigênio mitocondrial em homogenatos de hipocampo de camundongos 7 dias após a infusão de  $A\beta_{1-40}$ ;

- Avaliar o perfil de SUMOilação, observando os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina e da infusão de peptídeo  $A\beta_{1-40}$  sobre os níveis de SUMO-1, SUMO-2, SENP1 e UBE2I/Ubc9 no hipocampo de camundongos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamson EE, Ikonovic MD, Dixon CE, Dekosky ST. “Simvastatin therapy prevents brain trauma-induced increases in beta-amyloid peptide levels”. *Ann Neurol.* 66(3):407-14, 2009.

Abramov AY, Duchon MR. “The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360(1464):2309-14, 2005.

Amoêdo ND, Rodrigues MF, Pezzuto P, Galina A, da Costa RM, de Almeida FC, El-Bacha T, Rumjanek FD. “Energy metabolism in H460 lung cancer cells: effects of histone deacetylase inhibitors”. *PLoS One.* 6(7):e22264, 2011.

Anantharaman M, Tangpong J, Keller JN et al. “ $\beta$ -amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLh/NLh X PS-1 P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer’s disease,” *American J Pathol.* 168(5):1608–18, 2006.

Angelova PR, Abramov AY. “Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of A $\beta$ -induced neurotoxicity”. *Biochem Soc Trans.* 2014 42(5):1286-90, 2014.

Apostolopoulou M, Corsini A, Roden M. “The role of mitochondria in statin-induced myopathy”. *Eur J Clin Invest.* 45(7):745-54, 2015.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. “Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain”. *EMBO J.* 1(5):549-53, 1982.

Barone E, Cenini G, Di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C, Murphy MP, Head E, Butterfield DA. “Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action”. *Pharmacol Res* 63(3):172-80, 2011.

Barone E, Mancuso C, Di Domenico F, Sultana R, Murphy MP, Head E, Butterfield DA. “Biliverdin reductase-A: a novel drug target for atorvastatin in a dog pre-clinical model of Alzheimer disease”. *J Neurochem.* 120(1):135-46, 2012.

Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA. "Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets". *Biochem Pharmacol.* 88(4):605-16, 2014.

Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. "Chemistry, physiology and pathology of free radicals". *Life Sci.* 65(18-19):1865-74, 1999.

Bernardi A, Frozza RL, Meneghetti A, Hoppe JB, Battastini AM, Pohlmann AR, Guterres SS, Salbego CG. "Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A $\beta$ 1-42 in Alzheimer's disease models". *Int J Nanomedicine.* 7:4927-42, 2012.

Bicca MA, Figueiredo CP, Piermartiri TC, Meotti FC, Bouzon ZL, Tasca CI, Medeiros R, Calixto JB. "The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-decahydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid- $\beta$  in mice". *Neuroscience.* 192:631-41, 2011.

Blennow, K., De Leon, M.J., Zetterberg, H. "Alzheimer's disease". *Lancet* 368(9533):387-403, 2006.

Bonde, C., Sarup, A., Schousboe, A., Gegelashvili, G., Zimmer, J., Noraberg, J. "Neurotoxic and Neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions". *Neurochem. Int.* 43:371-80, 2003.

Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hörtnagl H, Fink KB, Endres M. "Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones". *J Neurochem.* 92(6):1386-98, 2005.

Bunn, S.J., Sim, A.T.R., Herd, L.M., Austin, L.M., Dunkley, P.R. "Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular calcium in the Ser<sup>8</sup>, Ser<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup> and Ser<sup>40</sup>". *J Neurochem.* 64:1370-78, 1995.

Burtscher J, Zangrandi L, Schwarzer C, Gnaiger E. “Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry”. *Mitochondrion*. 25:104-12, 2015.

Butterfield DA, Lauderback CM. “Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer’s disease brain: potential causes and consequences involving amyloid- $\beta$ -peptide associated free radical oxidative stress”. *Free Radic Biol Med*. 32:1050–60, 2002.

Campos-Peña V, Meraz-Ríos MA. “Alzheimer Disease: The Role of A $\beta$  in the Glutamatergic System”. *Neurochemistry*, Dr. Thomas Heinbockel (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/57367, 2014.

Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR. “Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity”. *FASEB J*. 15:1439–41, 2001.

Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. “Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A $\beta$  toxicity”. *J Neurochem*. 89:1417–26, 2004.

Caspersen C, Wang N, Yao J et al. “Mitochondrial A $\beta$ : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer’s disease,” *FASEB J*. 19(14):2040–41, 2005.

Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipasquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, Laferla FM, Nicoletti F, Cuomo V, Vendemiale G. “Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease”. *Neurobiol Aging* 33(6):1121.e1–1121.e12, 2012.

Cassina A, Radi R. “Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport”. *Arch Biochem Biophys*. 328(2):309-16, 1996.

Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD. “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* 1513:103-16, 2013.

Chen J, Li CR, Yang H, Liu J, Zhang T, Jiao SS, Wang YJ, Xu ZQ. "proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice". *Neurotox Res.* 29(1):47-53, 2015.

Chong Y. "Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells". *Life Sci.* 61:2323-33, 1997.

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. "An Overview of APP Processing Enzymes and Products". *Neuromolecular Med.* 12(1): 1–12, 2011.

Danbolt, N.C. "Glutamate uptake". *Prog. Neurobiol.* 65:1-105, 2001.

Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. "Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease". *J Biol Chem.* 23;285(17):12463-8, 2010.

Decker H, Jürgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Epstein AL, De Felice FG, Jerusalinsky D, Ferreira ST. "N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers". *J Neurochem.* 115(6):1520-9, 2010.

Dias C, Barbosa RM, Laranjinha J, Ledo A. "Evaluation of Mitochondrial Function in the CNS of Rodent Models of Alzheimer's Disease - High Resolution Respirometry Applied to Acute Hippocampal Slices". *Free Radic Biol Med.* 75(1):S37, 2014.

Doucet MV, Harkin A, Dev KK. "The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression?" *Pharmacol Ther* 133(2):218-29, 2012.

Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT. "Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease," *The FASEB J.* 23 (8): 2459–66, 2009.

Echtay KS. "Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role?" *Free Rad Biol Med.* 43(10):1351–71, 2007.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. "Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils". *Nature*. 382:716-19, 1996.

Finkel, T. "Signal transduction by reactive oxygen species". *J. Cell Biol.* 194:7–15, 2011.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. "Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle". *Clin Chim Acta*. 153(1):23-36, 1985.

Gnaiger E. "Mitochondrial Pathways and Respiratory Control" Mitochondr Physiol Network. OROBOROS MiPNet Publications, 2012.

Grundke-Iqbal I. "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology". *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:4913–4917, 1986.

Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, May PC. "Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells". *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10738-41, 1995.

Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S, Rauen T. "Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia". *IUBMB Life*. 60(9):609-19, 2008.

Haass C, Selkoe DJ. "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide". *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(2):101-12, 2007

Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. "Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary". *Neuron*. 6(5):845-58, 1991.

Hannibal L. "Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases". *Curr Alzheimer Res* 13(2):135-49, 2016.

Hartmann T, Kuchenbecker J, Grimm MOW. "Alzheimer's disease: the lipid connection". *J Neurochem.* 103:159–70, 2007.

Hazar N, Seddigh L, Rampisheh Z, Nojomi M. "Population attributable fraction of modifiable risk factors for Alzheimer disease: A systematic review of systematic reviews". *Iran J Neurol.* 15(3):164-72, 2016.

Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family". *Nature.* 344(6264):339-41, 1990.

Hroudová J, Singh N, Fišar Z, Ghosh KK. "Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *Eur J Med Chem.* 121:774-84, 2016.

Iwasaki Y, Negishi T, Inoue M, Tashiro T, Tabira T, Kimura N. "Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *J Neurosci Res* 90:981–89, 2012.

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. "Statins and the risk of dementia". *Lancet* 356: 1627-1631, 2000.

Jin K, Peel AL, Mao YO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. "Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 343–47, 2004.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics". *Nat Rev Drug Discov.* 10(9):698-712, 2011.

Karran E, De Strooper B. "The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure?". *J Neurochem.* 2:237-52, 2016.

Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. "Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics". *J Cell Physiol.* 226(10):2484-93, 2011.



Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. "Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice". *Brain Res.* 1371:161-70, 2011.

Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Kawai H, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K. "Atorvastatin and pitavastatin reduce oxidative stress and improve IR/LDL-R signals in Alzheimer's disease". *Neurol Res.* 35(2):193-205, 2013.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease". *Nat Rev Neurosci.* 8(7):499-509, 2007.

Lanznaster D, Mack JM, Coelho V, Ganzella M, Almeida RF, Dal-Cim T, Hansel G, Zimmer ER, Souza DO, Prediger RD, Tasca CI. "Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- $\beta$ <sub>1-40</sub> Administration in Mice". *Mol Neurobiol.* 54(7):5482-96, 2017.

Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF". *Brain Res* 1621:82-101, 2015.

Lee J-K, Won J-S, Singh AK, Singh I. "Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death". *Neuroscience Letters.* 440: 260–64, 2008.

Lee VM, Trojanowski JQ. "Progress from Alzheimer's tangles to pathological tau points towards more effective therapies now". *J Alzheimers Dis.* 9(3):257-62, 2006.

Levi-Montalcini R, Cohen S. "In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 42(9):695-9, 1956.

Levy-Lahad, E., Lahad, A., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. "Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease". *Ann. Neurol.* 38(4):678-680, 1995.

Lim JY, Reighard CP, Crowther DC. "The pro-domains of neurotrophins, including BDNF, are linked to Alzheimer's disease

through a toxic synergy with A $\beta$ ". *Hum Mol Genet.* 24(14):3929-38, 2015.

Livak KJ, Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))". *Method. Methods* 25(4):402-8, 2001.

Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF, Sathler LB, Brito-Moreira J, Amaral OB, Silva CA, Freitas-Correa L, Espírito-Santo S, Campello-Costa P, Houzel JC, Klein WL, Holscher C, Carvalheira JB, Silva AM, Velloso LA, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. "TNF- $\alpha$  mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid oligomers in mice and monkeys". *Cell Metab.* 18(6):831-43, 2013.

Ludka FK, Zomkowski AD, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni AL, Rodrigues AL, Tasca CI. "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(5):400-12, 2013.

Ludka FK, Dal-Cim T, Binder LB, Constantino LC, Massari C, Tasca CI. "Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices". *Mol Neurobiol.* 54(5):3149-61, 2017.

Makrecka-Kuka M, Krumschnabel G, Gnaiger E. "High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria". *Biomolecules.* 5(3):1319-38, 2015.

Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. "Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression," *Human Mol. Gen.* 15(9):1437-49, 2006.

Martin SB, Cenini G, Barone E, Dowling AL, Mancuso C, Butterfield DA, Murphy MP, Head E. "Coenzyme Q10 and cognition in atorvastatin treated dogs". *Neurosci Lett.* 501(2):92-5, 2011.

Martins WC, dos Santos VV, dos Santos AA, Vandresen-Filho S, Dal-Cim TA, de Oliveira KA, Mendes-de-Aguiar CB, Farina M, Prediger RD, Viola GG, Tasca CI. "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, 2015.

Martins WC, Tasca CI, Cimarosti H. Battling Alzheimer's Disease: Targeting SUMOylation-Mediated Pathways. *Neurochem Res.* 41(3):568-78, 2016.

Masters CL, Selkoe DJ. "Biochemistry of Amyloid b-Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease". *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(6):a006262, 2012.

Mattson, M. P. "Pathways towards and away from Alzheimer's disease". *Nature* 430: 631–39, 2004.

Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB. "Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein". *J Neurosci.* 27(20): 5394-404, 2007.

Meldrum, B.S. "Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology". *J. Nutr.* 130:1007S-1015S, 2000.

Michaelis, E.K. "Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their Role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging". *Prog. Neurobiol.* 54: 369-415, 1998.

Murakami K, Murata N, Noda Y et al. "SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease." *J Biol Chem.* 286:44557–68, 2011.

Murphy MP, Morales J, Beckett TL, Astarita G, Piomelli D, Weidner A, Studzinski CM, Dowling AL, Wang X, Levine H 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, Barrett E, Head E. "Changes in cognition and amyloid- $\beta$  processing

with long term cholesterol reduction using atorvastatin in aged dogs". *J Alzheimers Dis.* 22(1):135-50, 2010.

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease," *J Neurochem.* 63(6):2179–84, 1994.

Nakamura T, Lipton SA. "S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding". *Cell Death Differ.* 14:1305–14, 2007.

Nakamura T, Tu S, Akhtar MW, Sunico CR, Okamoto S, Lipton SA. "Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases". *Neuron.* 78(4):596-614, 2013.

Nath N, Giri S, Prasad R, Singh AK, Singh I. "Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy". *J. Immunol.* 172: 1273–86, 2004.

Nelson DL, Cox MM. "Lehninger principles of biochemistry – 3<sup>rd</sup> ed". New York, Worth Publishers. 799-814, 2000.

Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. "Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration". *J Toxicol.* 2011:4051-94, 2011.

Onyango IG, Khan SM, Bennett JP Jr. "Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Front Biosci (Landmark Ed)*22:854-72, 2017.

Paintlia AS, Paintlia MK, Khan HM, Volmer T, Singh AK, Singh I. "HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis". *FASEBJ.* 19: 1407–1421, 2005.

Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK. "Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury" *J. Neurochem.* 101: 182–200, 2007.

Parihar A, Parihar MS, Zenebe WJ, Ghafourifar P. "Statins lower calcium-induced oxidative stress in isolated mitochondria". *Hum Exp Toxicol.* 31(4):355-63, 2012.

Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennett JP Jr, Parker WD Jr. "Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro". *J Neurochem.* 76(4):1050-6, 2001.

Peng S, Wu J, Mufson EJ, 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.* 93:1412-21, 2005.

Peng S, Garzon DJ, Marchese M, Klein W, Ginsberg SD, Francis BM, Mount HT, Mufson EJ, Salehi A, Fahnstock M. "Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease". *J Neurosci* 29(29):9321-9, 2009.

Piermartiri TCB, Vandresen-Filho S, Herculano BA, Martins WC, Dal'agnolo D, Stroeh E, Carqueja CL, Boeck CR, Tasca CI. "Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death Due to Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice by Increasing Akt phosphorylation and Glutamate Uptake". *Neurotox Research.* 16(2): 106-15, 2009.

Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, De Bem AF, Prediger RDS, Tasca CI. "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(2):274-84, 2010.

Poirier J. "Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease". *Trends Neurosci.* 17:525-30, 1994.

Poirier, J. "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease". *Neurobiol. Aging* 26(3):355-61, 2005.

Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL. "Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response". *Behav Brain Res.* 177(2): 205-13, 2007.

Prediger RD, Medeiros R, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB, Takahashi RN. "Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease". *Neuroscience.* 151(3):631-43, 2008.

Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M. "World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost & trends" Alzheimer's Disease International, 2015.

Puglielli L. "Aging of the brain, neurotrophin signaling, and Alzheimer's disease: Is IGF1-R the common culprit?". *Neurobiol Aging.* 29(6): 795–811, 2008.

Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez C, Maccioni RB. "Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway". *Exp Cell Res.* 295:245-257, 2004.

Rapp A, Gmeiner B, Huttinger M. "Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes". *Biochimie* 88:473–83, 2006.

Rayatnia F, Javadi-Paydar M, Allami N, Zakeri M, Rastegar H, Norouzi A, Dehpour AR. "Nitric oxide involvement in consolidation, but not retrieval phase of cognitive performance enhanced by atorvastatin in mice". *Eur J Pharmacol* 666(1-3):122-30, 2011.

Reddy AP, Reddy PH. "Mitochondria-Targeted Molecules as Potential Drugs to Treat Patients With Alzheimer's Disease". *Prog Mol Biol Transl Sci.* 146:173-201, 2017.

Regan MC, Romero-Hernandez A, Furukawa H. "A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function". *Curr Opin Struct Biol.* 33:68-75, 2015.

Riccio A, Alvania RS, Lonze BE, Ramanan N, Kim T, Huang Y, Dawson TM, Snyder SH, Ginty DD. "A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons". *Mol Cell* 21(2):283-94, 2006.

Rönnbäck A, Pavlov PF, Mansory M, Gonze P, Marlière N, Winblad B, Graff C, Behbahani H. "Mitochondrial dysfunction in a transgenic mouse model expressing human amyloid precursor protein (APP) with the Arctic mutation". *J Neurochem.* 136(3):497-502, 2016.

Rossello XS, Igbavboa U, Weisman GA, Sun GY, Wood WG. "AP-2b regulates amyloid beta-protein stimulation of apolipoprotein E transcription in astrocytes". *Brain Res.* 1444:87–95, 2012.

Rustin P, Lebidois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rötig A, Munnich A, Sidi D. "Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies". *J Pediatr.* 124(2):224-8, 1994.

Schachter M. "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update". *Fundam Clin Pharmacol* 19(1):117-125, 2005.

Schallier A, Smolders I, Van Dam D, Loyens E, De Deyn PP, Michotte A, Michotte Y, Massie A. "Region- and age-specific changes in glutamate transport in the A $\beta$ PP23 mouse model for Alzheimer's disease". *J Alzheimers Dis* 24(2):287-300, 2011.

Shin MK, Kim HG, Baek SH, Jung WR, Park DI, Park JS, Jo DG, Kim KL. "Neuropep-1 ameliorates learning and memory deficits in an Alzheimer's disease mouse model, increases brain-derived neurotrophic factor expression in the brain, and causes reduction of amyloid beta plaques". *Neurobiol Aging* 35:990–1001, 2014.

Stanislaus R, Pahan K, Singh AK, Singh I. "Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin". *Neurosci. Lett.* 269: 71–74, 1999.

Swerdlow RH, Koppel S, Weidling I, Hayley C, Ji Y, Wilkins HM. "Mitochondria, Cybrids, Aging, and Alzheimer's Disease". *Prog Mol Biol Transl Sci.* 146:259-302, 2017.

Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Kano M, Morishita R. "Validation of A $\beta$ 1-40 Administration into Mouse Cerebroventricles as an animal Model for Alzheimer Disease". *Brain Res.* 1280: 137-47, 2009.

Thomaz DT, Dal-Cim TA, Martins WC, Cunha MP, Lanznaster D, Bem AF, Tasca CI. "Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation" *Purinergic Signal* 12(4): 707-18, 2016.

Van Dam D, De Deyn PP. "Drug discovery in dementia: the role of rodent models". *Nat Rev Drug Discov.* 5(11): 956-70, 2006.

Walsh, D.M., Selkoe, D.J. "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease". *Neuron.* 44:181-93, 2004.

Wang Q, Zengin A, Deng C, Li Y, Newell KA, Yang GY, Lu Y, Wilder-Smith EP, Zhao H, Huang XF. "High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain". *Exp Neurol.* 216(1):132-8, 2009.

Waters DD. "Safety of high-dose atorvastatin therapy". *Am J Cardiol.* 96(5A): 69F-75F, 2005.

Whitfield JF. "Can statins put the brakes on Alzheimer's disease?". *Expert Opin Investig Drugs.* 15:1479-85, 2006.

Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors". *Arch Neurol.* 57: 1439-1443, 2000.



Yao M, Nguyen TVV, Pike CJ. “ $\beta$ -Amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w,” *J Neurosci.* 25:1149–58, 2005.

Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, Kinoshita A, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M. “DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease”. *Sci Rep.* 4:7130, 2014.

Zara S, Di Stefano A, Nasuti C, Rapino M, Patrino A, Pesce M, Sozio P, Cerasa LS, Cataldi A. “NOS-mediated morphological and molecular modifications in rats infused with A $\beta$  (1-40), as a model of Alzheimer's disease, in response to a new lipophilic molecular combination codrug-1”. *Exp Gerontol.* 46(4):273-81, 2011.

Zhang YY, Fan YC, Wang M, Wang D, Li XH. “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”. *Clin Interv Aging.* 8:103-10, 2013.

Zhang L, Fang Y, Lian Y, Chen Y, Wu T, Zheng Y, Zong H, Sun L, Zhang R, Wang Z, Xu Y. “Brain-derived neurotrophic factor ameliorates learning deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by a $\beta$ 1-42”. *PLoS One* 10(4):e0122415, 2015.

Zhang Y, Li P, Feng J, Wu M. “Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease”. *Neurol Sci* 37(7):1039-47, 2016.

Zhao Z, Cui W, Zhang H, Gao H, Li X, Wang Y, Hu H, Li B. “Pre-treatment of a single high-dose of atorvastatin provided cardioprotection in different ischaemia/reperfusion models via activating mitochondrial KATP channel”. *Eur J Pharmacol.* 751: 89-98, 2015.

Zhou XF, Li WP, Zhou FH, Zhong JH, Mi JX, Wu LL, Xian CJ. “Differential effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor on the survival of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia: a possible role for the p75 neurotrophin receptor”. *Neuroscience,* 132:591–603, 2005.