

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

Samuel Vandresen Filho

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
ATORVASTATINA SOBRE TOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, na área de Neurobiologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

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

Coorientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

Vandresen-Filho, Samuel

Estudo do Efeito Neuroprotetor da Atorvastatina sobre a Toxicidade Glutamatérgica [tese] / Samuel Vandresen-Filho ; orientadora, Carla Inês Tasca ; co-orientador, Rodrigo Bainy Leal. - Florianópolis, SC, 2012.

193 p. ; 21cm

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

Inclui referências

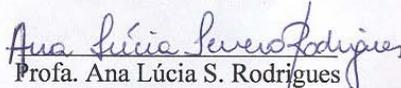
1. Neurociências. 2. Estatinas. 3. Ácido Quinolínico. 4. Excitotoxicidade. 5. Neuroproteção. I. Tasca, Carla Inês. II. Leal, Rodrigo Bainy. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

SAMUEL VANDRESEN FILHO

**“ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
ATORVASTATINA SOBRE A TOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA”.**

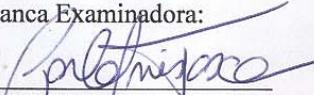
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 31 de julho de 2012.

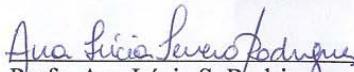


Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

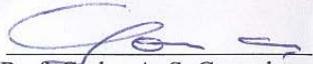
Banca Examinadora:



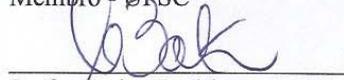
Prof. Carla Inês Tasca
Orientadora - UFSC



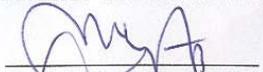
Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



Prof. Carlos A. S. Gonçalves
Membro da Banca Externo



Prof. Carina Rodrigues Boeck
Membro da Banca Externo



Prof. Nelson H. Gabilan
Membro - UFSC



Prof. Cláudia B. N. Mendes de Aguiar
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Samuel e Irene pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a toda minha família, em especial minha irmã Júlia e ao meu cunhado Camilo e aos meus primos Didio, Ricardo, Carlos, Rui, Camila e Simone.

Agradeço à minha orientadora Dra. Carla I. Tasca, pela oportunidade, pelos ensinamentos científicos, pela compreensão, paciência e motivação que tanto me ajudaram durante o mestrado e doutorado. Agradeço também ao seu marido Rogério por ser gente boa.

Ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Bairy Leal pela amizade e auxílio técnico.

Agradeço à minha querida Juliana pelo amor, amizade, companheirismo, apoio e dedicação em todos os momentos. Sua determinação e força de vontade são fontes de inspiração para mim.

Aos atuais e antigos membros do laboratório pela amizade, discussões científicas, churrascos e visitas ao IEGA. Agradeço em especial ao Wagner, Bruno, Tharine, Simone, Ana Zeni e Karen.

A todos os professores do curso, pela amizade e pelo prazer em ensinar. Agradeço em especial aos professores Moacir, Nelson, Marino, Marta, Marcelo e Ana Lúcia.

Ao povo dos outros laboratórios do corredor, em especial ao Giani, Débora, Alessandra, Mark, Felipe, Ana Paula, Giordano.

Aos meus amigos e amigas de mestrado e doutorado, especialmente ao Fábio, Eduardo, Vanessa, Alexandre e Marcelo.

Agradeço a Cláudia e ao Lúcio pela amizade e por tudo que fizeram por mim desde que cheguei a Florianópolis.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Carlos Jabur Gaziri, meu mentor e amigo. Pessoa mais brilhante com a qual tive oportunidade de conviver, sua perda jamais será esquecida.

Aos professores da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos durante minha graduação.

À Prof^a. Dr^a. Thereza C. M. de Lima e Prof^a. Dr^a. Andreza F. de Bem pela colaboração e o uso de seus laboratórios.

Agradeço à Steffania, Alessandra e Robson da Fármaco pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae pelo incentivo, dicas e pelas conversas descontraídas no corredor.

Agradeço à Cris e ao Serginho pela amizade em todos os momentos.

Aos meus amigos do Paraná: Marcel, Vinicius, Fernando, Gilberto e Emerson pela amizade nos momentos bons e ruins.

Aos amigos que conheci em minha jornada em Lages e Blumenau:
Ademar, Vinicius, Oliveira e Fábio.

Ao Nivaldinho da secretaria do PPG pela sua dedicação aos alunos.

Agradeço à banca examinadora por aceitar o convite.

A todos os amigos e amigas, pelos atos, sugestões e críticas que me ajudaram nesta jornada.

Agradeço ao Corinthians por me dar alegria ao conquistar a tão sonhada Libertadores.

À CAPES e a bolsa PROCAD, pelo financiamento da bolsa de estudo.

Agradeço a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase, chamados clinicamente de estatinas, são potentes redutores dos níveis séricos de colesterol através da inibição da síntese de mevalonato. Além dos efeitos protetores sobre doenças cardiovasculares, o tratamento com estatinas tem demonstrado efeito neuroprotetor em diversos modelos de doenças neurológicas. Nesse estudo, demonstramos que o tratamento com atorvastatina apresentou efeitos neuroprotetores em modelos de excitotoxicidade *in vivo* e *in vitro*. O tratamento de camundongos por 7 dias com atorvastatina 10 mg/kg/dia promoveu uma diminuição de 30% na incidência de convulsões induzidas pelo ácido quinolínico (AQ) e preveniu a morte celular no hipocampo induzida pelo AQ. Além disso, o tratamento com atorvastatina preveniu a diminuição na recaptção de glutamato, no entanto, sem efeito sobre o aumento na liberação de glutamato ou a diminuição na expressão de GLT-1 induzida pelo AQ. Esse efeito neuroprotetor da atorvastatina foi associado a um aumento nos níveis de fosforilação da Akt e ERK1/2, sem efeito sobre os níveis de fosforilação das proteínas JNK e p38^{MAPK}. A inibição da via MEK/ERK, mas não da via da PI3K/Akt, aboliu o efeito protetor da atorvastatina sobre a diminuição da recaptção de glutamato induzida pelo AQ. Também demonstramos que o tratamento *in vivo* com atorvastatina preveniu a diminuição na viabilidade celular induzida pela privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo através da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento nos níveis de tióis não-protéicos e aumento da captação de glutamato e da atividade da glutamina sintetase (GS). Esse efeito neuroprotetor sobre a viabilidade celular, captação de glutamato e atividade da GS foi abolido quando colesterol (50 μ M) foi adicionado às fatias previamente à indução da PGO. Adicionalmente, demonstramos que o tratamento com atorvastatina 1 e 10 mg/kg/dia aumentou a performance cognitiva dos animais no teste de realocação de objetos, sem alterações locomotoras avaliadas no teste do campo aberto ou alterações de comportamento tipo ansioso avaliadas no teste do labirinto em cruz elevado. Dessa forma, demonstramos que a atorvastatina apresenta efeitos comportamentais *per se*, através da melhora de performance dos camundongos em um modelo de memória espacial. Além disto, estendemos as observações de efeitos neuroprotetores para a atorvastatina, demonstrando proteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica *in vivo* e *in vitro*, através da modulação do transporte e metabolização do glutamato. A modulação da captação de glutamato é

dependente da sinalização de MAPK/ERK1/2 e a modulação da captação e atividade da glutamina sintetase envolvem o papel da atorvastatina de inibir a biossíntese do colesterol e derivados. Portanto, os efeitos terapêuticos da atorvastatina, associados à neuroproteção, envolvem a modulação da transmissão glutamatérgica.

Palavras-chave: atorvastatina, transmissão glutamatérgica, ácido quinolínico, isquemia cerebral, neuroproteção.

ABSTRACT

The inhibitors of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, named statins, are potent reducers of serum cholesterol levels through inhibition of mevalonate synthesis. Beyond the protective effects on cardiovascular diseases, the treatment with statins has been shown to present neuroprotective effects in a wide range of neurological disorders. In this study, we demonstrated that atorvastatin treatment presented protective effects on *in vivo* and *in vitro* models of excitotoxicity. The treatment with atorvastatin 10mg/kg/day during 7 days promoted a reduction of 30% in the incidence of seizures induced by quinolinic acid (QA) infusion. Furthermore, atorvastatin treatment prevented hippocampal cell death induced by QA. Atorvastatin treatment prevented the decrease in glutamate uptake, however, with no effect on the increase in glutamate release or the decrease in GLT-1 expression induced by QA. This protective effect of atorvastatin was associated with increased phosphorylation levels of Akt and ERK1, with no effect on the phosphorylation levels of JNK e p38^{MAPK}. Inhibition of MEK/ERK signaling, but not PI3K/Akt signaling, abolished the protective effect of atorvastatin treatment on the reduction of glutamate uptake induced by QA. We further demonstrated that *in vivo* treatment with atorvastatin prevented the reduction in cell viability induced by oxygen and glucose deprivation (OGD) in hippocampal slices through reduction in oxidative stress damage, increase in glutamate uptake and glutamine synthetase activity (GS). These effects on cell viability, glutamate uptake and GS activity were abolished when slices were pre-incubated with cholesterol (50µM) before OGD induction. Additionally, we demonstrated that atorvastatin treatment (1 or 10mg/kg/day) during 7 days improved the cognitive performance of mice in the object recognition test, with no alterations in the locomotor activity evaluated in the open field test and with no alteration in the anxiety-like behavior evaluated in the elevated plus maze test. In this way, we demonstrated that atorvastatin presents behavioral effects *per se* and neuroprotective effects against glutamatergic excitotoxicity *in vivo* and *in vitro* through modulation of glutamate transport and metabolism. These effects were, at least partially, related to Akt and ERK signaling and inhibition of cholesterol synthesis pathway. The modulation of glutamate uptake is dependent of MAPK/ERK1/2 signaling and the modulation of glutamine synthetase activity and glutamate uptake are related to inhibition of cholesterol and derivatives synthesis by atorvastatin. In this way, the therapeutic effects

of atorvastatin, related to neuroprotection, involve the modulation of glutamatergic transmission.

Keywords: atorvastatin, glutamate transmission, quinolinic acid, cerebral ischemia, neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Figura esquemática da transmissão glutamatérgica.....	23
Figura 2: Representação esquemática do ciclo glutamato-glutamina em uma sinapse glutamatérgica.....	26
Figura 3: Inibição da síntese de colesterol pelas estatinas.....	32

CAPÍTULO 1

Figure 1: Atorvastatin pretreatment reduces the incidence of QA-induced seizures.....	60
Figure 2: Atorvastatin treatment prevents quinolinic acid (QA)-induced decrease in cellular viability.....	62
Figure 3: Atorvastatin treatment prevents quinolinic acid (QA)-induced cellular damage in hippocampal slices from mice.....	63
Figure 4: Atorvastatin pretreatment increases Akt phosphorylation....	64
Figure 5: Atorvastatin pretreatment prevents reduction on glutamate uptake into hippocampal slices induced by QA i.c.v. infusion in mice.....	65

CAPÍTULO 2

Figure 1: Atorvastatin and QA effects on glutamatergic transport and metabolism.....	90
Figure 2: Atorvastatin and QA effects on Akt phosphorylation.....	91
Figure 3. Effects of atorvastatin treatment on ERK1/2 phosphorylation after infusion of QA.....	92
Figure 4. Effects of atorvastatin treatment on p38 phosphorylation after infusion of QA.....	93
Figure 5. Effects of atorvastatin treatment on JNK1/2 phosphorylation after infusion of QA.....	94
Figure 6. Effects of inhibition of PI3K/Akt by wortmanin and MAPK/ERK by PD98059 on the glutamate uptake effect of atorvastatin treatment against QA infusion.....	95

CAPÍTULO 3

Figura 1. Avaliação do efeito da atorvastatina sobre a morte celular induzida pelo AQ em CA1 de camundongos.....	103
Figura 2. Avaliação do efeito da atorvastatina sobre a morte celular induzida pelo AQ em CA1 de camundongos.....	104
Figura 3. Expressão de GLT-1 na região CA1 do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....	105
Figura 4. Expressão de GLT-1 na região CA3 do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....	106

Figura 5. Expressão de GLT-1 na região do giro denteado do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....107

Figura 6. Expressão de iNOS na região do giro denteado do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....108

Figura 7. Expressão de iNOS na região do giro denteado do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....109

Figura 8. Expressão de iNOS na região do giro denteado do hipocampo após o tratamento com atorvastatina e a infusão de AQ.....110

CAPÍTULO 4

Figure 1: Cellular viability of hippocampal slices subjected to OGD and reoxygenation: effects of MK-801 (*in vitro*) and atorvastatin (*in vivo*).....132

Figure 2: NPSH content and ROS production in hippocampal slices subjected to OGD and reoxygenation following atorvastatin *in vivo* treatment.....133

Figure 3: D-[³H]aspartate release, L-[³H]glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to OGD and reoxygenation following atorvastatin *in vivo* treatment.....134

Figure 4: Cellular viability, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to OGD and reoxygenation: effect of cholesterol *in vitro* following atorvastatin *in vivo* treatment.....135

CAPÍTULO 5

Figure 1. Effects of treatment of atorvastatin in the OPR task in mice.....150

Figure 2. Effects of atorvastatin treatment in the Open Field task.....151

Figure 3. Effects of atorvastatin treatment in the Elevated Plus-Maze test.....152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidence, latency and duration of seizures after Atorvastatin treatment and QA infusion.....	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt/PKB: proteína cinase B
AQ: Ácido Quinolínico
AVC: acidente vascular cerebral
AMPA: α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolpropionato
ATP: Adenosina trifosfato
CA: Campo Aberto
EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios
ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular
FJ: Fluoro-Jade B
GABA: Ácido gama-amino-butírico
GLAST: transportador de glutamato e aspartato
GLT-1: transportador de glutamato 1
GPx: Glutaciona Peroxidase
GR: Glutaciona Redutase
GS: Glutamina sintetase
GSH: Glutaciona
HMG-CoA: 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A
i.c.v. : Intra-cerebroventricular
IP: Iodeto de Propídeo
JNK: c-Jun N-terminal cinase
LCE: Labirinto em cruz elevado
MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos
MEK: MAP cinase cinase
MTT: 3-[4,5- Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo
NF- κ B: fator nuclear kappa B
NMDA: N-Metil-D-Aspartato
NMDAR: Receptor NMDA
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PAG: Glutaminase ativada por fosfato
PGO: Privação de glicose e oxigênio
PI3K: proteína cinase de fosfatidilinositol 3
SNC: Sistema Nervoso Central
TCA: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TCE: Traumatismo crânio-encefálico
TNF α : fator de necrose tumoral alfa
v.o.: via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	21
1.2 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA	27
1.3 TOXICIDADE DO ÁCIDO QUINOLÍNICO	29
1.4 ESTATINAS E NEUROPROTEÇÃO	31
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
CAPÍTULO 1	39
CAPÍTULO 2.....	67
CAPÍTULO 3	97
CAPÍTULO 4.....	111
CAPÍTULO 5	137
3 DISCUSSÃO	153
4 CONCLUSÕES	165
5 PERSPECTIVAS	167
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O aminoácido glutamato participa do metabolismo e da constituição de proteínas e seu papel como neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos foi alvo de debate até o final da década de 70 e início dos anos 80 (JOHNSON, 1977; 1978; DAVIES *et al.*, 1982). Ao final dos anos 60, outras substâncias como acetilcolina, dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina já eram aceitas como neurotransmissores no SNC de mamíferos (GRUNDFEST, 1964; EHINGER e FALCK, 1971). Desde essa época, tinha-se conhecimento de que esses neurotransmissores poderiam representar somente uma pequena fração dos neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso sugerindo que aminoácidos, como o glutamato e o aspartato, poderiam exercer essa função (LEONGWAY e SUTHERLAND, 1963). A ideia de que o glutamato poderia desempenhar papel de neurotransmissor excitatório no SNC não era novidade nessa época visto que suas ações excitatórias eram conhecidas desde os anos 50 (HAYASHI, 1952; CURTIS e WATKINS, 1960). Além disso, já se tinha conhecimento de sua presença em grandes quantidades em várias regiões do SNC e o fato de que o glutamato era capaz de excitar praticamente todos os neurônios nos quais era testado, corroborava com o seu papel como neurotransmissor (HEBB, 1970; GHADIMI e KUMAR, 1972; JOHNSON, 1972). Em 1977, Davies e colaboradores demonstraram em gatos que a liberação de um transmissor do “tipo L-glutamato” (L-glutamato ou L-aspartato) era responsável pela excitação de células de Renshaw por meio de impulsos vindo das fibras aferentes da raiz dorsal (BISCOE *et al.*, 1977). Inicialmente apontado como o possível transmissor, o aspartato foi, posteriormente, substituído como o neurotransmissor naquelas sinapses pela sua menor afinidade aos receptores sinápticos em relação ao glutamato (OLVERMAN *et al.*, 1984). Atualmente, o glutamato é amplamente reconhecido como o aminoácido mais abundante do cérebro de mamíferos, onde exerce a função de principal neurotransmissor excitatório (MAVROTHALASSITIS *et al.*, 1988; MELDRUM, 2000; WATKINS e JANE, 2006).

O glutamato participa em diversos processos como um importante mediador na comunicação intercelular, plasticidade, crescimento e diferenciação (NEDERGAARD *et al.*, 2002; AARTS *et al.*, 2003). Da mesma forma, este neurotransmissor está envolvido em

diversas funções cerebrais, como aprendizado e memória, emoção, motivação e atividades motoras. Esses efeitos do glutamato são mediados por receptores ionotrópicos, os quais são canais de cátions, e metabotrópicos que modulam proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G) (DINGLELINE *et al.*, 1999) (Figura 1).

Os receptores ionotrópicos possuem propriedades farmacológicas e fisiológicas que os subdividem em três populações distintas: os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido caínico, e os sensíveis ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) (MICHAELIS, 1998). Aos receptores AMPA e cainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os receptores NMDA (NMDAR) respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio (Ca^{+2}) (MELDRUM, 2000). Devido a essas propriedades, os NMDAR são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória.

Os receptores metabotrópicos agem através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997). Evidências demonstram a existência de oito receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) que são subdivididos em três grupos de acordo com dados farmacológicos, mecanismos de transdução do sinal e similaridade na seqüência de aminoácidos. O grupo I de mGluR (mGlu1 e mGlu5) estimulam a fosfolipase C, enquanto o grupo II (mGlu2 e mGlu3) e o grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) modulam a atividade da adenilato ciclase (GUBELLINI *et al.*, 2004; SWANSON *et al.*, 2005).

Fisiologicamente, os receptores AMPA e cainato estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (POPESCU e AUERBACH, 2004). Os receptores AMPA são formados por quatro subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 e são responsáveis pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico (STONE e ADDAE, 2002). Evidências demonstram que a entrada de íons Ca^{+2} pelos receptores AMPA ativa a cálcio-calmodulina cinase II, a qual, por sua vez, fosforila o próprio receptor, o que potencializa a corrente iônica conduzida pelo mesmo, fenômeno esse que tem sido relacionado à potenciação de longa duração (LTP) (XIA e STORM, 2005).

Os receptores de cainato são tetrâmeros formados a partir da associação de cinco tipos de subunidades denominadas GluR5, GluR6,

GluR7, KA1 e KA2. Encontrados no hipocampo, córtex, estriado, cerebelo, amígdala, hipotálamo, medula espinhal e na retina, os receptores de cainato diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (HUETTNER, 2003). Os receptores de cainato localizados nas células pré-sinápticas estão envolvidos na modulação da liberação de ácido gama-amino-butírico (GABA) e do próprio glutamato em sinaptossomas hipocampais (HUETTNER, 2003). Os receptores de cainato pós-sinápticos são responsáveis por um componente lento e pequeno do potencial excitatório pós-sináptico relacionado a fenômenos de plasticidade de curta e longa duração. Além das funções fisiológicas, a ativação desses receptores através do tratamento com cainato tem sido utilizada como modelo animal da epilepsia do lobo temporal de humanos (MADDEN, 2002; LERMA, 2003).

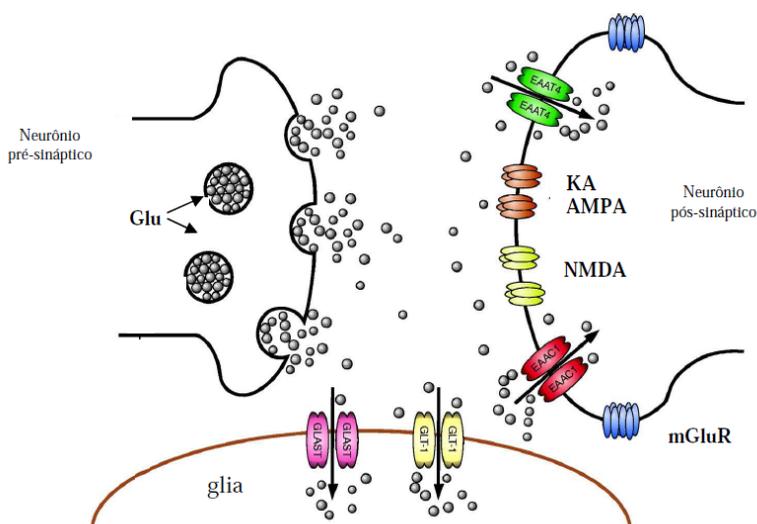


Figura 1. Figura esquemática da transmissão glutamérgica. O glutamato, estocado em vesículas sinápticas localizadas no terminal sináptico, é liberado na fenda sináptica pela chegada de potenciais de ação. Uma vez liberado, o glutamato pode atuar sobre seus receptores localizados nas células pós-sinápticas ou ser captado por neurônios ou células gliais através da ação de transportadores glutamérgicos (GONZALEZ e ROBINSON, 2004).

Dentre os receptores glutamatérgicos, os NMDAR são os que possuem a maior afinidade pelo glutamato (WAXMAN e LYNCH, 2005). Os NMDAR são proteínas heteroméricas compostas da combinação de subunidades NR1 com as subunidades NR2A-D ou NR3A-B (TAKAGI *et al.*, 2003). As subunidades NR1 são constitutivas e promovem a funcionalidade do receptor, enquanto que as subunidades NR2 determinam a especificidade do receptor (SCOTT *et al.*, 2003). Acredita-se que duas subunidades NR1 se associem com duas subunidades NR2, de modo que D-serina um co-agonista, una-se às subunidades NR1 e o glutamato as subunidades NR2 (SCHORGE e COLQUHOUN, 2003).

Durante a transmissão sináptica, a ativação dos NMDAR requer a ligação simultânea D-serina e glutamato em combinação com despolarização do potencial de membrana (OGDEN e TRAYNELIS, 2011). No potencial de repouso, o canal do receptor é bloqueado pelo íon Mg^{+2} , o qual é expulso do canal após uma despolarização inicial. Com a abertura do canal do NMDAR, ocorre um influxo de íons Na^+ , K^+ e principalmente de íons Ca^{+2} (PAOLETTI e NEYTON, 2007; HANSEN *et al.*, 2010). A ativação dos NMDAR produz correntes de ascensão e decaimento lentas que superam em duração aquelas geradas por ativação dos receptores AMPA e cainato e deste modo acarreta em um potencial excitatório pós-sináptico mais prolongado (GIBB, 2004). A ativação dos NMDAR, deste modo, está associada a processos fisiológicos como o desenvolvimento, formação e plasticidade das sinapses, vinculados a fenômenos como a aprendizagem e a memória.

A ação sináptica do glutamato é finalizada por sua recaptação a partir da fenda sináptica por proteínas de membrana conhecidas como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATS) (TAKAHASHI *et al.*, 1997). Astrócitos e neurônios expressam um total de cinco isoformas de transportadores de aminoácidos excitatórios dependentes de Na^+ . Dois transportadores astrocitários foram clonados e denominados de GLAST (transportador de aspartato-glutamato) e GLT-1 (transportador de glutamato 1). Em humanos eles são designados como EAAT1 e EAAT2 (transportador de aminoácidos excitatórios 1 e 2, respectivamente) (GRAS *et al.*, 2003). GLT-1 e GLAST são amplamente distribuídos no cérebro. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3). Ele é encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos clonados incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e EAAT5, localizado em neurônios da retina (ANDERSON *et al.*, 2001). A captação celular de glutamato é acoplada

ao transporte de Na^+ e K^+ , sendo que o transporte de uma molécula de glutamato para dentro da célula é vinculado à entrada de três íons Na^+ e um próton e à saída de um íon K^+ (DANBOLT, 2001). No entanto, outro mecanismo envolvido no transporte de glutamato no SNC é o trocador de cistina/glutamato, conhecido como sistema Xc^- , o qual é independente de Na^+ . Este sistema promove o influxo de cistina em troca do efluxo de glutamato, sendo super-regulado em situações de estresse oxidativo, já que a cistina, dentro das células, é convertida à cisteína, um dos precursores da glutatona, um tripeptídeo com importantes funções antioxidantes no SNC (DANBOLT, 2001).

A expressão, o tráfego e a atividade dos transportadores de glutamato são regulados por várias vias de sinalização intracelular. Foi demonstrado que a expressão na membrana e o aumento na atividade de GLAST, GLT-1 e de EAAC1 estão relacionadas à ativação da via da proteína cinase de fosfatidilinositol 3 (PI3K) (SIMS *et al.*, 2000; BOEHMER *et al.*, 2003; GUILLET *et al.*, 2005). Foi também demonstrado que a ativação da proteína cinase C promove o aumento da atividade e da expressão na membrana plasmática de EAAC1. Adicionalmente, a via da proteína cinase dependente de AMPc está envolvida no aumento da expressão de GLT-1, mas não tem efeitos sobre a expressão ou atividade do EAAC1 em astrócitos (GUILLET *et al.*, 2005). Da mesma forma, a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) está envolvida na expressão de GLT-1 em astrócitos (GEGELASHVILI *et al.*, 2000). Assim, pode-se observar que existe uma regulação diferencial da atividade e expressão dos transportadores de glutamato pelas proteínas cinases.

Em condições normais, o glutamato liberado pelos neurônios é rapidamente captado pelos transportadores glutamatérgicos astrocitários. Nos astrócitos, glutamina é formada a partir de glutamato e amônia em uma reação catalisada pela enzima específica de células gliais a glutamina sintetase (GS) (KOSENKO *et al.*, 2003). A glutamina sintetizada é então liberada pelos astrócitos e é captada pelos neurônios onde é hidrolisada pela glutaminase ativada por fosfato, uma enzima encontrada abundantemente em neurônios, para formar glutamato, recompondo assim a quantidade do neurotransmissor e constituindo o chamado ciclo glutamato-glutamina (Figura 2) (RODRIGO e FELIPO, 2007). Tanto em neurônios quanto em astrócitos, uma parte da quantidade de glutamato é utilizada na síntese de α -cetoglutarato, um substrato do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, por desaminação mediada pela glutamato desidrogenase. De forma interessante, em neurônios gabaérgicos o glutamato proveniente do ciclo glutamato-glutamina pode

ser utilizado na síntese de GABA por descarboxilação catalisada pela enzima glutamato descarboxilase. Como neurônios não apresentam as enzimas necessárias para a síntese *de novo* dos neurotransmissores glutamato e GABA, a partir da glicose, o ciclo glutamato-glutamina tem uma importância fundamental no funcionamento das sinapses glutamatérgicas e também gabaérgicas. Além dessa função nesse ciclo, a glutamina serve como um precursor essencial no metabolismo de nucleotídeos, no transporte de amônia, na biossíntese de glicose e amino açúcares, na homeostase da glutatona e na síntese proteica (ALBRECHT *et al.*, 2010).

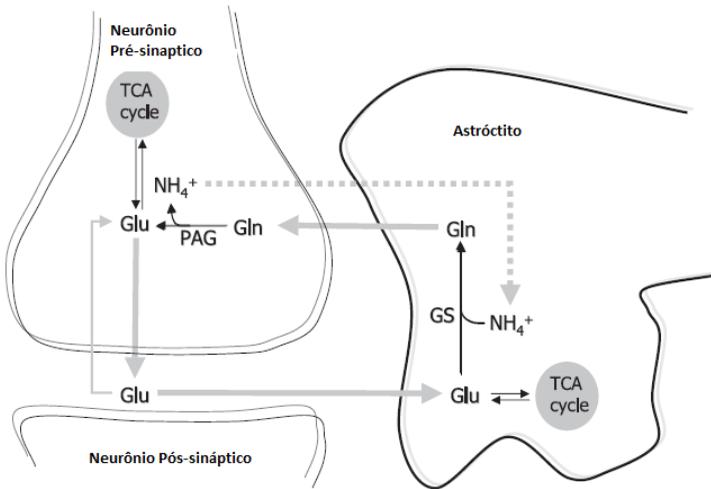


Figura 2. Representação esquemática do ciclo glutamato-glutamina em uma sinapse glutamatérgica. O glutamato (Glu) neurotransmissor liberado é recaptado, predominantemente, pelos astrócitos, onde é amidado a glutamina (Gln) pela ação da glutamina sintase (GS) utilizando amônia livre e depois retorna aos neurônios. Nos neurônios, a reação da glutaminase ativada por fosfato (PAG) regenera o glutamato e produz íon amônio. O glutamato pode também ser metabolizado em neurônios e astrócitos através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (BAK *et al.*, 2006).

A função dos transportadores de glutamato e da GS é inibida pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (HERTZ e ZIELKE, 2004; RODRIGO e FELIPO, 2007).

Ambos, os transportadores e a GS, possuem sítios que são susceptíveis a oxidação por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos resíduos de cisteína. Foi demonstrado que a atividade tônica da óxido nítrico sintase (NOS) devida à ativação exagerada dos NMDAR leva à inibição da atividade da GS devido à sua modificação covalente nesses sítios sensíveis ao estresse oxidativo (RODRIGO e FELIPO, 2007). Assim, a regulação do estado redox da célula é uma variável importante na manutenção dos níveis de glutamato na fenda sináptica tanto pela sua influência na remoção do glutamato extracelular através dos transportadores quanto na sua posterior metabolização em glutamina pela GS (ENDOU *et al.*, 1997).

1.2. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

A acidose foi primeiramente implicada na inibição de convulsões em 1929, quando se observou que a acidose hipercárbica diminuía as descargas convulsivas em pacientes com epilepsia (LENNOX, 1929). A azosulfamida, um anticonvulsivante utilizado nessa época, também apresentava o efeito de diminuir o pH sanguíneo (PRICE *et al.*, 1943). Assim, por alguns anos a terapia da epilepsia voltou-se para a procura de tratamentos ou drogas indutoras de acidose. Dessa forma, alguns médicos dessa época chegaram a utilizar o glutamato no tratamento da epilepsia (PRICE *et al.*, 1943). Durante a década de 40, altas doses de glutamato também foram utilizadas como uma tentativa de se tratar o retardo mental (GHADIMI e KUMAR, 1972). Em 1954, Hayashi foi o primeiro a sugerir efeitos negativos do glutamato ao demonstrar que quando injetado no cérebro ou nas artérias carótidas induzia convulsões (HAYASHI, 1954). Posteriormente, Newhouse e Lucas (1957) também sugeriram um papel neurotóxico para o glutamato ao demonstrarem que injeções de glutamato eram capazes de destruir as camadas internas da retina de camundongos (LUCAS e NEWHOUSE, 1957). Esses resultados foram replicados por John W. Olney, em 1969, que estendeu os resultados de retinotoxicidade a compostos relacionados ao glutamato como o cainato e sugeriu o termo excitotoxicidade para indicar toxicidade por aminoácidos excitatórios (OLNEY, 1969). Assim, a excitotoxicidade se refere ao processo no qual as células nervosas respondem inapropriadamente a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica e que culmina com a morte celular (LYNCH e GUTTMANN, 2002). Atualmente, a excitotoxicidade é considerada um fator comum a vários distúrbios neurológicos, incluindo acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia,

traumatismo crânio-encefálico (TCE) e doenças neurodegenerativas (HYND *et al.*, 2004).

O excesso de glutamato na fenda sináptica pode ser neurotóxico devido a sua ação em receptores NMDA, AMPA, cainato e também em seus receptores metabotrópicos (ESTRADA SANCHEZ *et al.*, 2008). A lesão excitotóxica pode resultar do excesso de entrada de Ca^{+2} e Na^{+} na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de Ca^{+2} dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} (GREENE e GREENAMYRE, 1996). Este aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} pode ativar enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintase ou endonucleases que contribuem para a morte celular (MELDRUM, 2000).

Devido à grande importância do fenômeno excitotóxico no dano neuronal causado pelo excesso de liberação de glutamato após lesões traumáticas e isquêmicas, vários trabalhos foram desenvolvidos no sentido de tentar minimizar esses danos. Estudos usando antagonistas dos NMDAR em modelos animais de TCE e AVC mostraram redução da morte neuronal e de alterações neurológicas, encorajando os pesquisadores a iniciar estudos clínicos com essas drogas (WAXMAN e LYNCH, 2005). No entanto, os estudos clínicos realizados demonstraram diversos efeitos colaterais (BIEGON *et al.*, 2004). Uma causa possível para o insucesso destes estudos é que o bloqueio total das ações do glutamato também impede que este exerça seus efeitos tróficos, e inclusive neuroprotetores quando em concentrações fisiológicas (BAHR *et al.*, 2002).

A lesão por estresse oxidativo também parece ser um fator patogênico fundamental em doenças neurológicas, incluindo as cerebrovasculares. Durante um evento isquêmico as células sofrem uma redução acentuada no suprimento sanguíneo, levando à privação de glicose e oxigênio, o que pode causar morte neuronal (CUCCHIARA e KASNER, 2001). Quando há a reperfusão, a reoxigenação do tecido pode levar à formação de radicais livres, inativação dos sistemas de detoxificação e consumo dos antioxidantes endógenos (VAUGHAN e DELANTY, 1999). Uma enzima importante nesse processo é a NOS. As diferentes isoformas da NOS exercem papéis importantes e opostos na isquemia cerebral. A forma induzida (iNOS) é implicada como importante mediador inflamatório nos eventos de isquemia e reperfusão (DOYLE *et al.*, 2008). O óxido nítrico (NO), e seu co-produto peroxinitrito, contribuem para morte neuronal através da oxidação de proteínas estruturais durante a isquemia (DOYLE *et al.*, 2008; HERTZ, 2008). O influxo de Ca^{+2} mediado por NMDAR ativa a NOS neuronal, e

a produção de NO e subsequente formação de espécies reativas de oxigênio pode ser responsável pela morte neuronal excitotóxica (HERTZ, 2008). Em contraste, a isoforma endotelial (eNOS) apresenta um papel protetor em eventos de redução do fluxo sanguíneo cerebral, pois o NO produzido nas células endoteliais atua como potente vasodilatador (DE PALMA *et al.*, 2008).

Uma defesa antioxidante no SNC é o tripeptídeo glutathiona (GSH) (L- γ -glutamil-L-cistetilglicina). A GSH participa de diversos processos celulares como síntese de ácido desoxiribonucléico, proteínas, leucotrienos e na modulação da função proteica. A GSH, como antioxidante, tem um papel importante, pois é o tiol não proteico mais abundante em células de mamíferos (SIMS *et al.*, 2004). A GSH pode reagir não enzimaticamente com compostos oxidantes ou servir de substrato para a enzima glutathiona peroxidase (GPx) na detoxificação de peróxidos de hidrogênio e orgânicos (NJALSSON, 2005). A detoxificação mediada pela GPx leva a formação da glutathiona dissulfeto (GSSG), a qual após redução pode ser novamente convertida a GSH pela atividade da glutathiona redutase (GR) em uma reação dependente de NADPH (WANG e BALLATORI, 1998). Previamente, foi demonstrado que fatias de hipocampo submetidas a um modelo de privação de glicose e oxigênio (PGO) e posterior reperusão apresentam uma redução nos níveis de GSH e também uma redução na captação de glutamato do meio extracelular (BRONGHOLI *et al.*, 2006).

1.3. TOXICIDADE DO ÁCIDO QUINOLÍNICO

O ácido quinolínico (AQ), um metabólito do triptofano proveniente da via das quinureninas, foi inicialmente estabelecido como um intermediário na síntese do ácido nicotínico e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (STONE, 2001). A sua importância no SNC só foi reconhecida quando o bioquímico russo Izyaslav Lapin (1978) realizou um experimento no qual seis quinureninas: DL-quinurenina, AQ, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido xanturênico, ácido picolínico e ácido nicotínico foram injetadas individualmente no ventrículo lateral de camundongos (LAPIN, 1978). Lapin observou que todas essas substâncias produziram excitação motora e/ou convulsões clônicas, e que dentre estas, o metabólito com ação mais potente era o AQ (LAPIN, 1978). Logo depois, Trevor Stone e Martin Perkins analisaram a ação excitatória do AQ e de seus análogos injetados em diferentes regiões do SNC e foram os primeiros a suspeitar sobre a existência de subtipos de NMDAR (PERKINS e STONE, 1983). Atualmente, sabe-se que o AQ

causa convulsões através da ação sobre os NMDAR, particularmente, aqueles que contêm subunidades NR2B (MORONI, 1999; SCHWARCZ e PELLICCIARI, 2002).

A toxicidade do AQ tem sido implicada em diversas condições patológicas do SNC, como as doenças de Huntington e Parkinson, na demência associada à infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV), na depressão maior e transtorno bipolar e na etiologia da epilepsia em humanos (HEYES *et al.*, 1989; HEYES *et al.*, 1990; STONE, 2001). Assim, a administração cérebro-ventricular de AQ tem sido utilizada em modelos animais de convulsões, modelos nos quais se observa convulsões tônico-clônicas (Schmidt *et al.*, 2000). Do ponto de vista metodológico, o AQ é uma excelente ferramenta no estudo da toxicidade glutamatérgica *in vivo*. Isso se deve ao fato de que seus efeitos de excitação motora e convulsões tônico-clônicas iniciam-se em questão de segundos e apresenta uma baixa taxa de mortalidade quando comparada a outras drogas indutoras de convulsão (DE ARAUJO HERCULANO *et al.*, 2011).

A toxicidade promovida pelo AQ envolve a ativação dos NMDAR, com desequilíbrio da homeostase do íon Ca^{+2} intracelular e disfunção mitocondrial com exaustão da adenosina trifosfato (ATP) intracelular e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e consequente peroxidação lipídica e carbonilação proteica (STONE e DARLINGTON, 2002; VEGA-NAREDO *et al.*, 2005; GUILLEMIN, 2012). Além da atuação direta sobre os NMDAR, estudos mostraram que o AQ pode sobrecarregar o sistema glutamatérgico pela modulação do transporte de glutamato (GUILLEMIN, 2012; PEREZ-DE LA CRUZ *et al.*, 2012). Demonstrou-se que o AQ é um inibidor da captação de glutamato tanto em preparações de vesículas sinápticas (TAVARES *et al.*, 2000) quanto em astrócitos em cultura (TAVARES *et al.*, 2002). Dessa forma, os dados sugerem que o AQ pode promover excitotoxicidade por ação direta em NMDAR bem como por aumentar a concentração de glutamato na fenda sináptica por inibição do transporte de glutamato.

Concentrações elevadas de AQ foram encontradas em pacientes com diversos tipos de doenças infecciosas, como meningite, septicemia e doenças autoimunes sugerindo que a toxicidade do AQ envolva também a neuroinflamação (MYINT, 2012; PEREZ-DE LA CRUZ *et al.*, 2012). No sistema nervoso, a micróglia ativada é a maior fonte de AQ durante a inflamação. Durante a cascata excitotóxica, o influxo massivo de Ca^{+2} pelo NMDAR induzido pelo AQ pode levar a ativação de vários processos intracelulares como, por exemplo, a ativação da

fosfolipase 2 dependente de Ca^{+2} (KALONIA e KUMAR, 2011). Essas fosfolipases clivam os fosfolipídios de membrana dando origem ao ácido araquidônico, o qual pode ser convertido em prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos pela ação das ciclooxigenases (SHUKURI *et al.*, 2011). Outro mecanismo envolvido na inflamação mediada pelo AQ está relacionado ao aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF $-\alpha$), interleucina 1β e interleucina-6 (KALONIA *et al.*, 2010; KALONIA *et al.*, 2011). Assim, acredita-se que o AQ pode mediar a inflamação neuronal e astrocitária através de mecanismos envolvendo a excitotoxicidade, indução da NOS e posterior estresse oxidativo estimulado pelo NO.

1.4. ESTATINAS E NEUROPROTEÇÃO

Na segunda metade do século passado, descobriu-se que uma ampla gama de substâncias provenientes de fungos possuía a capacidade de inibir enzimas de outros microrganismos e também de células de mamíferos. Na década de 70, interessado em como alguns fungos se protegiam um dos outros, o cientista japonês Akira Endo pesquisou o envolvimento do metabolismo do colesterol, visto que o ergosterol, um derivado do colesterol, é um componente essencial das membranas dos fungos (ENDO, 2010; ROY e PAHAN, 2011). Assim, trabalhando com uma grande diversidade de fungos na busca por substâncias que diminuíssem a síntese de colesterol, uma substância já conhecida na época foi isolada, a citrinina (ENDO, 2010). Apesar de exercer uma forte inibição sobre a síntese de colesterol e reduzir os níveis séricos de colesterol em ratos, a citrinina causava uma série de efeitos adversos como catarata (ENDO, 2010; ROY e PAHAN, 2011). Posteriormente, uma segunda substância isolada e caracterizada a partir do *Penicillium citrium*, apresentou uma potente atividade inibidora sobre a síntese de colesterol e foi então descoberta a compactina (mevastatina), a primeira estatina (ENDO, 2010). Como a mevastatina em altas doses promovia o aparecimento de tumores em cachorros, no final de 1979, o mesmo grupo isolou uma segunda estatina: a monacolina K ou mevinolina, posteriormente chamada de lovastatina (ENDO, 1979). Desde a comercialização da lovastatina, outras seis estatinas, incluindo duas semissintéticas (simvastatina e pravastatina) e quatro sintéticas (atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina e pitavastatina) foram introduzidas no mercado. Dentre essas estatinas, a atorvastatina é relativamente mais lipofílica e possui uma atividade mais prolongada na inibição da 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase quando comparado às outras (SCHACHTER, 2005). Além

disso, a segurança de seu uso, mesmo em altas dosagens, já foi demonstrada em pessoas adultas (WATERS, 2005).

Assim, as estatinas inibem a síntese de colesterol por inibir de modo competitivo a enzima HMG-CoA redutase, a enzima marca-passo da síntese do colesterol (Figura 3) (ZHANG e CASEY, 1996; NESS e CHAMBERS, 2000). O papel das estatinas na prevenção de eventos coronarianos relacionados à aterosclerose é bastante conhecido, e por isso tornaram-se os medicamentos de escolha para pacientes com doenças ateroscleróticas (DAIMON *et al.*, 2004). Atualmente, estima-se que 30 milhões de pessoas no mundo fazem uso terapêutico de estatinas (ENDO, 2010).

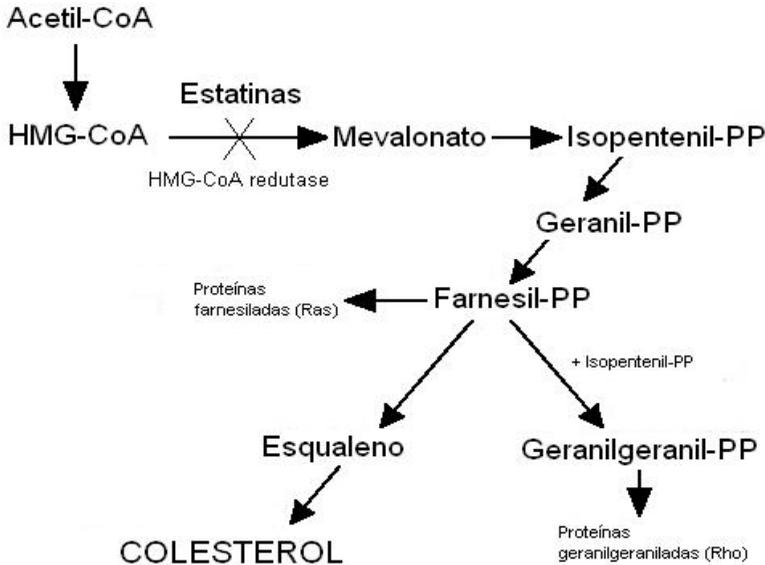


Figura 3. Inibição da síntese de colesterol pelas estatinas. As estatinas inibem a conversão de 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, a etapa limitante na biossíntese de colesterol. Inibindo a síntese de mevalonato, as estatinas previnem a síntese de derivados isoprenóides, os quais estão envolvidos na modificação pós-traducional de proteínas (modificado de CIMINO *et al.*, 2006).

A hipercolesterolemia é classicamente reconhecida como fator de risco para doença coronariana, mas poucas evidências apontam para uma

relação com risco de AVC. Apesar disso, estudos clínicos recentes claramente indicam que o tratamento com estatinas reduz significativamente o risco de AVC entre pacientes com doença vascular já estabelecida (VAUGHAN, 2003). Estudos sugerem que a prevalência da doença de Alzheimer e demência vascular é menor entre pacientes em uso de estatinas (JICK *et al.*, 2000; WOLOZIN *et al.*, 2000). Dados recentes demonstraram efeitos anti-inflamatórios com o tratamento com estatinas em pacientes com esclerose múltipla e X-adrenoleucodistrofia e modelos de encefalomielite auto-imune e de lesão da medula espinhal em ratos (STANISLAUS *et al.*, 1999; NATH *et al.*, 2004; PAINTLIA *et al.*, 2005; PANNU *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que as estatinas podem exercer um amplo efeito neuroprotetor diante de diversas condições patológicas.

A terapia com estatinas pode ser benéfica nos eventos isquêmicos através da modulação da eNOS (AMIN-HANJANI *et al.*, 2001). Um estudo demonstrou que, em modelo murino de isquemia cerebral, o tratamento profilático com estatinas reduziu a área infartada e melhorou o quadro neurológico dos animais. Neste estudo foi observado que houve um aumento na atividade da eNOS, sem alterar a expressão da nNOS (ENDRES *et al.*, 1998). Outras observações sugerem que as estatinas também modulam a atividade da iNOS. Foi demonstrado que a lovastatina reduz o aumento da expressão de iNOS mediada por citocinas e a produção de NO em astrócitos e macrófagos de ratos (PAHAN *et al.*, 1997; STANISLAUS *et al.*, 1999). Como a atividade em excesso desta isoforma da NOS é considerada deletéria ao SNC, sua inibição pelas estatinas pode reduzir processos inflamatórios que acompanham a isquemia aguda (PAHAN *et al.*, 1997). Em conjunto, essas observações apontam para um duplo papel das estatinas na isquemia, estimulando a eNOS e inibindo a iNOS, atuando de modo sinérgico no sentido da neuroproteção.

Os isoprenóides são derivados de metabólitos intermediários da síntese de colesterol. Esses derivados servem como importantes moléculas lipídicas de adesão para a modificação pós-traducional de muitas proteínas, incluindo as proteínas G heterotriméricas e as monoméricas, como Ras e Rho (ZHANG e CASEY, 1996). A isoprenilação é um passo crítico para a atividade de diversas proteínas, permitindo ligações covalentes, localização subcelular e tráfego de proteínas para a membrana celular (SAMUEL e HYND, 2010). Os isoprenóides geranylgeranyl pirofosfato e o farnesil pirofosfato são adicionados na região C terminal de proteínas G monoméricas facilitando, assim, suas interações com reguladores citoplasmáticos, membranas celulares e efetores (ZHANG e

CASEY, 1996). Por exemplo, a translocação de Rho para a membrana celular é criticamente dependente da geranylgeranilação (SAMUEL e HYND, 2010). Além de reduzir os níveis intracelulares de esteróides, as estatinas também reduzem a formação desses compostos intermediários da via de biossíntese do colesterol (TAKEMOTO e LIAO, 2001; VAUGHAN, 2003). Acredita-se que muitos dos efeitos anti-inflamatórios das estatinas provém da redução desses intermediários isoprenóides na via de biossíntese do colesterol envolvidas na inflamação e sinalização intracelular (LAUFS e LIAO, 2003).

Assim, os efeitos pleiotrópicos das estatinas têm sido atribuídos a diminuição na produção dos derivados isoprenóides associados com a inibição da biossíntese do mevalonato e subsequente modulação das vias de sinalização intracelular (VAUGHAN, 2003). A família Ras de GTPases de baixo peso molecular estão envolvidas em vias de sinalização intracelular associada com proliferação, inflamação, morte e sobrevivência neuronal (AKSAMITIENE *et al.*, 2012). O acoplamento de GTP e a isoprenilação dessas GTPases são necessárias para ativar essas proteínas. A isoprenilação da Ras ancora essas proteínas na membrana plasmática onde elas exercem suas ações sinalizadoras de forma apropriada (AMAYA *et al.*, 2011). A ativação da Ras leva a ativação das MAPKs que são proteínas de sinalização celular envolvidas em eventos celulares relacionados tanto a morte celular quanto a sobrevivência celular (WHELAN *et al.*, 2012). Das três principais MAPKs de mamíferos, a via da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) é comumente associada à sobrevivência celular, enquanto que as vias da p38-MAPK e da proteína cinase ativada por estresse/proteínas c-Jun N-terminal cinase (SAPK/JNK) são geralmente implicadas na morte celular (HARPER e LOGRASSO, 2001).

Outra via de sinalização envolvida na proteção celular induzida pelas estatinas e no dano excitotóxico do glutamato é a via da PI3K/proteína cinase B (PI3K/Akt). Foi demonstrado que as estatinas ativam a Akt por aumento da sua e este efeito pode estar relacionado à neuroproteção, regulação do crescimento e proliferação celular promovidas pelas estatinas (WU *et al.*, 2008). A ativação da via de sinalização intracelular PI3K leva à formação de segundos mensageiros como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato e fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (AMANTEA *et al.*, 2009). Esses segundo-mensageiros se ligam a um domínio amino-terminal presente na proteína Akt, permitindo que esta seja ativada através da fosforilação de seus sítios Treonina-308 e Serina-473 (BRUNET *et al.*, 2001). A via da PI3K/Akt pode inibir a morte celular apoptótica através da ativação de fatores anti-

apoptóticos bem como a inibição de fatores pró-apoptóticos, bloqueio da liberação do citocromo c inibindo assim a ativação da caspase-3 (NAKAE *et al.*, 2000; AMANTEA *et al.*, 2009). Além disso, também foi demonstrado que a morte celular induzida pela PGO envolve a inibição da via da PI3K/Akt e esse efeito está relacionado ao papel desta via na modulação da captação de glutamato (DAL-CIM *et al.*, 2011).

Sugere-se que as estatinas podem ter efeito direto na redução dos danos causados por radicais livres e oxidação de lipoproteínas (CIMINO *et al.*, 2007). As estatinas reduzem a oxidação da lipoproteína de baixa densidade induzida por leucócitos e podem ter efeitos mais amplos, como a manutenção da atividade da enzima superóxido dismutase, responsável pela degradação de peróxido de hidrogênio (CHEN *et al.*, 1997). Em animais tratados por sete dias com atorvastatina após a indução do modelo animal de TCE observou-se um efeito neuroprotetor pela redução do déficit neurológico e aumento da sinaptogênese, da angiogênese e da sobrevivência neuronal (LU *et al.*, 2004).

Além dos efeitos em modelos de isquemia e de TCE, as ações neuroprotetoras das estatinas também foram observadas em modelo de toxicidade glutamatérgica, protegendo neurônios em cultura da excitotoxicidade induzida por NMDA. Zacco e colaboradores (2003) demonstraram que o efeito protetor das estatinas foi revertido quando as culturas foram tratadas simultaneamente com NMDA e mevalonato ou colesterol, sugerindo que a ação neuroprotetora está diretamente relacionada à redução dos níveis de colesterol na célula. Em um modelo de epilepsia com cainato, o pré-tratamento com atorvastatina reduziu a atividade epiléptica e a morte neuronal no hipocampo de ratos (LEE *et al.*, 2008a).

Dados experimentais e evidências clínicas indicam que alguns dos efeitos das estatinas, independentes da redução dos níveis de colesterol, ou efeitos pleiotrópicos, envolvem a melhora ou restauração da função endotelial e redução do estresse oxidativo e inflamação vascular (TAKEMOTO e LIAO, 2001). Desta forma, não está claro se o possível efeito neuroprotetor das estatinas, contra a superestimulação da transmissão glutamatérgica, é dependente ou independente da redução dos níveis de colesterol, como possíveis alterações em microdomínios de membrana, onde há grande inserção de receptores glutamatérgicos, ou se está relacionado à alteração em cascatas de sinalização mediadas por lipídios de membrana. Sabe-se que o tratamento de ratos com simvastatina aumentou a união de MK-801 ao NMDAR no córtex cerebral, amígdala, hipocampo, gânglios da base e núcleo accumbens (WANG *et al.*, 2009a). Além disso, foi demonstrado que a associação de

EAAT2 com microdomínios lipídicos altera a localização e a função desse transportador (TIAN *et al.*, 2010). Desse modo, alterações na organização dos lipídeos na membrana plasmática podem exercer efeitos na transmissão glutamatérgica por modulação tanto dos receptores quanto dos transportadores de glutamato.

Apesar das crescentes evidências do papel neuroprotetor das estatinas em doenças do SNC, existe relativamente pouco conhecimento dos efeitos comportamentais relacionados ao tratamento com estatinas. Além dos efeitos neuroprotetores, Lu e colaboradores demonstraram que o tratamento com atorvastatina reduz o déficit de memória espacial induzido por TCE em um modelo animal (LU *et al.*, 2004). Da mesma forma, o tratamento de ratos com simvastatina diminuiu o comportamento tipo ansioso e aumentou a atividade locomotora (WANG *et al.*, 2009a). Além disso, dados clínicos indicam uma redução na incidência de ansiedade e depressão associada ao uso de estatinas. Assim, o uso de estatinas parece exercer efeitos comportamentais, no entanto, os efeitos podem variar de acordo com a estatina utilizada e seu mecanismo de ação sobre os efeitos comportamentais ainda não está elucidado.

Concluindo, a excitotoxicidade glutamatérgica é um fator fisiopatológico comum a diversas doenças neurodegenerativas, epilepsia e eventos agudos, como isquemia cerebral e traumatismo crânio-encefálico. Assim, os inibidores da enzima HMG-CoA redutase têm se mostrado como drogas potencialmente neuroprotetoras, inclusive na toxicidade mediada pela ativação de NMDAR. Dessa forma, tendo em vista a importância do dano excitotóxico causado pelo excesso de glutamato na fenda sináptica em lesões traumáticas, isquêmicas e na epilepsia, e a falta de agentes neuroprotetores eficazes contra a toxicidade induzida por glutamato, consideramos fundamental a busca por novas drogas que possam reduzir esse processo através da modulação da transmissão glutamatérgica.

3. DISCUSSÃO

A excitotoxicidade é um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na morte celular necrótica e apoptótica induzidas pela isquemia, TCE, lesão da medula espinhal, doenças neurodegenerativas assim como pela epilepsia (HYND *et al.*, 2004). Dessa forma, estudos têm se focado na busca da redução do acúmulo de glutamato na fenda sináptica e/ou na inibição da excitação neuronal induzida pelo glutamato para a prevenção da morte neuronal em várias doenças neurológicas. Entretanto, os antagonistas de NMDAR possuem uma ampla gama de efeitos colaterais, desta forma fomentando a busca por estratégias de neuroproteção clinicamente mais aplicáveis (LYNCH e GUTTMANN, 2002). Nesse sentido, as estatinas são inibidores da HMG-CoA redutase que têm sido demonstrados como agentes com propriedades antiexcitotóxicas (YRJANHEIKKI *et al.*, 2005; CLARKE *et al.*, 2007; PIERMARTIRI *et al.*, 2009). Como a excitotoxicidade está envolvida na patofisiologia da isquemia cerebral e no dano causado pelo AQ, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com atorvastatina sobre a morte celular, parâmetros da transmissão glutamatérgica e sobre o estresse oxidativo em camundongos após a infusão de AQ i.c.v ou em fatias hipocâmpais submetidas a PGO.

Primeiramente, foi avaliado o efeito do tratamento durante uma semana com duas doses de atorvastatina (1mg/kg/dia ou 10mg/kg/dia) sobre a incidência de convulsões induzidas pela infusão i.c.v. de AQ. A dose de 1mg/kg/dia não promoveu alterações na incidência das convulsões, no entanto, a dose de 10mg/kg/dia reduziu a incidência das convulsões induzidas pelo AQ em torno de 30%. Esse resultado está de acordo com a literatura, visto que artigos previamente publicados demonstraram efeitos neuroprotetores da atorvastatina ou lovastatina sobre a incidência de convulsões induzidas pelo ácido cálcico ou pela pilocarpina, respectivamente (RANGEL *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008a). A dose de atorvastatina de 10mg/kg não promoveu efeito na incidência de convulsões quando administrada em dose única 1h antes da infusão de AQ (dados não mostrados). Os efeitos neuroprotetores das estatinas apresentam dependência do tempo de tratamento e os efeitos neuroprotetores parecem se estabelecer após o tratamento crônico com estatinas e não com doses únicas ou curtos períodos de tratamento (ZACCO *et al.*, 2003; BOSEL *et al.*, 2005; DOMOKI *et al.*, 2010). Dessa forma, o tratamento com atorvastatina na dose de 10mg/kg/dia por 7 dias foi utilizada nos experimentos seguintes de prevenção de

excitotoxicidade *in vivo* bem como nos experimentos *ex vivo* avaliados nessa tese.

A toxicidade celular induzida pelo AQ foi demonstrada pela redução do MTT, pela incorporação de iodeto de propídeo e pela marcação com Fluoro Jade-B. A avaliação do dano celular em fatias hipocâmpais através da captação de IP revelou que o AQ promoveu uma forte incorporação de IP no hipocampo, o que está de acordo com outras publicações prévias utilizando-se o mesmo método (BOECK *et al.*, 2004; GANZELLA *et al.*, 2006). A avaliação de morte celular com Fluoro Jade-B, revelou que o AQ promove um aumento de células marcadas nas regiões do cornu ammonis 1 (CA1) e no giro denteado do hipocampo, sem marcação na região cornu ammonis 3 (CA3). Estudos anteriores demonstraram que as subregiões hipocâmpais apresentam vulnerabilidade seletiva frente a insultos, sendo que a região CA1 apresenta-se mais vulnerável do que a região CA3 ou o giro denteado (NEWRZELLA *et al.*, 2007; OUYANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009b; BURGER, 2010).

Consistente com o resultado obtido aqui, tem sido demonstrado que a atorvastatina promove neuroproteção contra a despolarização induzida em neurônios piramidais de CA1 (WALLIS e PANIZZON, 2005) e reduz a morte celular no hipocampo (LU *et al.*, 2007; PIERMARTIRI *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com simvastatina reduziu o dano estriatal induzido pelo AQ (PATASSINI *et al.*, 2008). Do mesmo modo, também foi observado que as estatinas reduzem a morte neuronal no hipocampo induzida pela pilocarpina, isquemia e cainato (RANGEL *et al.*, 2005; KAWAI *et al.*, 2011; RAMIREZ *et al.*, 2011). Dessa forma, os resultados obtidos aqui corroboram o efeito neuroprotetor das estatinas frente a estímulos excitotóxicos.

Visto que a atorvastatina promoveu proteção contra as convulsões e morte celular induzidas pelo AQ, posteriormente foi avaliado aqui os possíveis mecanismos envolvidos em tal proteção. A excitotoxicidade induzida pelo AQ envolve a estimulação demasiada dos NMDAR associada com aumento da concentração intracelular de cálcio, disfunção mitocondrial, depleção de ATP e estresse oxidativo (GUILLEMIN, 2012; PEREZ-DE LA CRUZ *et al.*, 2012). No entanto, dados experimentais têm apontado que a toxicidade induzida pelo AQ envolve também uma disfunção da transmissão glutamatérgica e não somente sua ação como agonista NMDAR. O AQ pode promover a diminuição da captação de glutamato em vesículas sinápticas, o aumento da liberação de glutamato em sinaptossomas e a diminuição da captação

de glutamato em cultura de astrócitos e no hipocampo de animais infundidos com AQ (TAVARES *et al.*, 2000; TAVARES *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que o AQ pode inibir a atividade da GS em cultura de astrócitos (TING *et al.*, 2009). Acredita-se que o aumento da liberação de glutamato, e inibição da captação e da atividade da GS possam contribuir para o aumento da concentração sináptica de glutamato, o que pode causar excitotoxicidade (ZHENG *et al.*, 2010; KARMARKAR *et al.*, 2011).

De fato, tem sido demonstrado um aumento nos níveis de glutamato em modelos experimentais de isquemia, TCE e de epilepsia (LEITE *et al.*, 2002; ROTHSTEIN *et al.*, 2005; HARVEY *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2012). Nestes modelos, uma redução da liberação de glutamato foi associada com efeitos benéficos em relação à toxicidade celular e à melhora funcional dos animais (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997; NISHIZAWA, 2001; POPOLI *et al.*, 2004). No presente trabalho, foi observado que a infusão de AQ em camundongos modificou a liberação e a captação de glutamato, não exercendo efeito na atividade da GS. A falta de efeito sobre a atividade da GS pode ser devida ao tempo de avaliação de sua atividade após a infusão de AQ. Dessa forma, uma curva de tempo da atividade da GS após a infusão de AQ poderia revelar se este modifica a atividade daquela *in vivo*, visto que tal efeito já foi demonstrado *in vitro* (TING *et al.*, 2009). Uma hipótese alternativa, mas complementar, é a observação de que o estresse oxidativo induzido pelo AQ no hipocampo ocorre a partir de 4h após sua infusão (GANZELLA *et al.*, 2006), de modo que os sítios de cisteína presentes na GS não sofreriam ação dos radicais livres no período avaliado aqui.

Também foi demonstrado aqui que o tratamento com atorvastatina não preveniu o aumento da liberação de glutamato induzido pelo AQ. Visto os efeitos neuroprotetores da atorvastatina, a quantidade de glutamato liberado poderia ser insuficiente para induzir dano celular e apenas induzir uma dessensibilização dos receptores glutamatérgicos. Outra possibilidade é que, desde que a quantidade de glutamato liberada não é excessiva e a captação está aumentada, isto poderia resultar em um balanço positivo, ou seja, uma remoção do glutamato extracelular, promovendo neuroproteção (FEATHERSTONE e SHIPPY, 2008). Assim, como foi demonstrado que a atorvastatina protege os neurônios da morte celular induzida pelo AQ, pode-se supor que os efeitos neuroprotetores da atorvastatina possam ser devidos a outros mecanismos moleculares diferentes da modulação da liberação de glutamato. Em modelos de TCE, os efeitos neuroprotetores da

atorvastatina e simvastatina foram associados com a redução da expressão de mediadores inflamatórios, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), interleucina-6 e aumento da expressão do receptor do fator de crescimento epidermal e do fator neurotrófico derivado do cérebro (CHEN *et al.*, 2009; MAHMOOD *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010a; INDRASWARI *et al.*, 2012). Em modelos de isquemia cerebral, demonstrou-se que as estatinas aumentam a expressão da eNOS, reduzem o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e reduzem a ativação da caspase 3 (VAUGHAN *et al.*, 2001; CARLONI *et al.*, 2006; GELOSA *et al.*, 2007; ZIPP *et al.*, 2007).

Similarmente ao observado aqui, o aumento ou preservação da função dos transportadores de glutamato ou da função da GS têm sido relacionado a efeitos protetores contra o dano excitotóxico associado ao aumento da liberação de glutamato (ZOU *et al.*, 2010). Desde que nenhuma alteração foi observada na atividade da GS em resposta ao AQ, a manutenção da captação de glutamato promovida pela atorvastatina poderia tamponar o excesso de glutamato liberado em resposta ao AQ. De fato, em uma ampla gama de lesões excitotóxicas, uma disfunção na captação de glutamato parece desempenhar um papel importante. Disfunção nos transportadores astrocitários de glutamato tem sido implicada na morte de neurônios motores em modelos de esclerose lateral amiotrófica (CORTI *et al.*, 2010). De modo inverso, o aumento na expressão de transportadores de glutamato no hipocampo tem sido associado à resistência à morte celular induzida pela isquemia (KETHEESWARANATHAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011a). Assim, a supra-regulação dos transportadores glutamatérgicos parece estar envolvida na indução de tolerância ao insulto isquêmico (GONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; TAUSKELA *et al.*, 2012). Foi observado que ocorre uma diminuição na marcação de GLT-1 na região CA1 após o tratamento com AQ, efeito esse não modificado pela atorvastatina. Previamente, nosso grupo demonstrou que o tratamento com atorvastatina previne o dano neuronal causado pela infusão do peptídeo beta-amiloide₁₋₄₀, e parte desse efeito neuroprotetor poderia ser associado à prevenção da diminuição da expressão de GLT-1 e GLAST (PIERMARTIRI *et al.*, 2010).

As vias de sinalização intracelulares envolvidas nos efeitos neuroprotetores das estatinas ainda não são completamente conhecidas. Aumento na fosforilação da Akt tem sido relatado como crucial na neuroproteção, regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular induzida pelas estatinas (ZHANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008b; WU *et al.*, 2008). No presente trabalho, foi demonstrado que o

tratamento com atorvastatina previne a diminuição na fosforilação da Akt após dez minutos da infusão de AQ. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação da Akt permanece aumentada, inclusive em relação ao grupo controle, mesmo após 24h da infusão de AQ nos grupos de animais que receberam o tratamento com atorvastatina. Parte dos efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade, provenientes da ativação da via da PI3K/Akt tem sido atribuídos à modulação da expressão de GLT-1 e de EAAC1 e ao aumento na captação de glutamato (SIMS *et al.*, 2000; KRIZMAN-GENDA *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2010b). Em vista desses dados, e considerando a observação dos efeitos do tratamento com atorvastatina sobre a fosforilação da Akt e sobre a captação de glutamato, foi avaliado o efeito da inibição da via da PI3K/Akt sobre a captação de glutamato. No entanto, o inibidor utilizado, a wortmanina, foi incapaz de modificar o efeito protetor da atorvastatina sobre a captação de glutamato. Esse resultado não exclui que a sinalização da via da Akt participe da neuroproteção induzida pela atorvastatina. Isso se deve ao fato de que já foi demonstrado que as estatinas modulam outros mecanismos celulares envolvidos com neuroproteção, como a expressão da nNOS, a translocação nuclear do NF- κ B, via sinalização pela Akt (NAKATA *et al.*, 2007). Dessa forma, o aumento na fosforilação da Akt pode ser um dos mecanismos que contribuem para a neuroproteção observada após o tratamento com atorvastatina.

A cascata de sinalização da MAPK/ERK tem sido implicada em várias formas de plasticidade e neuroproteção (KARMARKAR *et al.*, 2011). Tem sido demonstrada a alteração nos níveis de fosforilação da ERK em modelos de isquemia cerebral e de epilepsia (KARMARKAR *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2012). Previamente, nosso grupo demonstrou que a inibição da via MAP cinase cinase (MEK) pelo PD98059 antes da infusão de AQ promove um aumento na taxa de mortalidade, indicando que a via de sinalização MAP/ERK pode estar envolvida na toxicidade induzida pelo AQ (DE ARAUJO HERCULANO *et al.*, 2011). Na presente tese, foi observado que o tratamento com atorvastatina promoveu um aumento na fosforilação da ERK1. De acordo com esses resultados, foi demonstrado que o tratamento com outras estatinas, como a simvastatina, também ativam a ERK no tecido cerebral (BERETTA *et al.*, 2011). A ativação da ERK pelas estatinas tem sido associada a efeitos anti-inflamatórios e aumento nas defesas antioxidantes (KIM *et al.*, 2007; KIM e CHOI, 2010). Como a via da MAPK/ERK é uma das vias que regulam a expressão e a atividade dos transportadores de glutamato (MATOS *et al.*, 2008), foi avaliado o efeito da inibição da MEK sobre a ação da atorvastatina na captação de glutamato. O efeito

da atorvastatina na captação de glutamato foi abolido pela inibição da MEK, sugerindo que os efeitos neuroprotetores do tratamento com atorvastatina na remoção de glutamato são dependentes da ativação da via MAPK/ERK. Assim, além da manutenção da atividade dos transportadores demonstrada aqui, foi previamente demonstrado que a via da ERK está envolvida na indução da expressão de GLT-1 e sua translocação para a membrana plasmática (FRIZZO *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2008).

Tem sido demonstrado que a sinalização intracelular pela via das JNK e p38^{MAPK} atua na regulação da apoptose neuronal (MIELKE *et al.*, 2000; HARPER e LOGRASSO, 2001). Foi observado que o AQ promove um aumento na fosforilação das JNKs e da p38^{MAPK} no córtex cerebral e isto estava associado ao aumento na morte celular encontrado (FERRER *et al.*, 2001). Entretanto, aqui não foi observada nenhuma alteração nos níveis de fosforilação da JNK e da p38^{MAPK} no hipocampo após a infusão de AQ ou com o tratamento com atorvastatina. Este resultado sugere que os efeitos da atorvastatina contra a toxicidade induzida pelo AQ não são dependentes da modulação da via da p38^{MAPK} ou JNK.

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais mais susceptíveis à excitotoxicidade, e a perda de neurônios hipocâmpais está relacionada à patogênese de doenças neurológicas crônicas e agudas, como a isquemia cerebral. Dessa forma, um dos focos de interesse deste trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na morte celular excitotóxica e na proteção mediada pela atorvastatina utilizando-se fatias de hipocampo de camundongos. Como previamente demonstrado (BRUNO *et al.*, 1994; SATTLER e TYMIANSKI, 2001; ARUNDINE e TYMIANSKI, 2004), durante a isquemia seguida de reperfusão o antagonista de NMDAR, MK-801, preveniu a indução de morte celular pela PGO, indicando a participação da excitotoxicidade glutamatérgica no dano celular neste modelo *in vitro* de isquemia. Assim, foi avaliado se o tratamento de camundongos com atorvastatina (10mg/kg/dia por 7 dias) poderia exercer efeito protetor em fatias hipocâmpais desses animais frente a insulto induzido pela PGO *in vitro*. Aqui, foi demonstrado que a atorvastatina previne o estresse oxidativo e a morte celular induzida pela PGO, através da modulação do transporte e da metabolização de glutamato de maneira dependente da via de síntese do colesterol.

Tem-se demonstrado que as estatinas previnem a morte celular causada pela isquemia cerebral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi observado que o tratamento com simvastatina protegeu culturas de neurônios corticais da morte celular induzida pela PGO e que este efeito

estava associado à redução na produção de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um produto final da peroxidação lipídica (LIM *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que ratos tratados por duas semanas com estatinas apresentaram uma redução no volume de infarto cerebral em comparação ao grupo controle (HAYASHI *et al.*, 2005). Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que a redução dos níveis de HNE e 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) poderiam estar relacionados com os efeitos protetores das estatinas. No atual trabalho, também foi demonstrado que tratamento com atorvastatina por uma semana preveniu a redução na viabilidade celular induzida pela PGO. Em acordo com outros estudos, este efeito protetor parece ser exercido através da diminuição do estresse oxidativo, visto que os níveis de NPSH durante a PGO foram mantidos nos hipocampos de camundongos tratados com atorvastatina. Além disso, camundongos tratados com atorvastatina apresentaram menor produção de ROS após a PGO, confirmando os efeitos antioxidantes das estatinas.

Durante condições de isquemia, o decréscimo na produção de ATP pode levar a falência de vários processos celulares dependentes de energia, como a redução da atividade da sódio-potássio ATPase (HERTZ, 2008). A dissipação do gradiente de sódio pode aumentar a liberação de glutamato na fenda sináptica e afetar, diretamente, a remoção do glutamato extracelular através da redução da função dos transportadores de glutamato (DOYLE *et al.*, 2008). Nesta tese foi demonstrado que a atorvastatina pode alterar a transmissão glutamatérgica em condições de isquemia através da modulação do transporte de glutamato. A administração de atorvastatina preveniu a redução na captação de glutamato e na atividade da GS induzida pela PGO, a qual poderia levar a uma menor ativação de receptores glutamatérgicos e reduzir a produção de ROS associada à estimulação demasiada de receptores de glutamato. Foi demonstrado que o pós-tratamento com pravastatina reduziu o aumento de glutamato no estriado de ratos submetidos à oclusão temporária da artéria cerebral média (BERGER *et al.*, 2008).

Por outro lado, foi demonstrado no atual trabalho que a PGO induz a um aumento da liberação de glutamato, no entanto, a atorvastatina foi incapaz de prevenir tal efeito. Assim, o tratamento com atorvastatina não inibiu o aumento da liberação de glutamato induzida tanto em modelos de excitotoxicidade *in vivo* quanto *in vitro*. Sabe-se que o aumento na concentração de cálcio intracelular através da ativação dos NMDAR pode promover a liberação por exocitose de glutamato nas sinapses (SATTLER e TYMIANSKI, 2000; MALARKEY e

PARPURA, 2008). Foi demonstrado que o tratamento com estatinas não afeta a concentração intracelular de cálcio em resposta a ativação dos NMDAR (ZACCO *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2006). No entanto, durante a isquemia cerebral, a liberação de glutamato também pode ser atribuída à reversão dos transportadores glutamatérgicos neuronais (SARANSAARI e OJA, 1999). Assim, a atorvastatina não foi eficiente em prevenir a liberação de glutamato após a PGO. Entretanto, o tratamento com atorvastatina promoveu neuroproteção contra a PGO o que pode ser devido ao aumento na captação de glutamato e na atividade da GS. Previamente, foi demonstrado que em condições isquêmicas o dano oxidativo pode reduzir a atividade e a expressão da GS (OLIVER *et al.*, 1990). De outra forma, o aumento na expressão da GS está relacionado à neuroproteção, desde que a manutenção da atividade normal da GS tem sido relacionada em outras estratégias neuroprotetoras, como o pré-condicionamento químico (HOSHI *et al.*, 2006; STELMASHOOK *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011b).

Como mencionado anteriormente e demonstrado aqui, o tratamento com estatinas pode prevenir a morte celular induzida pela excitotoxicidade glutamatérgica. De modo interessante, estudos prévios demonstraram que os efeitos neuroprotetores das estatinas eram atenuados pelo co-tratamento com mevalonato ou colesterol, indicando que seus os efeitos neuroprotetores estavam relacionados à inibição da via biossintética do colesterol (ZACCO *et al.*, 2003). Do mesmo modo, foi demonstrado que a depleção de colesterol da membrana com metil- β -ciclodextrina apresentou efeito neuroprotetor contra toxicidade celular induzida pela PGO (ABULROB *et al.*, 2005). No atual trabalho, demonstrou-se que o efeito neuroprotetor da atorvastatina sobre a diminuição da viabilidade celular foi dependente da inibição da síntese de colesterol, visto que a adição do mesmo preveniu a ação neuroprotetora da atorvastatina. Além de demonstrar um possível mecanismo de ação dos efeitos neuroprotetores da atorvastatina, esses resultados contribuem para a hipótese de que a depleção de colesterol pode proteger contra a excitotoxicidade (PONCE *et al.*, 2008).

O tratamento com estatinas reduz o aumento intracelular de cálcio induzido por glutamato, provavelmente devido à modulação da função dos NMDAR (BOSEL *et al.*, 2005). Além disso, estudos demonstraram alterações na função dos NMDAR após o tratamento com estatinas. Essas alterações parecem ser dependentes da diminuição dos níveis de colesterol e resultam em uma menor associação dos NMDAR com os microdomínios lipídicos levando a mudanças na inserção dos NMDAR na membrana plasmática (PONCE *et al.*, 2008) e modulação

da união de glutamato aos NMDAR (WANG *et al.*, 2009a). Assim, o tratamento com estatinas pode prevenir a excitotoxicidade, pelo menos em parte, devido à modulação da função dos receptores de glutamato. No entanto, além de observar o efeito da atorvastatina sobre a captação de glutamato e atividade da GS, o presente estudo demonstra que esse efeito da atorvastatina é dependente da via de síntese do colesterol. Esses efeitos observados aqui sobre a captação de glutamato podem ser devidos a modulação pelas estatinas entre a associação de transportadores de glutamato e os microdomínios lipídicos (TIAN *et al.*, 2010). Nesse sentido, foi demonstrado em cultura de astrócitos que a depleção de colesterol promoveu um aumento na captação de glutamato (TSAI *et al.*, 2006). Dessa forma, este trabalho demonstra que a modulação do transporte e metabolização de glutamato pelas estatinas ocorre também em condições isquêmicas e esses efeitos estão relacionados à via de biossíntese do colesterol.

Em um modelo da doença de Alzheimer que utilizou a injeção do peptídeo beta-amilóide, foi observado que o tratamento com atorvastatina previne a redução na expressão de dois tipos de transportadores de glutamato encontrados no hipocampo, GLT-1 e GLAST (PIERMARTIRI *et al.*, 2010). Isso, no entanto, não foi capaz de prevenir a diminuição da captação de glutamato induzida após a injeção do peptídeo beta-amilóide (PIERMARTIRI *et al.*, 2010). Esses diferentes efeitos da atorvastatina sobre a captação e liberação de glutamato em modelos de convulsão, PGO e da doença de Alzheimer, provavelmente refletem diferentes alterações fisiopatológicas induzidas nos modelos. No caso dos modelos de convulsão do AQ e PGO, a falta de efeito da atorvastatina sobre a liberação exige maior compreensão do mecanismo pelo qual o ocorre o aumento da liberação de glutamato. Uma possível fonte de glutamato liberado poderia ser o glutamato não-vesicular (DANBOLT, 2001; FEATHERSTONE *et al.*, 2002). Isso poderia ser investigado pelo uso de inibidores do transporte de glutamato e a mensuração dos níveis de ATP intracelular, visto que uma das condições para que se ocorra o transporte reverso é a despolarização da membrana e a manutenção do potencial de membrana nos neurônios consome cerca de dois terços de todo ATP produzido nessas células.

Em conclusão, a atorvastatina preveniu a diminuição na viabilidade celular de fatias hipocâmpais induzida pela PGO. A atorvastatina protegeu as fatias hipocâmpais da toxicidade da isquemia através da redução do estresse oxidativo e da prevenção da diminuição da captação e da metabolização de glutamato induzida pela PGO. Além disso, foi demonstrado que este efeito protetor da atorvastatina foi

revertido pelo colesterol nas fatias hipocâmpais, provavelmente pela perda do efeito da estatina sobre a captação e metabolização de glutamato.

O conhecimento acerca dos possíveis efeitos comportamentais das estatinas ainda é escasso em relação ao conhecimento dos seus efeitos neuroprotetores. Dessa forma, foi avaliado também se o tratamento atorvastatina (10mg/kg/dia por 7 dias) poderia alterar o comportamento de camundongos expostos aos testes do campo aberto (CA), do labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de realocação de objetos. Foi demonstrado aqui que o tratamento de camundongos suíços albinos com atorvastatina por 7 dias nas doses de 1 e 10 mg/kg/dia promoveu um aumento da cognição no teste de realocação de objetos. Foi demonstrado que o tratamento com atorvastatina promoveu proteção contra os déficits induzidos pela escopolamina no desempenho de reconhecimento espacial em camundongos (RAYATNIA *et al.*, 2011). Similarmente, foi demonstrado que o tratamento com simvastatina melhorou o desempenho de ratos no teste de reconhecimento de objetos e de esquivas inibitórias (DOUMA *et al.*, 2011). Esses efeitos das estatinas podem ser devido ao fato de que foi demonstrado que a simvastatina facilitou a indução de potenciação de longo prazo no hipocampo, o qual está envolvido no processamento de tarefas relacionadas ao aprendizado e à memória (MANS *et al.*, 2010). Em outro modelo, o óxido nítrico foi relacionado aos efeitos da atorvastatina na fase de consolidação, mas não na fase de evocação de memória no teste do labirinto em Y, apesar de que o tratamento com atorvastatina promoveu melhora do desempenho em ambas as fases (RAYATNIA *et al.*, 2011). Dessa forma, a atorvastatina pode promover melhora do desempenho em testes de memória, no entanto, os mecanismos pelos quais esse efeito ocorre não estão elucidados.

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com atorvastatina não promoveu alterações nos testes de CA e do LCE. Foi demonstrado previamente que o tratamento agudo com atorvastatina não altera os parâmetros locomotores no teste de CA (LUDKA *et al.*, 2012). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que o tratamento agudo com atorvastatina diminuiu o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda (TSC), consistente com um efeito tipo antidepressivo, com envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico (LUDKA *et al.*, 2012). Além disso, dados da literatura demonstraram que o tratamento por 2 semanas com simvastatina não alterou o padrão locomotor de ratos no CA, entretanto, o tratamento de 4 semanas com simvastatina promoveu um aumento na distância percorrida no CA (WANG *et al.*, 2009a;

DOUMA *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que o tratamento de quatro semanas com simvastatina aumentou o tempo que os animais permanecem nos braços abertos do LCE, sugerindo um efeito redutor da simvastatina sobre o comportamento do tipo ansioso (WANG *et al.*, 2009a). Também foi demonstrado que tratamento de 8 semanas com simvastatina aumentou a coordenação motora no teste do rota-rod (KOU *et al.*, 2010). Assim, as respostas comportamentais às estatinas parecem depender do tempo de tratamento, da estatina empregada e do teste utilizado.

Finalmente, podemos propor através dos dados apresentados nessa Tese de Doutorado, que o tratamento com atorvastatina promove proteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica *in vivo* e *in vitro*, bem como aumenta o desempenho de memória espacial dos animais. Os efeitos da atorvastatina contra a toxicidade causada pelo AQ envolvem a modulação do transporte de glutamato e participação das vias de sinalização da ERK e Akt. Do mesmo modo, os efeitos da atorvastatina contra a toxicidade induzida pela PGO estão relacionados modulação do transporte e metabolização do glutamato e esses efeitos estão associados com a inibição da síntese de colesterol. Esses dados sugerem um potencial uso das estatinas como uma estratégia terapêutica no tratamento de doenças neurológicas como o AVC e a epilepsia/convulsão.