

Luisa Bandeira Binder

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA
(GLUN2B) NO EFEITO NEUROPROTETOR E TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Carla Inês Tasca
Coorientadora: Leandra C. Constantino

**Florianópolis - SC
2016**

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

Binder, Luisa Bandeira Binder
ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA (GLUN2B) NO
EFEITO NEUROPROTETOR E TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA
ATORVASTATINA EM CAMUNDONGOS / Luisa Bandeira Binder
Binder ; orientadora, Carla Inês Tasca Tasca ;
coorientadora, Leandra Celso Constantino Constantino. -
Florianópolis, SC, 2016.
52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

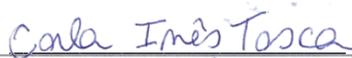
1. Ciências Biológicas. 2. Neuroproteção. 3.
Atorvastatina. 4. Efeito tipo-antidepressivo. I. Tasca,
Carla Inês Tasca. II. Constantino, Leandra Celso
Constantino. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Luisa Bandeira Binder

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA
(GLUN2B) NO EFEITO NEUROPROTETOR E TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DA ATORVASTATINA EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

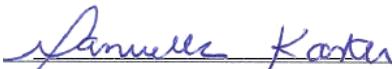
BANCA EXAMINADORA:



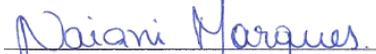
Prof.^a Dra. Carla Inês Tasca
Orientadora



Prof. Dra. Fabiana Kalyne Ludka
Membro



Prof. Dra. Manuella Pinto Kaster
Membro



MSc Naiani Ferreira Marques
Membro suplente

Florianópolis, 18 de julho de 2016

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a pessoa que fez a tudo isso possível, minha mãe Dione, ela que foi minha inspiração, meu suporte e que com muita dedicação me fez ser quem sou hoje.

Agradeço a professora Dra. Carla Inês Tasca pelos ensinamentos, pela paciência e por toda ajuda na execução, nas ideias e os subsídios que fizeram esse trabalho possível.

A professora co-orientadora Leandra Celso Constantino pela ajuda desde o planejamento do projeto à execução dos experimentos, que além disso é uma amizade que levo para a vida.

Ao Maurício, que além de colega de turma e melhor amigo é o meu companheiro para a vida e a pessoa que mais me acompanhou e me deu força em toda essa trajetória. E a todos da minha família que sempre me incentivaram a ser o melhor possível.

Aos meus amigos da graduação e do PET, que me acompanharam com muita alegria e diversão nesses anos Juliana, Natália, Michelly, Fabíola, Karina, Gabriela, Cristian, Tomás, Matheus, Larissa. Em especial a Camila, que foi minha amiga, confidente, parceira em todos os momentos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Neuroquímica 4, pela ajuda, paciência e parceria. Em especial a Fabiana que apesar da atual distância, sem seus ensinamentos esse trabalho não seria possível. E a Naiani, que dedicou com muita alegria tardes, noites e finais de semana para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada, Flávia, Karen, Débora, Gabriela, Caio, Victor, Wagner, Tetsade e Beatriz.

Resumo:

A depressão maior (DM) é um transtorno de humor associado a alterações morfológicas, neuroquímicas e mudanças na sinalização intracelular no Sistema Nervoso Central. Doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas compartilham a excitotoxicidade glutamatérgica como um evento precipitante ou agravante e, portanto, o estudo de fármacos que possam modular a transmissão glutamatérgica é de fundamental importância para o surgimento de novas estratégias terapêuticas. A atorvastatina é um fármaco hipocolesterolemizante que pertence à classe das estatinas, fármacos estes que atuam inibindo a enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase. Pesquisas têm demonstrado que a atorvastatina apresenta efeitos pleotrópicos, como efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo os quais envolvem a modulação do sistema glutamatérgico, em especial, os receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDAR). Nesse estudo foi avaliado o efeito neuroprotetor da atorvastatina frente à toxicidade induzida por glutamato e a participação dos NMDAR, subunidades GluN2A e GluN2B, no seu efeito tipo-antidepressivo em testes comportamentais preditivos para atividade antidepressiva. Para avaliar a participação destas subunidades no seu efeito neuroprotetor, fatias de hipocampo foram incubadas com ifenprodil (5 – 20 μM - antagonista de GluN2B), D-serina (30 μM , co-agonista de GluN2A) e glicina (10 μM , co-agonista de GluN2B) e glutamato 10 mM, para indução de excitotoxicidade. Ao final a viabilidade das fatias analisadas pelo método de redução do MTT. A incubação de ifenprodil 20 μM apresentou prevenção parcial frente à toxicidade glutamatérgica. Esta concentração foi selecionada como sendo a sub-ativa para neuroproteção. Animais tratados 7 dias com a dose sub-ativa de atorvastatina (1 mg/kg, p.o.), em *ex vivo*, tiveram suas fatias hipocampais incubadas com ifenprodil na sua concentração sub-ativa *in vitro*. Esta co-incubação apresentou efeito somatório prevenindo a toxicidade induzida por glutamato. Adicionalmente, animais tratados por 7 dias com a dose ativa da atorvastatina (10 mg/kg) tiveram suas fatias hipocampais incubadas com D-serina ou glicina. D-serina e glicina *per se* não apresentaram alterações na viabilidade celular e não foram capazes de prevenir a toxicidade glutamatérgica. O tratamento com atorvastatina previne a redução da viabilidade induzida por glutamato. No entanto as fatias pré-incubadas com D-serina mais glutamato apresentaram uma redução parcial do efeito neuroprotetor da atorvastatina. Em contrapartida, em fatias incubadas com glicina mais glutamato, o

mantiveram o efeito neuroprotetor da atorvastatina. Para avaliar a participação da subunidade GluN2B no efeito tipo-antidepressivo os animais foram tratados com atorvastatina e ifenprodil (0,1-3 mg/kg). Observamos que a administração intraperitoneal de ifenprodil (3 mg/kg) apresentou redução no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC). Foi selecionada a dose 0,5 mg/kg como sendo a sub-ativa. Entretanto a coadministração das doses sub-ativas de atorvastatina (0,01 mg/kg) e ifenprodil (0,5 mg/kg) não apresentou redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC. Esses resultados indicam que o efeito neuroprotetor da atorvastatina ocorre por meio da redução na atividade de NMDAR, dependente da interação com a subunidade GluN2B. Contribuindo para a identificação do mecanismo de ação de um fármaco já utilizado clinicamente com outros fins e cuja ação neuroprotetora e antidepressiva vem sendo elucidada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Receptores NMDA e seu efeito dual: modelo de localização e de composição de subunidades	18
Figura 2. Estatinas utilizadas na clínica: simvastatina, lovastatina e atorvastatina em comparação com a HMG-CoA, substrato da HMG-CoA redutase.....	20
Figura 3. Avaliação do efeito neuroprotetor de diferentes concentrações de ifenprodil frente à toxicidade de glutamato em fatias de hipocampo (<i>ex vivo</i>).	30
Figura 4. Envolvimento da subunidade GluN2B do receptor NMDA no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico da atorvastatina em camundongos.....	31
Figura 5. Envolvimento da subunidade GluN2A no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico de atorvastatina em camundongos.....	32
Figura 6. Envolvimento da subunidade GluN2B no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico de atorvastatina em camundongos.....	33
Figura 7. Efeito tipo-antidepressivo do tratamento agudo de diferentes doses de ifenprodil em camundongos no TSC	34
Figura 8. Envolvimento da subunidade GluN2B do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo em camundongos no TSC.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
AKT	Proteína cinase B
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico
ANOVA	Análise de variância
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DM	Depressão maior
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GluN1A/B-	Subunidade 1 A ou B de receptores glutamatérgicos NMDA
GluN2A/B	Subunidade 2 A ou B de receptores glutamatérgicos NMDA
GSK 3β	Glicogênio sintase cinase 3
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A
iGluR	Receptores ionotrópicos de glutamato
i.p.	Injeção intraperitoneal
KA	Kainato
KRB	Tampão Krebs-Ringer bicarbonato
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptores NMDA
NO	Óxido nítrico
p.o.	Por via oral
PI3K	Fosfatidilinositol-cinase
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Teste do campo aberto
TSC	Teste de suspensão pela cauda

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	15
1.1 Depressão	15
1.2 Sistema glutamatérgico.....	16
1.3 Estatinas.....	19
1.4. Efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina.....	20
1.5. Justificativa	22
II. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral:	23
2.2. Objetivos Específicos:	23
III. MATERIAS E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais	25
3.2. Fármacos	25
3.3. Avaliação <i>ex vivo</i> da atividade neuroprotetora da atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica.....	25
3.4. Avaliação de viabilidade celular	26
3.5. Avaliações comportamentais	26
3.5.1. Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)	26
3.5.2. Teste do Campo Aberto (TCA)	27
3.6. Análise estatística.....	27
IV. RESULTADOS	29
4.1. Ensaio de viabilidade celular	29
4.2. Avaliações comportamentais	33
V. DISCUSSÃO.....	37
VI. CONCLUSÕES.....	43
VII. PERSPECTIVAS	43

VIII. ARTIGOS PUBLICADOS EM COAUTORIA	44
IX. REFERÊNCIAS	45

I. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão maior (DM) é um transtorno de humor grave e debilitante caracterizado por permanente tristeza, anedonia, culpa, baixa autoestima, distúrbios do sono, falta de concentração e pensamentos suicidas (MURRAY; LOPES, 1996; TIZABI, 2016). É uma síndrome psiquiátrica severa com alta prevalência e impacto socioeconômico, sendo ainda, o transtorno psiquiátrico com maior tempo de prevalência (SMITH, 2011; HASHIMOTO, 2009). Estima-se que a DM afete 350 milhões de pessoas em todo o mundo (COLLINS *et al.*, 2011). Apesar de afetar milhões de pessoas em todo o mundo, promover transtornos incalculáveis e altos custos financeiros, sua etiologia e neurofisiologia ainda não se encontram totalmente elucidadas (SHALTIEL *et al.*, 2007). De acordo com Sanacora *et al.* (2008), os transtornos de humor são resultados de uma complexa interação de múltiplos genes e fatores ambientais, e sua expressão fenotípica não inclui apenas distúrbios de humor, mas também anormalidades cognitivas, motoras, endócrinas e do sistema autônomo.

Diversas regiões do encéfalo como o córtex pré-frontal, o córtex cingulado anterior, o giro parahipocampal e o hipocampo estão envolvidas no processamento das emoções e sua integração com a cognição (FRANGOU, 2006). A DM está associada a alterações morfológicas da região hipocampal, como a atrofia, vulnerabilidade seletiva à morte celular de neurônios regionais, alterações neuroquímicas, mudanças na sinalização intracelular e na expressão gênica (TSANKOVA *et al.*, 2007). Dentre as teorias que buscam elucidar a fisiopatologia desse transtorno, a mais bem aceita é a teoria monoaminérgica, a qual é baseada no fato de que a redução nos níveis de monoaminas como serotonina, noradrenalina e dopamina, é responsável pela fisiopatologia da DM (ELHWUEGI, 2004).

Os principais antidepressivos utilizados atualmente na clínica induzem inicialmente o aumento extracelular de monoaminas, principalmente a nível sináptico. No entanto, tal achado torna discutível a teoria monoaminérgica, pois apesar dos antidepressivos causarem um aumento nos níveis sinápticos de monoaminas em um curto período de tempo que vai de minutos a horas, a redução dos sintomas depressivos só ocorre entre 3 a 4 semanas após o início do tratamento (SANACORA, 2012; HASHIMOTO, 2009; TIZABI, 2016). Essa discrepância temporal entre o início do tratamento e a redução dos sintomas indica que outras

vias neurais também participam no efeito terapêutico dos antidepressivos (SANACORA *et al.*, 2008). Sabe-se que antagonistas dos receptores glutamatérgicos podem modular o sistema monoaminérgico (WEDZONI *et al.*, 1997). Já se demonstrou que a fluoxetina, inibidor seletivo de recaptação de serotonina, é capaz de bloquear os receptores glutamatérgicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) (VIZI, *et al.*, 2013). Desta mesma forma, os antidepressivos clássicos que modulam os níveis plasmáticos de monoaminas afetam a funcionalidade dos receptores glutamatérgicos (VIZI *et al.*, 2012; PAUL *et al.*, 1994). Desta forma diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para investigar a possível participação de outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia desse transtorno, dentre eles o sistema glutamatérgico (SANACORA *et al.*, 2008; SKOLNICK, 2009).

1.2 Sistema glutamatérgico

O sistema glutamatérgico envolve receptores ativados pelo principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o glutamato. Este neurotransmissor desempenha um importante papel no desenvolvimento do SNC, na migração, diferenciação e sobrevivência neural, bem como, na gênese de axônios (COYLE *et al.*, 2002; HASSEL; DINGLELINE, 2006). Os receptores ativados pelo glutamato são classificados em duas classes: ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os receptores ionotrópicos são formados por canais iônicos que ao serem ativados permitem a passagem de íons, desencadeando a despolarização do neurônio. Estes receptores são classificados em três grupos, caracterizados pela afinidade aos seus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e kainato (KA).

Os receptores NMDA (NMDAR) são complexos heteroméricos compostos por quatro subunidades e os heterômeros, em sua maioria, são conjuntos formados por duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2 (PAOLETTI, 2011). A composição das subunidades determina as propriedades funcionais dos NMDAR visto que cada subtipo está associado com diferentes vias intracelulares. Para sua ativação os NMDAR necessitam conjuntamente da ligação do seu agonista, glutamato, e da despolarização de membrana (WYLLIE *et al.*, 2013). Adicionalmente estes receptores possuem um sítio de ligação no qual se ligam seus co-agonistas, os aminoácidos D-serina ou glicina. Diferentes composições das subunidades do NMDAR determinam a sua afinidade para os co-agonistas (HENNEBERGER *et al.*, 2013). Estudos

demonstram que os NMDAR que contém subunidade GluN2A preferencialmente ativados pela D-serina como co-agonista, enquanto que os NMDAR que contém subunidade GluN2B são preferencialmente ativados pela glicina (PAPOUIN *et al.*, 2012).

O acúmulo extracelular de glutamato, pode resultar em uma ativação crônica de seus receptores e uma massiva liberação de cálcio nos neurônios aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar à morte celular através de um processo denominado de excitotoxicidade glutamatérgica. Os NMDAR são permeáveis a Ca^{2+} , permitindo que ocorra um grande aumento das concentrações desse íon no interior da célula. Portanto, a hiperativação deste iGluR, devido ao excesso do seu agonista, tem sido considerada a principal responsável pela morte celular devido à excitotoxicidade (STONE & ADDAE, 2002), porém, sua ação não é sempre excitotóxica. Estes receptores apresentam um efeito dual, os quais podem promover a morte ou a sobrevivência neuronal. Esse efeito dual pode ser explicado através de dois modelos: modelo de localização sináptica e o modelo de composição de subunidades. Segundo o modelo de localização sináptica, de acordo com Hardingham & Bading (2010), demonstra que a ativação de NMDAR extra-sinápticos resulta em neurotoxicidade enquanto a ativação dos sinápticos é neuroprotetora. O modelo de composição de subunidades de acordo com Lai e colaboradores (2011), a ativação da subunidade GluN2A é neurotrófica enquanto a da subunidade GluN2B é excitotóxica (Fig.1). Estudos adicionais demonstraram que a inibição de receptores com a subunidade GluN2B previne a morte celular enquanto que o bloqueio das subunidades GluN2A prejudica a ativação das vias relacionada à neuroproteção (KISS *et al.*, 2012).

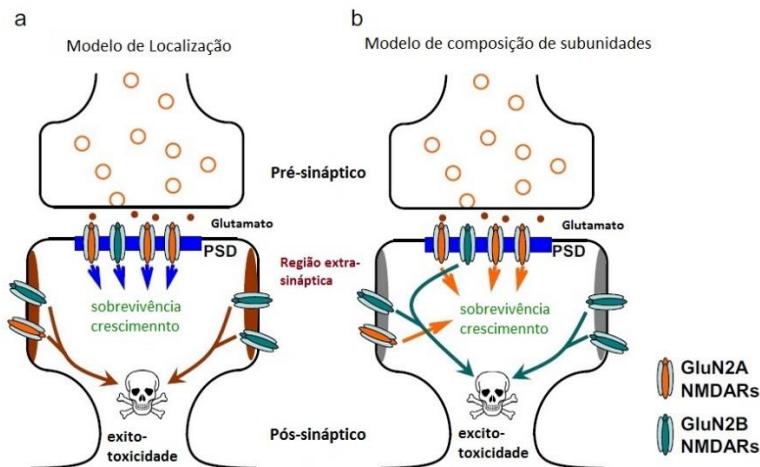


Figura 1. Receptores NMDA e seu efeito dual: modelo de localização e de composição de subunidades. Modelo de localização: ativação de NMDAR localizados na região sináptica geram sobrevivência celular e crescimento, enquanto a ativação de NMDAR localizados na região extra-sináptica resultam em excitotoxicidade. Modelo de composição de subunidades: independentemente da localização a ativação da subunidade GluN2A resulta em sobrevivência e crescimento, enquanto a ativação de GluN2B resulta em excitotoxicidade (Adaptado de Zhou & Sheng, 2013).

Diversas pesquisas têm demonstrado que alterações da neurotransmissão glutamatérgica têm sido implicadas à fisiopatologia da depressão e outros transtornos de humor (POPOLI *et al.*, 2013). Diferentes processos celulares podem desencadear uma liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica. Análises em pacientes diagnosticados com DM apresentam elevados níveis de glutamato no sangue e no líquido cefalorraquidiano em comparação ao grupo controle (MAURI, 1998; MITANI *et al.*, 2006). Estudos adicionais sugerem que a excitotoxicidade glutamatérgica estaria associada a doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas como o transtorno bipolar (GINSBERG *et al.*, 2011), a esquizofrenia (MOGHADDAM; JAVITT, 2012) e a depressão (SANACORA, 2008).

Dados clínicos indicam que agentes moduladores do sistema glutamatérgico têm causado melhora aos pacientes depressivos (COVINGTON *et al.*, 2010; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; SANACORA *et al.*, 2008). Estudos demonstraram efeito tipo-antidepressivo de antagonistas competitivos e não-competitivos de NMDAR em animais (ROGOZ 2002) e em humanos (ZARATE, 2006).

Memantina, antagonista não competitivo de NMDAR apresentou efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado em ratos (RÉUS *et al.*, 2010). Desta forma, diferentemente dos antidepressivos clássicos, a cetamina, um antagonista não competitivo de NMDAR, exerce um rápido efeito antidepressivo que se prolonga por vários dias (KRISTAL *et al.*, 2013), indicando que a modulação dos NMDAR estaria diretamente relacionada à fisiopatologia desse transtorno. Adicionalmente, estes receptores desempenham um papel central nas mudanças da conectividade das sinapses, e em situações de estímulos crônicos e intensos podem causar morte celular (KUGAYA; SANACORA, 2005).

Com base nesses indícios julgamos de essencial importância novos estudos para investigar a ação do sistema glutamatérgico na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos ou neuroprotetores e, possivelmente, aprimorar as terapias no seu tratamento.

1.3 Estatinas

As estatinas pertencem a uma classe de fármacos atualmente comercializados como hipocolesterolemiantes, por serem inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase hepática, a qual realiza a conversão de 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) a mevalonato, a etapa limitante da biossíntese do colesterol. Dentre as estatinas encontramos fármacos como lovastatina, simvastatina e atorvastatina, amplamente utilizados na clínica (Fig. 2). Tem sido demonstrado que as estatinas são capazes de desencadear efeitos benéficos independentes de sua capacidade de modular os níveis de colesterol, são estes denominados de efeitos pleiotrópicos. Dentre eles já foram relatados efeitos anti-inflamatórios (YOSHIDA *et al.*, 2003), vasculares (RADER, 2003) e efeitos protetores sobre doenças neurodegenerativas (MIIDA *et al.*, 2007).

Ludka e colaboradores (2012) demonstraram que uma única administração de Atorvastatina possui efeito tipo-antidepressivo em testes comportamentais preditivos de fármacos com ação tipo-antidepressiva. Estudos subsequentes demonstraram seu tratamento continuado por 7 dias apresentou efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo (LUDKA *et al.*, 2012; 2016). Adicionalmente, estudos relataram o efeito tipo-antidepressivo e ansiolítico da simvastatina em análises comportamentais em ratos (Kilic *et al.* (2012). Estudos clínicos também já demonstraram uma relação entre a utilização de fármacos dessa classe com o bem-estar psicológico de pacientes com depressão

(LIAO; LAUFS, 2005) e ansiedade (YOUNG-XU *et al.*, 2003). Adicionalmente, pacientes em teste clínico duplo-cego que receberam fluoxetina, antidepressivo clássico, em conjunto com lovastatina tiveram uma redução no quadro depressivo de acordo com a Escala de Depressão Hamilton em relação aos pacientes que receberam somente fluoxetina (GHANIZADEH & HEDAYATI, 2013).

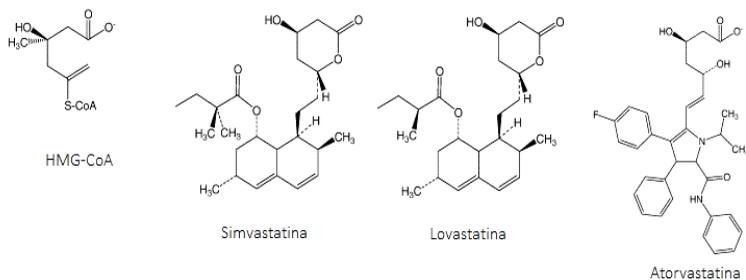


Figura 2. Estrutura química de estatinas utilizadas na clínica: simvastatina, lovastatina e atorvastatina em comparação com a HMG-CoA, substrato da HMG-CoA redutase (Adaptado de Shitara & Sugiyama, 2006).

As estatinas podem apresentar diferentes seletividade e solubilidade. A atorvastatina, o medicamento mais vendido no mundo (FORBES, 2013), é uma estatina sintética e lipossolúvel, característica que possibilita sua passagem pela barreira hematocefálica. Estudos clínicos apresentaram alta tolerância a seus efeitos colaterais (SCHACHTER, 2004) e segurança em sua administração em altas doses (SCHWARTZ *et al.*, 2001), justificando sua vasta utilização em diferentes estudos.

1.4. Efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina

Pesquisas do nosso laboratório demonstraram que a administração de atorvastatina por 7 dias apresentou efeito neuroprotetor frente à toxicidade induzida por ácido quinolínico, um agonista dos NMDAR (PIERMARTIRI *et al.*, 2009) e frente à neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amilóide, um modelo animal da doença de Alzheimer (PIERMARTIRI *et al.*, 2010). Posteriormente foi demonstrado que o tratamento com atorvastatina durante 7 dias apresentou efeito neuroprotetor frente à morte celular hipocampal induzida por glutamato (LUDKA *et al.*, 2012; 2016). Ludka e

colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento contínuo de atorvastatina e fluoxetina previniu o aumento na produção de óxido nítrico (NO), de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na liberação de aspartato induzidas pela excitotoxicidade glutamatérgica. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a disfunção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) induzida pelo glutamato é revertida pelo tratamento sub-crônico de atorvastatina e fluoxetina. Estudos demonstraram também que a inibição da proteína fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) por LY294002 e a inibição da proteína alvo da rapamicina em mamíferos por rapamicina (mTOR) preveniram o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. Adicionalmente, a união de doses sub-ativas de atorvastatina e lítio, inibidor não seletivo da proteína glicogênio sintetase cinase 3 β (GSK3 β), e AR A014418, antagonista seletivo de GSK3 β , apresentaram efeito somatório no TSC reduzindo o tempo de imobilidade dos animais (LUDKA *et al.*, 2016). Evidenciando, desta forma, o envolvimento da via PI3K/AKT/GSK3 β /mTOR no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC.

Adicionalmente, foi demonstrado que uma única administração de atorvastatina produz efeito tipo-antidepressivo em camundongos no TSC (LUDKA, *et al.*, 2013). Outro estudo realizado em nosso laboratório evidenciou que a administração de atorvastatina em sua dose sub-ativa em conjunto com doses sub-ativas de fluoxetina, paroxetina, sertralina e imipramina produziu um efeito tipo-antidepressivo no teste de suspensão pela cauda (TSC) em camundongos, sugerindo a participação do sistema monoaminérgico neste efeito. Ainda, estudos adicionais demonstraram que o efeito tipo antidepressivo dessa estatina atua através da via L-arginina-óxido nítrico-guanosina monofosfato cíclico, via amplamente correlacionada a antidepressivos, e elevação dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (LUDKA *et al.*, 2013). Ainda, Ludka *et al.*, (2013) observou que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina é bloqueado pela administração de NMDA enquanto a coadministração de doses sub-ativas de MK-801 (antagonista não competitivo de NMDAR) e de atorvastatina produziu efeito tipo-antidepressivo no TSC, sugerindo a possível modulação dos NMDAR no efeito tipo antidepressivo dessa estatina. Além disso, Vizi e colaboradores (2012) demonstraram efeito neuroprotetor da fluoxetina, um antidepressivo clássico amplamente utilizado na clínica, através da modulação da subunidade GluN2B. Apesar dessas evidências de interação entre o sistema glutamatérgico e a atorvastatina, a constatação da interação entre os NMDAR e os mecanismos envolvidos no efeito tipo-

antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina não foram ainda elucidados.

1.5. Justificativa

A depressão maior é um transtorno de humor que impõe grandes problemas para a sociedade, sendo classificada, pela Organização Mundial da Saúde, como a terceira maior causa de incapacidades (WHO, 2009) e acredita-se que até 2020 este transtorno de humor seja o segundo causador de incapacidades em todo o mundo (MURRAY; LOPEZ, 1996). Apesar de sua alta prevalência, os fármacos atualmente disponíveis para tratamento desse transtorno apresentam variados efeitos colaterais, elevado tempo de espera para melhora sintomatológica e somente 50 a 60% dos pacientes apresentam remissão total dos sintomas (TRIVEDI *et al.*, 2006; RACAGNI; POPOLI, 2008; LANNI *et al.*, 2009).

Desta forma é necessária a busca de novas terapias antidepressivas ou de novas substâncias que possam aprimorar o funcionamento dos fármacos já utilizados na clínica. A atorvastatina é um fármaco utilizado no tratamento da hipercolesterolemia, porém diversos trabalhos já demonstraram seus efeitos pleiotrópicos. Além disso, é um fármaco lipossolúvel, seguro em altas doses e que apresenta poucos efeitos colaterais (SCHACHTER, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que sua administração sub-crônica produz efeito neuroprotetor frente à neurotoxicidade relacionada à exacerbação da transmissão glutamatérgica induzida por ácido quinolínico (PIERMARTIRI *et al.*, 2009), MPTP (CASTRO *et al.*, 2013), pelo peptídeo beta amiloide (MARTINS *et al.*, 2015). Bem como, em estudos comportamentais, foi demonstrado seu efeito tipo-antidepressivo em camundongos, sendo este diretamente correlacionado à modulação do sistema serotoninérgico (LUDKA *et al.*, 2014) e sistema glutamatérgico (LUDKA *et al.*, 2013).

Sendo assim, uma possível associação da atividade neuroprotetora e/ou antidepressiva da atorvastatina com uma determinada subunidade dos NMDAR ajudará na compreensão da fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação deste fármaco.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito neuroprotetor e tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos e identificar a dependência da composição de subunidade no receptor NMDA sobre esses efeitos.

2.2. Objetivos Específicos:

1. Avaliar a participação das subunidades GluN2A e GluN2B no efeito neuroprotetor da atorvastatina em fatias de hipocampo de camundongos submetidas à toxicidade do glutamato *ex vivo*;
2. Avaliar a participação dos receptores NMDA sinápticos e extra-sinápticos através da sua ativação com co-agonistas seletivos (D-serina e glicina) no efeito neuroprotetor da atorvastatina.
3. Avaliar a participação das subunidades GluN2A e GluN2B no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina em camundongos;

III. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos adultos (35-45 g) mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro/escuro (a partir das 7 horas), em caixas plásticas (15 animais por caixa) com água e ração *ad libitum*. Os protocolos para experimentos com animais foram projetados de forma que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e reduzindo ao máximo o número de animais sacrificados (protocolo PP955CEUA/UFSC).

3.2. Fármacos

Os animais receberam administrações de atorvastatina (0,01 e 1 mg/kg - Lipitor Atorvastatina, Pfizer®) por via oral (p.o.) e de ifenprodil (0,1; 0,5; 1 e 3 mg/kg - Sigma Aldrich®; GHASEMI *et al.*, 2010) por via intraperitoneal (i.p.). Os animais submetidos a análise comportamental receberam uma única dose de atorvastatina (0,01 mg/kg, dose sub-ativa para o efeito tipo-antidepressivo, segundo Ludka *et al.*, 2013) 60 minutos antes das análises comportamentais, enquanto os animais utilizados em experimentos *ex vivo* receberam uma dose diária por 7 dias consecutivos (1 e 10 mg/kg, doses sub-ativa e ativa, respectivamente para o efeito neuroprotetor, segundo Ludka *et al.*, 2013).

Os animais controles receberam água filtrada (p.o.) e solução salina (NaCl 0,9% i.p.) durante o mesmo período. Os tratamentos, tanto para as soluções de fármacos e solução de salina, foram administrados na dose de $10 \mu\text{L/g}$ de peso do animal. Nos experimentos *ex vivo* na incubação de fatias hipocâmpais foram utilizados: ifenprodil (5, 10 e 20 μM - Sigma Aldrich®), glicina (10 μM -Sigma Aldrich®; Constantino *et al.*, 2014), D-serina (30 μM - Sigma Aldrich®; Constantino *et al.*, 2014) e glutamato (10mM - USB®) todos dissolvidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato.

3.3. Avaliação *ex vivo* da atividade neuroprotetora da atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica

Atorvastatina, dose-subativa, (1 mg/kg) foi administrada via oral, durante 7 dias consecutivos e no oitavo dia os animais foram sacrificados por decapitação e seus hipocâmpos rapidamente removidos e mantidos

em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) constituído de NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM, gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para a preparação de fatias hipocâmpais. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C. Com o intuito de avaliar a participação da subunidade GluN2B as fatias foram pré-incubadas com ifenprodil (5, 10 ou 20µM) pelo período de 15 minutos.

O dano celular excitotóxico foi induzido através da incubação das fatias de hipocampo por 1 hora com glutamato (10 mM) (LUDKA *et al.*, 2012) em tampão KRB. Após este período, o meio foi substituído por meio de incubação composto de 50% de KRB, 50% meio de cultura de células DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), 20 mM de HEPES (pH 7.4) e 100 µg/mL de gentamicina (meio KRB/DMEM) e as fatias incubadas por 4 horas adicionais, para avaliação de redução da viabilidade celular induzida por glutamato (LUDKA *et al.*, 2012).

3.4. Avaliação de viabilidade celular

Ao final dos experimentos de indução de toxicidade glutamatérgica, a viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal tetrazolio solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (JOCOBSSON & FOWLER, 1999). Após o período de exposição à toxicidade glutamatérgica, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT a 37 °C pelo período de 20 minutos. A solubilização do formazam reduzido foi realizada pela adição de dimetil-sulfóxido (DMSO) e mantido sob agitação por 30 minutos. A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de ELISA (550 nm).

3.5. Avaliações comportamentais

3.5.1. Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)

Uma hora após administração da atorvastatina (0,01 mg/kg) e 15 minutos após a administração do ifenprodil (0,5 mg/kg, dose sub-ativa identificada neste estudo) os animais foram submetidos ao TSC (STERU *et al.*, 1985). Os camundongos isolados acústica e visualmente, foram

suspensos 50 cm acima do chão por uma fita adesiva e o seu tempo de imobilidade registrado durante 6 minutos (MANTOVANI *et al.*, 2003).

3.5.2. Teste do Campo Aberto (TCA)

Com a finalidade de excluir a possibilidade de um eventual efeito falso positivo, ou seja, uma redução no tempo de imobilidade causado pelo aumento da atividade locomotora no TSC, foi realizado um segundo teste comportamental, o Teste do Campo Aberto. O TCA foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas foi registrado durante período de 6 minutos (RODRIGUES *et al.*, 1996).

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da Análise de variância de uma via e duas vias (ANOVA), seguida dos testes Duncan ou Newman-Keuls. Os dados foram expressos como erro padrão da média. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Ensaio de viabilidade celular

Excitotoxicidade neural se refere aos danos celulares e à morte de neurônios devido a uma prolongada exposição ao glutamato e seu associado influxo de íons na célula e é um dos mecanismos fundamentais envolvidos em degeneração neuronal (DONG *et al.* 2009). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento contínuo por 7 dias da atorvastatina (10 mg/kg) em camundongos é capaz de prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica (LUDKA *et al.*, 2012). Para investigar a participação da subunidade GluN2B no efeito neuroprotetor da atorvastatina, fatias de hipocampo foram incubadas com o antagonista do NMDAR seletivo para a subunidade GluN2B, ifenprodil. Foi realizada uma curva de concentração em busca das concentrações efetivas e sub-ativas do ifenprodil frente à excitotoxicidade gerada por 10 mM de glutamato. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos com ifenprodil (5, 10 ou 20 μ M) e após esse período foi adicionado glutamato (10 mM) por uma hora, para indução de excitotoxicidade.

Conforme previamente demonstrado, glutamato 10 mM promoveu redução da viabilidade das fatias hipocampais. O ifenprodil *per se* não alterou significativamente a viabilidade celular, quando comparado ao grupo controle. Na presença de glutamato o ifenprodil preveniu parcialmente a redução da viabilidade celular causada pelo glutamato (Fig. 3). A concentração de ifenprodil 20 μ M foi utilizada para realização dos experimentos subsequentes.

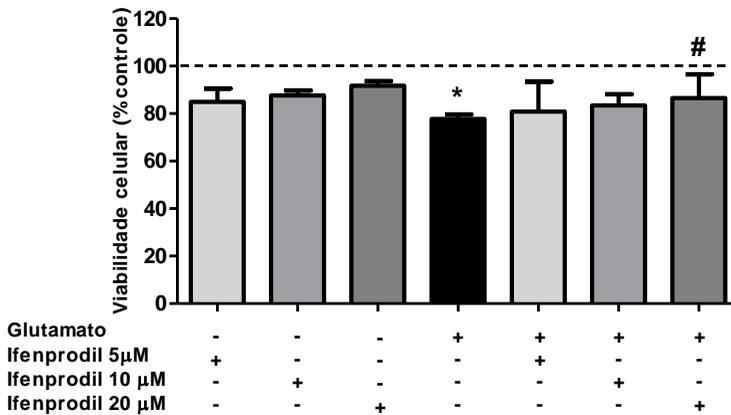


Figura 3. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de ifenprodil sobre a viabilidade celular frente à toxicidade de glutamato em fatias de hipocampo (*in vitro*). O efeito neuroprotetor de diferentes concentrações de ifenprodil (5, 10 ou 20 µM) incubadas por 15 minutos antes da adição de glutamato, incubado por 1 hora, foi analisado pelo método de redução do MTT. O grupo controle está representado pela linha pontilhada (100 %). Valores expressos como média + erro padrão (n= 3) * indica grupo significativamente diferente do controle. # indica grupo não diferente dos grupos Controle e Glutamato p<0,05 (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Estudo anterior de Ludka *et al.* (2016), identificou que o efeito neuroprotetor de atorvastatina só é obtido com o tratamento de 7 dias na dose de 10 mg/kg (p.o.), sendo que a dose de 1 mg/kg não promove efeito protetor. Com o objetivo de identificar um possível efeito somatório entre a atorvastatina e o ifenprodil (antagonista seletivo da subunidade GluN2B). Os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos com a dose sub-ativa para neuroproteção da atorvastatina (1 mg/kg, p.o.), os animais controle receberam veículo durante este mesmo período. No oitavo dia os animais foram sacrificados e os hipocampus foram dissecados, fatiados e incubados com ifenprodil 20 µM e glutamato 10 mM.

Os grupos atorvastatina e ifenprodil *per se* não apresentaram nenhuma alteração da viabilidade celular em relação ao grupo controle. A dose sub-ativa de atorvastatina e a concentração sub-ativa de ifenprodil *per se* não foram capazes de prevenir a morte celular induzida pelo glutamato. No entanto, o grupo que foi tratado *in vivo* com a dose sub-ativa de atorvastatina e *in vitro* com a concentração sub-ativa de

ifenprodil, apresentou um efeito somatório dos fármacos prevenindo a redução da viabilidade celular causada pela excitotoxicidade induzida pela glutamato (Fig. 4).

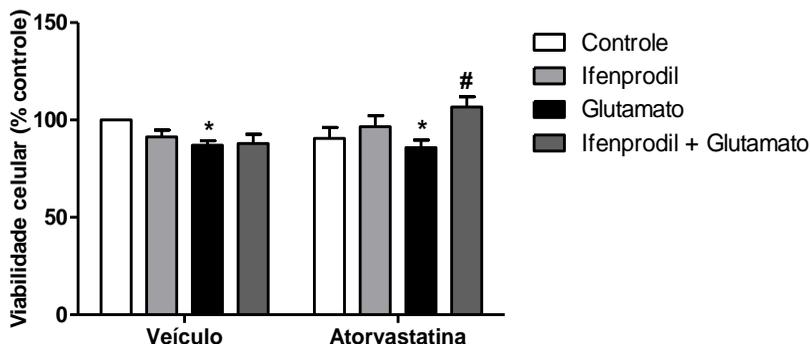


Figura 4. Envolvimento da subunidade GluN2B do receptor NMDA no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico da atorvastatina em camundongos. Análise *ex vivo* da viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com glutamato. Água filtrada ou atorvastatina (1 mg/kg) foram administradas por gavagem uma vez ao dia por 7 dias. Em fatias de hipocampo, ifenprodil (20 μ M) foi pré-incubado por 15 minutos antes da co-incubação com glutamato (10 mM) por 1 hora. O grupo controle foi considerado 100%. Valores expressos como média + erro padrão (n=8) * indica grupo significativamente diferente do controle, #indica grupo significativamente diferente do Glutamato $p < 0,05$. (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Já foi demonstrado que a ativação de NMDAR que apresentam a subunidade GluN2A induz aumento da expressão de BDNF produzindo condições ideais pra neuroplasticidade. No entanto, ativação da subunidade GluN2B bloqueia a expressão de BDNF resultado em morte celular (DUMAN, 2004). Sendo assim, foi avaliada a participação de receptores GluN2A e GluN2B no efeito neuroprotetor do tratamento da atorvastatina, através da utilização dos co-agonistas preferenciais destas subunidades, na avaliação de viabilidade das fatias hipocampais, *ex vivo*. Os animais foram tratados 7 dias com atorvastatina (10 mg/kg) e os animais controle receberam veículo nesse mesmo período. Para avaliação da participação da subunidade GluN2A fatias foram incubadas com seu co-agonista preferencial, D-serina. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos com D-serina (30 μ M – Constantino, 2014) e após esse período foi adicionado glutamato (10 mM) por uma hora.

Os animais tratados com veículo e que tiveram suas fatias incubadas com D-serina não apresentaram nenhuma alteração na viabilidade celular. No entanto, quando incubadas com glutamato e glutamato/D-serina apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$). Os animais tratados com atorvastatina não apresentaram alteração na viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Quando tiveram suas fatias incubadas com glutamato apresentaram neuroproteção, prevenindo a redução da viabilidade celular causada pela toxicidade glutamatérgica. No entanto, nas fatias hipocâmpais provenientes de animais tratados com atorvastatina e sendo estas as fatias incubadas com glutamato e D-serina, observou-se que o efeito protetor frente à toxicidade do glutamato foi parcial (Fig. 5).

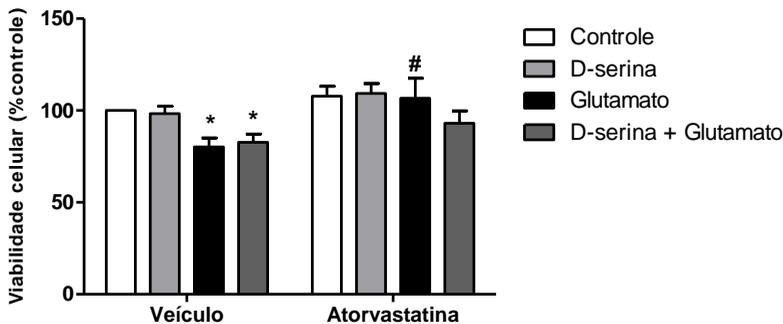


Figura 5. Envolvimento da subunidade GluN2A no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico de atorvastatina em camundongos. Análise *ex vivo* da viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com glutamato. Água filtrada ou atorvastatina (10 mg/kg) foram administradas por gavagem uma vez ao dia por 7 dias. Nas fatias de hipocampo, D-serina (10 μ M) foi pré-incubada por 15 minutos antes da co-incubação com glutamato (10 mM) por 1 hora. O grupo controle (linha pontilhada) foi considerado 100%. Valores expressos como média + erro padrão (n=7) * indica grupo estatisticamente diferente dos controles. # indica grupo estatisticamente diferente do grupo Glutamato, $p < 0,05$. (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Da mesma forma, para avaliar a participação da subunidade GluN2B as fatias de hipocampo foram incubadas com seu co-agonista preferencial, Glicina. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos com Glicina (10 μ M – Constantino, 2014) e após esse período o glutamato (10 mM) foi incubado por uma hora. Os animais tratados com veículo e suas

fatias incubadas com glicina não apresentaram nenhuma alteração na viabilidade celular. No entanto, quando incubadas com glutamato ou glutamato/glicina, apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$). Os animais tratados com atorvastatina não apresentaram alteração na viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Estes animais quando tiveram suas fatias incubadas com glutamato apresentaram neuroproteção, prevenindo a redução da viabilidade celular causada pela toxicidade glutamatérgica. No entanto, contrariamente ao observado com a D-serina (Fig. 5), nos animais tratados com atorvastatina e fatias incubadas com glicina e glutamato, foi observada completa proteção frente à toxicidade glutamatérgica (Fig. 6).

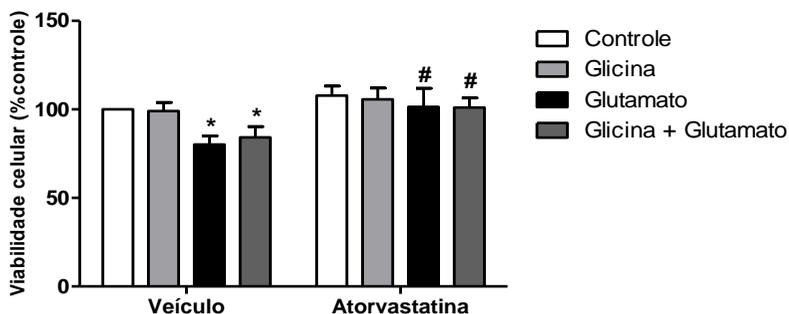


Figura 6. Envolvimento da subunidade GluN2B no efeito neuroprotetor do tratamento sub-crônico de atorvastatina em camundongos. Análise *ex vivo* da viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com glutamato. Água filtrada ou atorvastatina (10 mg/kg) foram administradas por gavagem uma vez ao dia por 7 dias. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas com Glicina (10 μ M) 15min antes da co-incubação com glutamato (10 mM) por 1 hora. O grupo controle foi considerado 100%. Valores expressos como média + erro padrão *indica grupo estatisticamente diferente do controle, # indica grupo estatisticamente diferente do grupo Glutamato, $p < 0,05$. (n=7) (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

4.2. Avaliações comportamentais

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram o efeito tipo-antidepressivo da administração aguda da atorvastatina (0,1 – 30 mg/kg, p.o.) no TSC e a participação de interação com os receptores NMDA neste efeito (Ludka *et al.*, 2012). Com o intuito de investigar qual subunidade dos NMDAR estariam envolvidas nesse efeito, foi

previamente realizada uma curva dose-resposta com tratamentos de ifenprodil (i.p.) 15 minutos antes da realização do teste de suspensão pela cauda.

O tratamento de ifenprodil com doses superiores a 3 mg/kg (10 e 20 mg/kg – POLESZAK *et al.*, 2013) apresentaram efeito sedativo nos animais, resultando num aumento excessivo do tempo de imobilidade e inviabilizando a análise comportamental (dados não mostrados).

O tratamento com ifenprodil nas doses 0,1, 0,5 e 1 mg/kg (GHASEMI *et al.*, 2010) não apresentou redução no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, sendo consideradas doses sub-ativas, enquanto que a dose de 3 mg/kg apresentou redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade (Fig. 7). Nenhuma das doses apresentou alteração na atividade locomotora no TCA ($p < 0,05$). A dose de ifenprodil 0,5 mg/kg foi escolhida como a dose sub-ativa para a realização dos experimentos subsequentes.

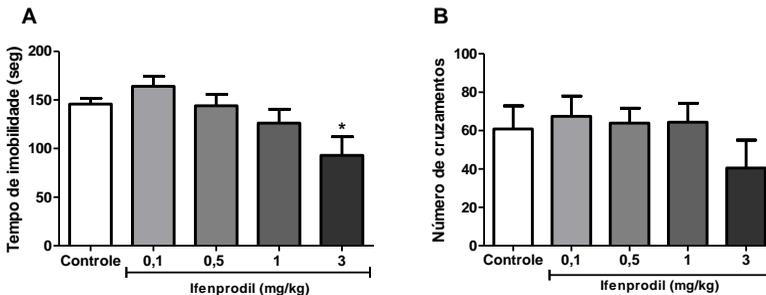


Figura 7. Efeito comportamental do tratamento agudo de diferentes doses de ifenprodil em camundongos no TSC. O efeito da administração de diferentes doses de ifenprodil (0,1, 0,5, 1 e 3 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B) em camundongos foi analisado. Valores expressos como média \pm erro padrão ($n=8$). *indica grupo significativamente diferentes do grupo controle. (F (4,32) = 4,089 $p < 0,05$) B. (F (3,29) = 76,65) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Para identificação da participação da subunidade GluN2B no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, os animais receberam uma administração aguda das doses sub-ativas de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.), conforme os estudos de Ludka *et al.* (2012) e ifenprodil (0,5 mg/kg). A atorvastatina foi administrada 1 hora antes das avaliações comportamentais, seguida do ifenprodil que foi administrado 15 minutos antes das análises. Não foi observado efeito somatório entre as doses sub-

ativas destes fármacos sobre o tempo de imobilidade no TSC, bem como na atividade locomotora dos animais no TCA (Fig. 8).

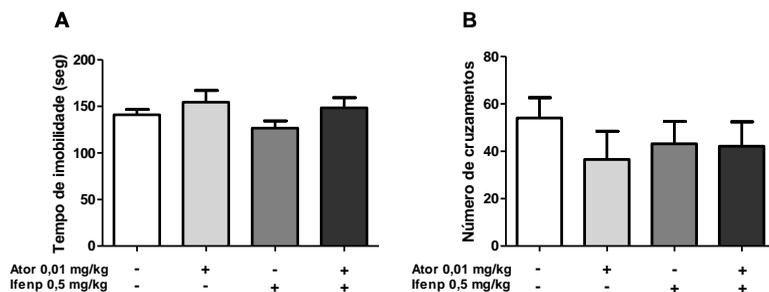


Figura 8. Envolvimento da subunidade GluN2B do receptor NMDA no efeito tipo-antidepressivo em camundongos no TSC. O efeito da coadministração aguda das doses sub-ativas de atorvastatina (0,01 mg/kg, p.o.) e ifenprodil (0,5 mg/kg, i.p. - antagonistas GluN2B) no tempo de imobilidade no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B) em camundongos. Valores expressos como média \pm erro padrão (n=7) A. (F 4,24) = $p > 0,05$) B. (F (3,29) = 142,76) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls).

V. DISCUSSÃO

Distúrbios no sistema de aminoácidos excitatórios, como o glutamato e agonistas glutamatérgicos endógenos podem contribuir para a patologia da depressão e outras síndromes neuropsiquiátricas, além de doenças neurodegenerativas (JAVITT *et al.*, 1990; DONG *et al.*, 2009). Estudos desde a década de 1990 tem apontado a relação entre glutamato e sua participação na fisiopatologia da depressão (TRULLAS & SKOLNICK, 1990). De acordo com Sanacora e colaboradores (2008) fármacos antidepressivos modulando o sistema glutamatérgico, elevaram as especulações sobre a participação deste sistema na fisiopatologia dos transtornos de humor. De acordo com McCarthy e colegas a ativação excessiva do sistema glutamatérgico seria uma das causas da depressão, levantando a hipótese de uma depressão dependente de glutamato. Sua hipótese se baseia, entre tantas outras, nas evidências de que alterações na homeostase e neurotransmissão glutamatérgica estão presentes fisiopatologia da depressão (HASHIMOTO *et al.*, 2009; PITTENGER *et al.*, 2007).

Estudo demonstrou a modulação do sistema glutamatérgico a partir do estímulo crônico por antidepressivos inibidores seletivos de receptação de serotonina (ISRS) em astrócitos (HERTZ *et al.* 2015). Além disto, foi demonstrada a participação da subunidade GluN2B no efeito antidepressivo da Fluoxetina, também um ISRS (VIZI *et al.* 2012). Desta forma, tem sido sugerido que a transmissão glutamatérgica contribui para a manutenção do tônus monoaminérgico. Estudos da última década têm apontado que fármacos que modulam a transmissão glutamatérgica são considerados como potenciais agentes antidepressivos (SANACORA *et al.*, 2008; DUMAN, 2014). Neste sentido, estudos em nosso grupo de pesquisa demonstraram o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina (Ludka *et al.*, 2013; 2014; 2016), um fármaco que além do seu efeito hipolipemiante, apresenta vários efeitos pleiotrópicos, que parecem depender da interação com receptores glutamatérgicos (GHANIZADEH & HEDAYATI, 2013). Também foi demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina depende da participação do sistema serotoninérgico, visto que animais tratados com atorvastatina e para-clorofenilalanina (PCPA), inibidor da triptofano hidroxilase (enzima marca-passo na via de síntese da serotonina, 5-HT), tiveram seu efeito tipo-antidepressivo bloqueado. Ainda, o pré-tratamento com antagonistas de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, WAY100635 e cetanserina, respectivamente, preveniram o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina no TSC (LUDKA *et al.*, 2014).

Além de demonstrar que atorvastatina apresenta efeito tipo-antidepressivo em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva de fármacos, Ludka e colaboradores (2016) demonstraram um efeito neuroprotetor da atorvastatina frente ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial causados pela excitotoxicidade glutamatérgica. Este mesmo efeito foi observado nos animais tratados com fluoxetina, que foi utilizada como um controle positivo por ser um antidepressivo clássico utilizado na clínica. Vizi e colaboradores (2012) demonstraram a relação do efeito antidepressivo da fluoxetina, com seu efeito neuroprotetor através da modulação de NMDAR, mais especificamente a subunidade GluN2B. Da mesma forma, nosso grupo demonstrou a importância dos NMDAR no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, visto que seu efeito foi prevenido pela administração de NMDA. Sendo assim, consideramos de grande importância a investigação da composição das subunidades dos NMDAR, principalmente da subunidade GluN2B no efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor da atorvastatina.

De acordo com Zhou & Sheng (2013), alterações na atividade dos NMDAR como alterações na atividade receptor-canal, expressão de subunidades e localização, podem contribuir para diversas condições neurológicas e psiquiátricas. O efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina está altamente correlacionado com sua atividade neuroprotetora, no entanto o efeito tipo-antidepressivo é observado agudamente (1 hora após a administração), ou com um tratamento sub-crônico de 7 dias (LUDKA *et al.*, 2012; 2016), enquanto que o efeito neuroprotetor só é observado com o tratamento de 7 dias (LUDKA *et al.*, 2012). Nosso grupo já demonstrou que este efeito neuroprotetor se dá por meio da redução de NO, ERO e na manutenção do potencial de membrana mitocondrial (LUDKA *et al.*, 2016), bem como do aumento na produção de BDNF e participação de receptores NMDA (LUDKA *et al.*, 2013).

Pesquisas demonstraram associação entre a sinalização de morte celular e a ativação da subunidade GluN2B (TERASAKI 2010; HARDINGHAM *et al.*, 2002). Desta forma, o desenvolvimento de antagonistas seletivos para a subunidade GluN2B, mais seletivos e com menos efeitos colaterais que o ifenprodil, torna-se importante para o tratamento de doenças no SNC (CHAZOT, 2004). De acordo com Falck e colaboradores (2014), a interação do ifenprodil com NMDAR resulta na redução do influxo de cálcio, ocasionando efeito neuroprotetor e anticonvulsivante. Com o intuito de investigar a participação desta subunidade no efeito neuroprotetor da atorvastatina, foi realizada uma curva de concentração em busca das doses ativas e sub-ativas de

ifenprodil (5 – 20 μM), os resultados demonstraram apenas proteção parcial da excitotoxicidade induzida por glutamato. Provavelmente, a identificação deste efeito parcial se dá porque ifenprodil bloqueia a ativação somente dos receptores que contem a subunidade NGlu2B em sua composição e sabe-se que o hipocampo apresenta tanto a composição GluN1-GluN2B, quanto GluN1-GluN2A (ZHOU & SHENG, 2013). A associação de doses sub-ativas de atorvastatina (*in vivo*) e ifenprodil (*ex vivo*) preveniu a redução na viabilidade celular induzida pela excitotoxicidade do glutamato. Estudos demonstraram a participação da subunidade GluN2B no efeito neuroprotetor da atorvastatina frente ao dano induzido por ácido quinolínico (agonista de GluN2B) (PIERMATIRI et al., 2009) e frente a isquemia focal-global em células corticais (GUTIERREZ-VARGAS et al., 2014). Corroborando com a literatura, nossos resultados evidenciam a participação da subunidade GluN2B no efeito neuroprotetor da atorvastatina frente à excitotoxicidade glutamatérgica. Segundo Kiss et al. (2012), o efeito terapêutico de um fármaco se dá através da contribuição de uma série de interações farmacológico, no entanto, devido ao seu papel fundamental em vias de morte celular, a inibição de subunidade GluN2B de NMDAR pode ser um importante mecanismo de neuroproteção e antidepressivo.

Tem sido sugerido que elevados níveis extra-sinápticos de glutamato podem resultar em danos celulares devido à ativação dos receptores de glutamato extra-sinápticos resultando em perturbações nas funções celulares e neurodegeneração (HARDINGHAM & BADING, 2010). A distribuição de NMDAR compostos pelas subunidades GluN2A e GluN2B não é similar, e em um cérebro adulto a subunidade GluN2A se concentra na região sináptica enquanto a GluN2B se concentra na região extra-sináptica (TRAYNELIS et al., 2010). Além da identificação da localização das subunidades do NMDAR, foi demonstrado que os NMDAR que expressam a subunidade GluN2B mostraram ter 10 vezes mais afinidade pela glicina do que os que expressam GluN2A, o qual apresenta maior afinidade pela D-serina (PAUL & DE BELLEROCHE, 2014).

Com o objetivo de avaliar a participação das subunidades GluN2A e GluN2B no efeito neuroprotetor da atorvastatina, fatias hipocámpais foram incubadas com glutamato na presença de seus co-agonistas, D-serina (30 μM) ou glicina (10 μM), respectivamente. Com esta estratégia, objetivamos induzir uma maior ativação das subunidades do NMDAR, através do aumento da concentração de seus co-agonistas preferencias *in vitro*. Os animais foram tratados por 7 dias consecutivos com a dose ativa da atorvastatina (10 mg/ Kg – Ludka et al. 2013) e seus

hipocampus foram incubados com os co-agonistas e glutamato para análise de viabilidade celular. Resultados demonstraram que o efeito neuroprotetor da atorvastatina frente à excitotoxicidade glutamatérgica é parcialmente prevenido na presença co-agonista da subunidade GluN2A de receptores, principalmente sinápticos, a D-serina (Fig. 5). Enquanto que na presença do co-agonista da subunidade GluN2B de receptores, principalmente, extra-sinápticos, glicina, o efeito neuroprotetor da atorvastatina é completamente mantido (Fig. 6). Sendo assim, podemos sugerir que a atorvastatina interage com e bloqueia a ativação da subunidade GluN2B dos NMDAR, quando esta é ativada pela presença de seu co-agonista preferencial, glicina.

Estudos têm sugerido que independente da sua localização, sináptica ou extra-sináptica, os NMDAR que apresentam a subunidade GluN2A atuam na sinalização de sobrevivência celular enquanto que a ativação da subunidade GluN2B resulta em aumento de apoptose neural (ZHOU & BAUDRY, 2006; TERASAKI 2010). Em concordância, quando ativada a subunidade GluN2B através da glicina, a atorvastatina foi capaz de prevenir totalmente a redução da viabilidade celular.

Modificações da transmissão sináptica, da neurogênese, da expressão gênica, e ainda a modulação de outros sistemas de neurotransmissores, exemplificam a extensa variedade de alvos farmacológicos dos antidepressivos (RACAGNI E POPOLI, 2008). Tizabi (2016) discute que grande maioria de antidepressivos atua por vias neuroprotetora, sendo seu efeito antidepressivo dependente da ação neuroprotetora. Estudos com cetamina, antagonista de NMDAR, demonstraram seu efeito antidepressivo, rápido e duradouro, de doses sub-anestésicas em pacientes depressivo, sendo este causado pelo aumento de BDNF plasmático (HAILE *et al.*, 2014). Foi observado ainda, o efeito neuroprotetor da cetamina frente à privação de oxigênio e glicose (EMNETT *et al.*, 2013). Estudos em nosso laboratório demonstraram o envolvimento do sistema serotoninérgico (LUDKA *et al.*, 2014), da via PI3K/AKT/GSK/mTOR (LUDKA *et al.*, 2016) e do sistema glutamatérgico (LUDKA *et al.*, 2013) no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina. Além disto, estudo com antagonistas do sítio de união da glicina em NMDAR demonstrou efeito tipo-antidepressivo em ratos (ZHU *et al.*, 2013) e que pacientes com depressão e transtorno bipolar apresentam uma diminuição significativa na densidade do sítio de união de glicina nos NMDAR (NUDMAMUD-THANOI & REYNOLDS, 2004). Adicionalmente, Preskorn e colaboradores (2008) evidenciaram o efeito antidepressivo de CP-101606, um antagonista seletivo da

subunidade GluN2B, em pacientes depressivos, considerando esses dados uma prova do efeito antidepressivo de antagonistas de GluN2B.

Para a avaliação da participação da subunidade GluN2B no efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, inicialmente foi realizada uma curva de dose-resposta para estabelecer a dose sub-ativa de ifenprodil, antagonista não competitivo da subunidade GluN2B. Foi selecionada a dose de 0,5 mg/kg (i.p.) como sub-ativa. Surpreendentemente, a coadministração de atorvastatina em dose sub-ativa (0,01 mg/kg, p.o., LUDKA *et al*, 2012) e de ifenprodil (0,5 mg/kg) avaliada no TSC não apresentou nenhuma alteração no tempo de imobilidade dos animais no TSC, bem como atividade locomotora no TCA.

Apesar de apresentar alta afinidade com a subunidade GluN2B (CHAZOT, 2004) estudos demonstraram que durante sua biotransformação, o ifenprodil pode ser convertido a diversos metabolitos secundários, resultando em uma baixa biodisponibilidade (FALCK *et al.*, 2014). Adicionalmente, seu efeito inibitório máximo ocorre 60 minutos após sua administração oral (30 mg/kg), em camundongos (SAITOH *et al.*, 1988). Dentre as doses de ifenprodil analisadas na curva dose-resposta a de 1 mg/kg apresentou efeito parcial na redução do tempo de imobilidade, porém, para a realização dos experimentos com atorvastatina foi selecionada a dose sub-ativa (0,5 mg/kg). Considerado a baixa biodisponibilidade do ifenprodil, é possível que esta dose selecionada pode não ter sido suficiente para manter a biodisponibilidade necessária para co-bloquear o NMDAR na presença da dose sub-ativa da atorvastatina. Além disto, considerando os dados prévios de Ludka *et al.*, (2014), demonstrando um bloqueio do efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina por NMDA e um efeito somatório com o antagonista de canal NMDAR ativado, MK-801, fica claro que seu efeito depende da interação com receptores NMDA. Estudos adicionais, utilizando outros antagonistas sintéticos da subunidade GluN2B e avaliando os efeitos dos co-agonistas D-serina e glicina *in vivo*, contribuirão para identificar se o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina também depende da interação com GluN2B.

Este conjunto de resultados mostra claramente que o efeito neuroprotetor da atorvastatina depende de sua interação (e bloqueio) da subunidade GluN2B dos NMDAR. Se esta mesma interação também medeia o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina, é um tema que ainda necessita comprovação experimental.

VI. CONCLUSÕES

- Ifenprodil na concentração de 20 μ M previne parcialmente a redução na viabilidade celular de fatias hipocâmpais induzida pela excitotoxicidade glutamatérgica.
- O tratamento sub-crônico de atorvastatina em sua dose sub-ativa (1 mg/kg, p.o.) apresentou efeito somatório com o tratamento de ifenprodil em sua concentração sub-ativa *in vitro*, prevenindo a excitotoxicidade induzida por glutamato.
- A incubação com o co-agonista da subunidade GluN2A, D-serina, aboliu parcialmente a neuroproteção induzida pelo tratamento como atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica.
- A incubação com o co-agonista da subunidade GluN2B, glicina, não alterou a neuroproteção induzida pela atorvastatina frente à toxicidade glutamatérgica.
- A administração de ifenprodil (3mg/kg, i.p.) apresentou redução no tempo de imobilidade de camundongos no TSC.
- A co-administração de atorvastatina e ifenprodil em suas doses sub-ativas não apresentou redução no tempo de imobilidade de camundongos no TSC.

VII. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da co-administração de atorvastatina em sua dose sub-ativa em conjunto com ifenprodil (1 mg/kg, i.p.) em dose cujo o efeito no TSC foi parcial.
- Avaliar o efeito da administração dos co-agonistas, D-serina e glicina, em conjunto com o tratamento da atorvastatina no TSC e TCA.
- Identificar se o bloqueio (ou ativação) da subunidade GluN2B interfere com os mecanismos de neuroproteção induzidos pela atorvastatina, como a redução dos níveis de ROS e NO, alteração no potencial de mitocôndria e liberação de glutamato, eventos induzidos pela toxicidade glutamatérgica

VIII. ARTIGOS PUBLICADOS EM COAUTORIA DURANTE A REALIZAÇÃO DE ESTÁGIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA:

LUDKA, F.K.; CONSTANTINO, L.C.; DAL-CIM, T.; BINDER, L.B.; ZOMKOWSKI, A.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C. I. Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β and mTOR in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice. **Journal of Psychiatric Research**, 2016.

LUDKA, F.K.; KUMINEK, G.; BINDER, L.B.; ZOWKOWSKI, A.D.E.; CUNHA, M.P.; DAL-CIM, T.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice. **Biochemistry and Behavior**. v. 122, p. 254-260, 2014.

LUDKA, F.K.; DAL-CIM, T.; BINDER, L.B.; CONSTANTINO, L.C.; MASSARI, C.; TASCA, C.I. Atorvastatin and Fluoxetine prevent oxidative stress and mitochondrial dysfunction evoked by glutamate toxicity in hippocampal slices. **Mol Neurobiol**. p. 1-13, 2016.

LOSS, C.M.; BINDER, L.; MUCCINI, E.; MARTINS, W.C.; DE OLIVEIRA, P.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; PREDIGER, R.D. ; TASCA, C. I. ; ZIMMER, E.R. ; COSTA-SCHMIDT, L.E.; DE OLIVEIRA, D.L.; VIOLA, G.G. Influence of environmental enrichment vs. time-of-day on behavioral repertoire of male albino Swiss mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 125, p. 63-72, 2015.

VIOLA, G. G. ; BINDER, L.B. ; MUCCINI, E. ; MARTINS, W.C.; CRISTALDO, P. F. ; TASCA, C.I. ; VANDRESEN-FILHO, S. Environmental enrichment condition does not alter glutamine synthetase activity in the hippocampus and cerebral cortex of swiss albino mice. **Journal of Systems and Integrative Neuroscience**, v. 1, p. 29-32, 2015.

IX. REFERÊNCIAS

BETTIO, L.E.B.; CUNHA, M.P.; BUDNI, J.; PAZINI, F.L.; OLIVEIRA, A.; COLLA, A.R.; RODRIGUES, A.L.S. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behavioural Brain Research**, v. 234, p. 137-148, 2012.

CASTRO, A.A.; WIEMES, B.P.; MATHEUSM, F.C.; LAPA, F.R.; VIOLA, G.G.; SANTOS, A.R.; TASCA, C.I.; PREDIGER, R.D. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Res.** v. 1513, p. 103-116, 2013

CHAZOT, P.L. The NMDA Receptor NR2B Subunit: A Valid Therapeutic Target for Multiple CNS Pathologies. **Current Medicinal Chemistry**, n. 11, p. 389-396, 2004. doi: 0929-8673/04

COLLINS, P.Y.; PATEL, V.; JOESTL, S.S.; MARCH, D.; INSEL, T.R.; DAAR, A.S.; ANDERSON, W.; DHANSAY, M.A.; PHILLIPS, A.; SHURIN, S.; WALPORT, M.; EWART, W.; SAVILL, S.J.; BORDIN, I.A.; COSTELLO, E.J.; DURKIN, M.; FAIRBURN C.; GLASS, R.I.; HALL, W.; HUANG, Y.; HYMAN, S.E.; JAMISON, K.; KAAYA, S.; KAPUR, S.; KLEINMAN, A.; OGUNNIYI, A.; OTERO-OJEDA, A.; POO, M.M.; RAVINDRANATH, V.; SAHAKIAN, B.J.; SAXENA, S.; SINGER, P.A.; STEIN, D.J. Scientific Advisory Board and the Executive Committee of the Grand Challenges on Global Mental Health: Grand challenges in global mental health. **Nature** v. 475, p. 27-30, 2011.

CONSTANTINO, L.C. **Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA)**. 2014. 174 f. Tese (Doutorado) - Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014

COVINGTON, H.E.; VIALOU, V.; NESTLER, E.J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 683-693, 2010.

COYLE, J.T.; LESKI, M.; MORRISON, J.H. The diverse roles of l-glutamic acid in brain signal transduction *In*: DAVIS, L.; CHARNEY,

D.; COYLE, J.T.; NEMEROFF, C. (Eds.), **Neuropsychopharmacology - The Fifth Generation of Progress**, p. 71–90, 2002.

DONG, X.X.; WANG, Y. & QIN, Z.H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin.** v. 30, n. 4, p. 379-87, 2009.

DUMAN, R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med.** v. 5, p. 11-25, 2004.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n.3, p. 435-451, 2004.

EMNETT, C.M.; EISENMAN, L.N.; TAYLOR, A.M.; IZUMI, Y.; ZORUMSKI, C.F.; MENNERICK, S. Indistinguishable synaptic pharmacodynamics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine and ketamine. **Mol Pharmacol**, v. 84, n. 6, p. 935–947, 2013.

EWA POLESZAK, E.; WOŚKO, S.; SEREFKO, A.; SZOPA, A.; WLAŹ, A.; SZEWCZYK, B.; NOWAK, G.; WLAŹ, P. Effects of ifenprodil on the antidepressant-like activity of NMDA ligands in the forced swim test in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, n. 46, p. 29–35, 2013.

FALCK, E.; BEGROW, F., VERSPOHL, E., WÜNSCH, B. Metabolism studies of ifenprodil, a potent GluN2B receptor antagonist. **J Pharm Biomed Anal**, v. 88, p. 96–105, 2014.

FRANGOU, S. Functional neuroimaging in mood disorders. **Psychiatry**. v. 5, p. 176-179, 2006.

GHANIZADEH, A. & HEDAYATI, A. Augmentation of fluoxetine with lovastatin for treating major depressive disorder, a randomized double-blind placebo controlled-clinical trial **Depression and Anxiety**, v. 30, p. 1084–1088, 2013.

GHASEMI, M.; RAZA, M. & DEHPOUR, A.R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. **J Psychopharmacol**, v.24, p. 584-594, 2010.

GINSBERG, S.D.; HEMBY, S.E.; SMILEY, J.F. Expression profiling in neuropsychiatric disorders: Emphasis on glutamate receptors in bipolar disorder. **Pharmacol Biochem Behav**. v.100, p.705-711, 2011.

HAILE, C.N.; MURROUGH, J.W.; IOSIFESCU, D.V.; CHANG, L.C.; AL JURDI, R.K.; FOULKES, A.; IQBAL, S.; MAHONEY, J.J.; DE LA GARZA, R.; CHARNEY, D.S.; NEWTON, T.F.; MATHEW, S.J. Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, n. 17, p.331-336, 2014.

HARDINGHAM, G.E. & BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, n. 11, p. 682-696, 2010.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Research Reviews**, v. 61, n.2, p. 105-123, 2009.

HASSEL, B.; DINGLELINE, R. Chapter 15. Glutamate. *In*: SIEGEL, G.J.; ALBERS, R.W.; ST BRADY, S.T.; PRICE, D.L. (Eds.), Basic Neurochemistry Molecular, Cellular, and Medical Aspects. **Elsevier Academic Press**, ed. 7, cap. 15, p. 267-290, 2006

HARDINGHAM, G.E. & BADING, H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. **Biochim Biophys Acta**. v. 1600, p.148-53, 2002.

HENNEBERGER, C.; BARD, L.; KING, C.; JENNINGS, A.; RUSAKO, D.A. NMDA Receptor Activation: Two Targets for Two Co-Agonists. **Neurochem Res**. v. 38, p. 1156-1162, 2013.

HERTZ, L.; ROTHMAN, D.L.; LI, B.; PENG, L. Chronic SSRI stimulation of astrocytic 5-HT_{2B} receptors change multiple gene expressions/editings and metabolism of glutamate, glucose and glycogen: a potential paradigm shift. **Front Behav Neurosci**. v. 9, p. 25, 2015.

JAVITT, D.C. & ZUKIN, S.R. The role of excitatory amino acids in neuropsychiatric illness. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, n. 2, p. 44–52, 1990.

KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K.R.; RUSH, A.J.; WALTERS, E.E.; WANG, P.S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095–3105, 2003.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

KILIC, F.S.; OZATIK, Y.; KAYGISIZ, B.; BAYDEMIR, C.; EROL, K. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. **Neurosciences (Riyadh)**, v, 17, n. 1, p. 39-43, 2012.

KING, S. The Best Selling Drugs Since 1996 - Why AbbVie's Humira Is Set To Eclipse Pfizer's Lipitor. **FORBES**. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/simonking/2013/07/15/the-best-selling-drugs-since-1996-why-abbvies-humira-is-set-to-eclipse-pfizers-lipitor> > Acesso dia 01/05/2016.

KISS, J.P.; SZASZ, B.K.; FODOR, L.; MIKE, A.; LENKEY, N.; KURKÓ, D.; NAGY, J.; VIZI, E.S. GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. **Neurochem Int**, v. 60, p. 170-176, 2011.

KRYSTAL, J.H.; SANACORA, G. & DUMAN, R.S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. **Biol Psychiatry** 15; v. 73, n. 12, p. 1133–1141, 2013.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: Glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectrums**, v.10, p.808-819, 2005.

LAI, T.W.; SHYU, W.C.; WANG, Y.T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. **Trends Mol. Med.** 17, p. 266-275, 2011.

LANNI, C.; GOVONI, E.S.; LUCHELLI, E.A.; BOSELLI, E.C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.2985–3008, 2009.

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

LUDKA, F.K.; CONSTANTINO, L.C.; DAL-CIM, T.; BINDER, L.B.; ZOMKOWSKI, A.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Involvement of PI3K/Akt/GSK-3B and mTOR in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice. **Journal of psychiatric research**, 2016.

LUDKA, F.K.; DAL-CIM, T.; BINDER, L.B.; CONSTANTINO, L.C.; MASSARI, C.; TASCA, C.I. Atorvastatin and Fluoxetine prevent oxidative stress and mitochondrial dysfunction evoked by glutamate toxicity in hippocampal slices. **Mol Neurobiol**. p. 1-13, 2016.

LUDKA, F.K.; KUMINEK, G.; BINDER, L.B.; ZOMKOWSKI, A.D.E.; CUNHA, M.P.; DAL-CIM, T.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice. **Biochemistry and Behavior**. v. 122, p. 254-260, 2014.

LUDKA, F.K.; ZOMKOWSKI, A.D.E.; CUNHA, M.P. DAL-CIM, T.; ZENI, A.L.B.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **European Neuropsychopharmacology**. v. 23, p. 400-412, 2013.

LUDKA, F.K. **Avaliação da associação entre o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina em camundongos**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MCCARTHY, D.J., ALEXANDER, R.; SMITH, M.A.; PATHAKA, S.; KANESA, S.; LEEB, C.M. SANACORA G., PAOLETTI, P. Glutamate-based depression GBD Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. **Eur. J. Neurosci**. n. 33, 1351-1365, 2011.

MACHADO-VIEIRA, R.; YUAN, P.; BRUTSCHE, N.; DIAZGRANADOS, N.; LUCKENBAUGH, D.; MANJI, H.K.; ZARATE, C.A. Jr. Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. **J.Clin. Psychiatry**, v. 70, p. 1662-1666, 2009

MAENG, S.; ZARATE, C.A. JR.; DU, J.; SCHLOESSER, R.J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G.; MANJI, H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349-352, 2007.

MANTOVANI, M.; PÉRTILE, R.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A. L. S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci. Lett.** v. 343, p. 1-4, 2003.

MARTINS, W.C.; DOS SANTOS, V.V.; DOS SANTOS, A.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; DAL-CIM, T.A.; DE OLIVEIRA, K.A.; MENDES-DE-AGUIAR, C.B.; FARINA, M.; PREDIGER, R.D.; VIOLA, G.G.; TASCA, C.I. Atorvastatin Prevents Cognitive Deficits Induced by Intracerebroventricular Amyloid- β 1-40 Administration in Mice: Involvement of Glutamatergic and Antioxidant Systems. **Neurotox Res.** 28, p. 32-42, 2015.

MAURI, M.C.; FERRARA, A.; BOSCATI, L.; BRAVIN, S.; ZAMBERLAN, F.; ALECCI, M.; INVERNIZZI, G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 3, p.124-129, 1998.

MIIDA, T.; TAKAHASHI, A.; IKEUCHI, T. Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. **Pharmacol Ther**, v. 113, p. 378-393, 2007.

MITANI, H., SHIRAYAMA, Y., YAMADA, T., MAEDA, K., ASHBY JR., C.R., KAWAHARA, R., Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** n. 30, p. 1155-1158. 2006.

MOGHADDAM, B.; JAVITT, D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. **Neuropsychopharmacology**. V.37, p.4-15, 2012.

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

NUDMAMUD-THANOI, S. & REYNOLDS, G.P. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. **Neurosci Lett**. v. 30, n. 372, p. 173-7, 2004.

NUNO A.L.; PEREIRA, M. & SANTOS, M.M. Antagonistas do Receptor NMDA: três décadas de evolução no combate às doenças neurodegenerativas. **SPQ Química**, p. 55, 2014.

NUDMAMUD-THANOI, S.; REYNOLDS, G.P. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. **Neurosci Lett**. v.30, p.173-177, 2004

PAPOUIN, T.; PÊCHE, L.L.; RUEL, J.; SACCHI, S.; LABASQUE, M.; MARWA HANINI, M.; GROC, L.; POLLEGIONI, L.; MOTHET, J.P.; OLIET, S.H.R. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. **Cell**. v. 150, p. 633-646, 2012.

PAUL, P. & DE BELLEROCHE, J. The role of D-serine and glycine as co-agonists of NMDA receptors in motor neuron degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Front Synaptic Neurosci**.16, p. 6-10, 2014

PAUL, I.A.; NOWAK, G.; LAYER, R.T.; POPIK, P.; SKOLNICK, P. Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. **J Pharmacol Exp Ther**, n. 269, p. 95-102, 1994.

PIERMARTIRI, T. C. B.; FIGUEIREDO, C. P.; RIAL, D.; DUARTE, F. S.; BEZERRA, S. C.; MANCINI, G.; DE BEM, A. F.; PREDIGER, R. D. S.; TASCA, C. I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40

administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v.226, n.2, p. 274–284, 2010.

PIERMARTIRI, T.C.B.; VANDRESEN FILHO S.; HERCULANO, B.A.; MARTINS, W.C.; DAL'AGNOLO, D.; STROECH, E.; CARQUEJA, C.L.; BOECK, C.R. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt-phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox Res**, 16, p. 106-115, 2009

PITTENGER, C.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J.H.; The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 6, p. 101–15, 2007.

POLESZAK, E.; WOŚKO, S.; SEREFKO, A.; SZOPA, A.; WLAŹ, A.; SZEWCZYK, B.; NOWAK, G.; WLAŹ, P. Effects of ifenprodil on the antidepressant-like activity of NMDA ligands in the forced swim test in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.46, p. 29-35, 2013.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B.; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**. v. 13, n. 1, p. 22–37, 2013.

PRESKORN, S.H.; BAKER, B.; KOLLURI, S. et al. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. **J Clin Psychopharmacol**, n. 28, p. 631-7, 2008.

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

RADER D. J. Therapy to reduce the risk of coronary heart disease. **Clin. Cardiol**. v. 26, p. 28, 2003.

RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; KIRSCH, T.R.; *et al.* Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in

rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? **Brain Res Bull**, n. 81, p. 585-589, 2010.

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

ROGÓZ, Z.; SKUZA, G.; MAJ, J.; DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p.1024-30, 2002.

SAITOH, K.; MANABE, T.; IRINO, O. The mode for the manifestation of the inhibitory effects of ifenprodil tartrate on platelet aggregation in vivo and ex vivo. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, n. 91, p. 105-109, 1988.

SANACORA, G.; TRECCANI, G. & POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**. 1, p. 63-77, 2011

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSZAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, p. 426-437, 2008.

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

SCHWARTZ, G.G.; OLSSON, A.G.; EZEKOWITZ, M.D.; GANZ, P.; OLIVER, M.F.; WATERS, D.; ZEIHNER, A.; CHAITMAN, B.R.; LESLIE, S.; STEM, T.; for the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. **JAMA**, n. 285, p.1711-1718, 2001.

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

SHITARA, Y. & SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p.71-105, 2006.

SKOLNICK P, POPIK P, TRULLAS R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on **Trends Pharmacol Sci**. 11, p. 563-569, 2009.

SMITH, K. Trillion-dollar brain drain. **Nature**, v. 15, p. 478, 2011.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**. v. 85, p.367-370, 1985.

STONE, T.W. & ADDAE, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol.**, 447, p. 285-96, 2002.

TERASAKI, Y.; SASAKI, T.; YAGITA, Y.; OKAZAKI, S.; SUGIYAMA, Y.; OYAMA, N.; OMURA-MATSUOKA, E.; SAKODA, S.; KITAGAWA, K.; Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling. **J Cereb Blood Flow Metab.** 8, p. 1441-1449, 2010.

TIZABI, Y. Duality of Antidepressants and Neuroprotectants. **Neurotox Res**, n. 30, p.1–13 DOI 10.1007/s12640-015-9577-1, 2016.

TRIVEDI, M.H. Major depressive disorder: remission of associated symptoms. **J Clin Psychiatry**, v. 6, p. 27-32, 2006.

TRAYNELIS, S.P.; WOLLMUTH, L.P.; MCBAIN, C.J.; MENNITI, F.S.; VANCE, K.M.; OGDEN, K.K.; HANSEN, K.B.; YUAN, H.; MYERS, S.J.; DINGLEDINE, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. **Pharmacol Rev**, 62, p. 405-496, 2010.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 355-367, 2007.

VIZI, E.S.; KISFALI, M.; LORINCZ, T. Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. **Brain Res Bull**, v. 93, p. 32-38, 2013.

WHO. Pharmacological treatment of mental disorders in primary health care. **World Health Organization**. France, 2009.

WYLLIE, D.J.A.; LIVESEY, M.R.; HARDINGHAM, G.E. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, n, 74, p. 4-17, 2013.

YOUNG-XU, Y.; CHAN, K.A.; LIAO, J.K.; RAVID, S.; BLATT, C.M. Long-term statin use and psychological well-being. **J Am Coll Cardiol**. v.20, p.690-697, 2003.

YOSHIDA, M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 10, p. 140-144, 2003.

ZARATE JR., C.A.; SINGH, J.B.; CARLSON, P.J.; BRUTSCHE, N.E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D.A.; CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 63, p. 856-864, 2006.

ZOMKOWSKI, A.D.; ENGEL, D.; GABILAN, N.H.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2010.

ZHANG, L.; XU, T.; WANG, S.; YU, L.; LIU, D.; ZHAN, R.; YU, S.Y. NMDA GluN2B receptors involved in the antidepressant effects of curcumin in the forced swim test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.10, n. 40, 2013.

ZHOU, Q. & SHENG, M. NMDA receptors in nervous system diseases. **Neuropharmacology**, 74, p. 69-75, 2013.

ZHOU, M. & BAUDRY, M. Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. **J Neurosci**. 26, p. 2956-2963, 2006.

ZHU, W.L.; WANG, S.J.; LIU, M.M.; SHI, H.S.; ZHANG, R.X.; LIU, J.F.; DING, Z.B.; LU, L. Glycine site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 7-CTKA produces rapid antidepressant-like effects in male rats. **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, n. 5, p. 306-16, 2013.