

Wagner Carbolin Martins

**Estudo do Efeito da Atorvastatina sobre Alterações
Comportamentais e Bioquímicas em Camundongos Infundidos com
o Peptídeo β -amilóide ($A\beta_{1-40}$)**

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

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

Coorientador: Dr. Giordano Gubert Viola

Florianópolis
2012

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

M386e Martins, Wagner Carbolin
Estudo do efeito da atorvastatina sobre alterações
comportamentais e bioquímicas em camundongos infundidos com
o peptídeo β -amilóide ($A\beta_{1-40}$) [dissertação] / Wagner Carbolin
Martins ; orientadora, Carla Inês Tasca. - Florianópolis, SC,
2012.

70 p.: grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Peptídeos. 3. Memória. 4.
Aprendizagem. 5. Estresse Oxidativo. 6. Agentes
Neuroprotetores. I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

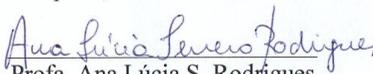
CDU 612.82

WAGNER CARBOLIN MARTINS

**“ESTUDO DO EFEITO DA ATORVASTATINA SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS
EM CAMUNDONGOS INFUNDIDOS COM O PEPTÍDEO
 β -AMILÓIDE ($A\beta_{1-40}$)”**

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

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2012.

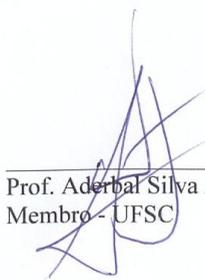


Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:—



Profa. Carla Inês Tasca
Orientadora – UFSC



Prof. Aderbal Silva A. Júnior
Membro - UFSC



Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



Prof. Rodrigo Bainy Leal
Membro-UFSC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, meu pai, Múcio Martins, minha querida mãe Margareth e minha irmã Lizia por todo o amor e apoio durante todos esses anos de minha vida.

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

Ao meu coorientador, Giordano (Giorgio) Gubert Viola, pelo apoio e ajuda neste trabalho e principalmente por me aturar durante longas jornadas diárias para a realização do mesmo.

Ao Samuel, Tharine, Karen, Vanessa e Alessandra, que também foram de grande ajuda durante este projeto, além de grandes amigos para todas as horas (ou não hehe).

Aos meus amigos, Gianni, Paulinho, Tholita pelos churrascos passados e pelos muitos outros que estão por vir.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos aqueles que não atrapalharam o andamento deste trabalho. Foi corrido, foi difícil, mas chegou ao fim. Taberneira, traga o gim.

.
. .
. .
. .
. .
. .
. .
. .
. .
. .

Stay Heavy For All Eternity

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurológica que afeta grande parte da população mundial. É caracterizada por perda de memória, demência progressiva, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras e consistem em duas particularidades conhecidas atualmente: formação de placas β -amilóide ($A\beta$) e (2) emaranhados neurofibrilares. Dados do nosso laboratório mostraram que o tratamento com atorvastatina (10mg/kg) durante 7 dias após a infusão de $A\beta$ protege contra a morte neuronal. A atorvastatina promove um aumento na expressão dos transportadores de glutamato GLAST e GLT-1, embora não apresente alteração na captação de glutamato e melhora no déficit cognitivo causado pela $A\beta$. O objetivo deste estudo foi avaliar se um tratamento com atorvastatina durante 7 dias antes da infusão de $A\beta$ apresenta alterações na perda de memória cognitiva e parâmetros do sistema glutamatérgico, colinérgico e atividades de enzimas antioxidantes. Camundongos albinos Swiss machos adultos (3 meses/ 40–50g) foram pré-tratados com atorvastatina 10 mg/kg/dia, oralmente, ou veículo (solução salina, 0,9%) durante 7 dias. No sétimo dia a forma agregada de $A\beta_{1-40}$ (i.c.v., 400pmol/sítio) ou PBS (veículo) foi administrada. No dia 21, os animais foram submetidos à tarefa de realocação de objetos e labirinto aquático de Morris e depois mortos para a análise bioquímica. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do Teste de Newman-Keuls. Na tarefa de realocação de objetos (n=14-21) animais pré-tratados com atorvastatina apresentaram melhora na cognição quando comparados aos animais $A\beta$ tanto nos treinos quanto nas sessões de teste. Na captação de glutamato a atorvastatina não reverte a diminuição da captação promovida pela $A\beta$ no hipocampo, já a liberação, a atividade da GS e da AChE não apresentaram qualquer alteração entre os grupos. Nas análises das atividades das enzimas GR e GPx a atorvastatina reverteu um aumento na atividade de ambas no córtex pré-frontal induzida pela $A\beta$. Na região hipocampal somente a GR teve alteração, sendo que a atorvastatina aumentou a atividade enzimática em relação aos outros grupos. Estes resultados indicam que a atorvastatina pode ter um papel na melhora dos déficits de memória e aprendizado de animais infundidos com $A\beta$, provavelmente devido a uma neuroproteção exercida pela droga e efeitos relacionados à diminuição da produção ou aumento do sequestro de radicais livres.

Palavras-chave: atorvastatina, peptídeo β -amilóide, memória espacial e aprendizado, transmissão glutamatérgica, stress oxidativo, neuroproteção.

ABSTRACT

Amyloid-beta ($A\beta$) peptides' deposition into specific encephalic structures has been pointed as an important event related to Alzheimer's disease (AD) pathogenesis and such deposits have been associated with the activation of glial cells, neuroinflammation, oxidative responses and cognitive deficits. $A\beta$ -induced pro-oxidative damage may down-regulate the activity of glutamate transporters, thus leading to reduced glutamate uptake and, as consequence, excitotoxic events. Herein, we evaluated the effects of the pretreatment of atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, in behavioral and biochemical alterations induced by a single intracerebroventricular (i.c.v.) injection of aggregated $A\beta_{1-40}$ in mice. Atorvastatin (10 mg/kg/day v.o.) was administered through 7 consecutive days before $A\beta_{1-40}$ administration (single i.c.v. injection, 400 pmol per mouse). $A\beta_{1-40}$ administration caused a significant cognitive impairment in the object-place recognition task (2 weeks after the i.c.v. injection) and this phenomenon was abolished by atorvastatin pretreatment. Although hippocampal glutamine synthetase (GS) activity were not changed by $A\beta_{1-40}$ administration, a significant decrease of glutamate uptake was observed in $A\beta_{1-40}$ -exposed mice. Atorvastatin, which decreased hippocampal glutamate uptake *per se*, did not change the effects of $A\beta_{1-40}$ on glutamate uptake. However, $A\beta_{1-40}$ treatment significantly increased the cerebrocortical activities of glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) and these events were blunted by atorvastatin pretreatment. These results extend the notion of the potential neuroprotective action of atorvastatin against the neuronal toxicity induced by $A\beta_{1-40}$ demonstrating that a pretreatment with atorvastatin prevents the spatial learning and memory deficits induced by $A\beta$ peptide in rodents and promote changes in glutamatergic system in hippocampus and antioxidant system in prefrontal cortex.

Keywords: atorvastatin, amyloid- β peptide, spatial learning and memory, glutamate transmission, oxidative stress, neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da sequência dos procedimentos experimentais	36
Figura 2. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre (A) tarefa de realocação de objeto e (B) tempo total gasto na exploração de ambos os objetos	44
Figura 3. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a tarefa do labirinto aquático de Morris, sendo (A) latência de chegada à plataforma (B) idas ao quadrante correto e (C) tempo no quadrante correto	46
Figura 4. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo	47
Figura 5. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo	48
Figura 6. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a atividade de glutamina sintetase em fatias de hipocampo	48
Figura 7. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$	49
Figura 8. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da glutatona redutase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$	50
Figura 9. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da glutatona peroxidase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β : β -amilóide

AChE: Acetilcolinesterase

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

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora do peptídeo β -amilóide

COX-2: Ciclooxygenase-2

DA: Doença de Alzheimer

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione redutase

GS: Glutamina sintetase

HBSS: Solução salina balanceada de Hank

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

i.c.v.: Intracerebroventricular

IL-6: Interleucina-6

IL-1 β : Interleucina-1 β

KA: Ácido Caínico

KRB: Krebs-Ringer bicarbonato

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

PBS: Tampão de fosfato salina

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

RO: Realocação de objetos

SNC: Sistema nervoso central

v.o.: via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	21
1.2 GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE	24
1.3 ACETILCOLINA	25
1.4 TRATAMENTO E MODELOS ANIMAIS	26
1.5 ATORVASTATINA	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 ANIMAIS	35
4.2 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	35
4.3 TAREFA DE REALOCAÇÃO DE OBJETO	36
4.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	37
4.5 PREPARAÇÃO E INCUBAÇÃO DAS FATIAS DE HIPOCAMPO	38
4.6 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	38
4.7 LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO	38
4.8 GLUTAMINA SINTETASE	39
4.9 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS	39
4.10 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)	40
4.11 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	40
4.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	40
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	59
PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurológica que afeta grande parte da população mundial. É caracterizada por perda de memória, demência progressiva, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Foi descrita inicialmente em 1906, pelo médico alemão Alois Alzheimer, que viria mais tarde descrever também os aspectos histopatológicos da doença, que consistem em duas particularidades conhecidas atualmente: (1) formação de placas senis promovidas pela agregação de peptídeos β -amilóide ($A\beta$) e (2) emaranhados neurofibrilares induzidos pela hiperfosforilação da tau, proteínas associadas aos microtúbulos (Grundke-Iqbal et al., 1986; Haass & Selkoe, 2007). Ainda não se conhece todo o mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo $A\beta$. A deposição dos peptídeos $A\beta$ e a ativação de células gliais ao redor das placas senis em áreas cerebrais envolvidas em funções cognitivas, parecem ser os responsáveis pelo início de uma cascata de eventos que resultam em disfunção e perda sináptica, levando a subsequente morte neuronal (Walsh & Selkoe, 2004).

Essa doença é resultante de uma combinação de fatores ambientais e genéticos. A forma esporádica da doença representa cerca de 90-95% dos casos, onde estão envolvidos principalmente o avanço da idade, ocorrendo geralmente após os 65 anos (Poirier, 2005), bem como fatores externos que podem aumentar o risco associado à doença, como por exemplo: sexo feminino, depressão, diabetes mellitus, hipertensão arterial, hiperinsulinemia, tabagismo, inatividade física, dislipidemias, dieta rica em gorduras e fatores genéticos (Cotman & Berchtold, 2002; Ritchie & Lovestone, 2002; Mattson, 2003; Gorelick, 2004; Luchsinger & Mayeux, 2004). A forma genética da DA tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente ocorrem antes dos 65 anos de idade, sendo considerada mais rara (5-10% dos casos) (Poirier, 2005). Neste caso, estudos apontam a presença de mutações em genes codificadores para a proteína precursora do peptídeo β -amilóide (APP), a presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), proteínas associadas com a formação dos fragmentos tóxicos de amilóide, bem como a apolipoproteína E (ApoE) (especificamente ao alelo $\epsilon 4$) e a proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) como os principais responsáveis pelos casos da forma familiar da DA (Levy-Lahad et al., 1995; Blennow et al., 2006). Entretanto,

mutações nesses genes nos casos de doença esporádica, não estão descartadas.

Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas que estabeleçam um diagnóstico definitivo e precoce para a DA. Dessa forma, este diagnóstico só é obtido com a demonstração de lesões neuropatológicas no cérebro de indivíduos *pos mortem* (Gearing et al., 1995). Do ponto de vista histopatológico, observa-se no cérebro de indivíduos com a doença de Alzheimer atrofia cortical difusa, presença de grande número de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (Braak et al., 1998; Uylings & De Brabander, 2002).

As placas senis e os emaranhados neurofibrilares podem ser encontrados normalmente em cérebros durante o envelhecimento, porém em menor quantidade e distribuição menos extensa quando comparados com os pacientes portadores de DA (Hardy & Higgins, 1992; Walsh & Selkoe, 2004). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente, nas regiões do cérebro envolvidas no aprendizado, memória e comportamento emocional, como o córtex, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004). Adicionalmente é bem demonstrado que ocorre perda da conectividade sináptica e perda neuronal, assim como uma astrogliose na DA (Garcia-Allyon et al., 2011).

Os emaranhados neurofibrilares são constituídos primariamente de proteína Tau associadas à microtúbulos, conferindo estabilidade ao citoesqueleto neural, sendo esta função regulada por um processo de fosforilação e defosforilação. Nos neurônios que sofrem degeneração em pacientes com DA, as proteínas Tau tornam-se hiperfosforiladas acarretando uma má formação do neurônio, levando a uma disfunção e possível morte desta célula (Nagy et al., 1995).

O processo inflamatório está relacionado a diversas enfermidades neurodegenerativas, incluindo o DA. Uma disfunção na resposta imune pode levar a anormalidades como a degeneração neurofibrilar na DA. Foi também observado que o peptídeo A β pode induzir a expressão de citocinas como, interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) em cultura de astrócitos e células da microglia (Gitter et al., 1995; Chong, 1997). Essa liberação anormal de interleucinas afeta os padrões da fosforilação da tau e outros eventos intracelulares ligados à neurodegeneração (Quintanilla et al., 2004).

Por sua vez, as placas senis são depósitos extracelulares de fibrilas e agregados amorfos de peptídeo A β , o qual é composto

principalmente por 40 ou 42 resíduos de aminoácidos (Glennner & Wong, 1984). O A β é um fragmento proteolítico formado a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP), uma glicoproteína transmembrânica, através de enzimas proteolíticas chamadas α -secretase, β -secretase e γ -secretase (Haass, 2007). Quando essa clivagem é feita pela α -secretase, a resultante é uma proteína com cerca de 654 a 670 aminoácidos, que pode exercer neuroproteção e neuroplasticidade. Por outro lado, quando a clivagem da APP se dá pela β -secretase e em seguida pela γ -secretase, temos como resultado a produção de A β . Esses fragmentos amiloidogênicos podem sofrer agregação e deposição nos neurônios, levando a diversos problemas intra e extracelulares, como o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Butterfield & Lauderback, 2002), disfunção da homeostase do cálcio intracelular e aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica (Harris et al. 1996; Demuro et al., 2010), fazendo com que aumente também o dano e morte destas células e células vizinhas.

Outra característica relevante da DA é a ocorrência de disfunção na neurotransmissão colinérgica, incluindo na enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação da acetilcolina (Blennow et al., 2006). Um recente estudo demonstrou um aumento significativo na atividade da AChE plasmática em pacientes com DA quando comparados a indivíduos do mesmo sexo e da mesma faixa etária (García-Ayllón et al., 2010).

Novas evidências também apontam para a importância do colesterol no desenvolvimento e progressão da DA (Reiss et al., 2004; Longenberger & Shah, 2011). A ApoE é uma das principais apolipoproteínas no plasma e a principal proteína transportadora de colesterol no cérebro, onde foi identificado a variação do gene ApoE4 (alelo ϵ 4), como um fator de risco para a DA familiar, mostrando um papel do colesterol na patogênese da DA (Puglielli, 2008). Elevados níveis de colesterol acarretam em um aumento de A β em modelos animais e celulares, sendo que drogas como as estatinas apresentam uma redução dos níveis de A β (Whitfield, 2006; Hartmann, et al., 2007). Esses estudos demonstram que a agregação de A β e o metabolismo do colesterol no cérebro parecem ser eventos associados, sendo que o aumento nos níveis de colesterol desempenha um papel importante na agregação do peptídeo A β e agentes redutores do colesterol, tais como os inibidores da enzima HMG-CoA redutase (responsável pela síntese de colesterol), podem reduzir o acúmulo do A β por redução nos níveis de colesterol cerebral (Longenberger & Shah, 2011).

1.2 GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE

Glutamato é um aminoácido de grande importância para o metabolismo dos seres vivos, participando na produção de metabolitos como o piruvato ou oxaloacetato, envolvidos em vias metabólicas como a gliconeogênese e a glicólise. Além disso, atua como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e desempenha importante papel na manutenção da atividade nervosa central e fenômenos plásticos vinculados ao desenvolvimento, ao aprendizado e à memória (Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). O glutamato é sintetizado e estocado em neurônios especializados denominados glutamatérgicos e liberado sob diferentes estímulos na fenda sináptica, onde se une a uma série de receptores situados nas membranas pré e pós-sinápticas e também na astrogliia (Gegelashvili & Schousboe, 1997).

Existem dois tipos de receptores de glutamato: ionotrópicos, que formam canais iônicos e são subdivididos de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas, como os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido caínico (KA) e os sensíveis ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico (AMPA) (Michaelis, 1998), e metabotrópicos, ligados às proteínas G. Aos receptores AMPA e cainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida, e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias, e são altamente permeáveis aos íons cálcio (Ca^{+2}). Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória. Os receptores metabotrópicos agem através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (Obrenovitch & Urenjak, 1997).

O glutamato liberado extracelularmente é inativado através da recaptação principalmente pelas células gliais, por um processo mediado por transportadores de alta afinidade (EAAT) (Struzynska et al, 2005), o que pode ser modulado pelo estado redox da célula (Trotti et al, 1998). Nos astócitos o glutamato retirado da fenda sináptica é convertido em glutamina através da enzima glutamina sintetase, podendo ser transportada aos neurônios para uma nova conversão a glutamato e futura neurotransmissão. Assim, a captação de glutamato é essencial para a finalização da transmissão sináptica durante condições

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

1.3 ACETILCOLINA

A acetilcolina é outro neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso e de grande importância pelo seu envolvimento no desenvolvimento cortical do cérebro, atividade cortical, controle do fluxo sanguíneo cerebral e modulação da capacidade cognitiva e processos de aprendizado e memória (Schliebs *et al.*, 2006). Em contraste com outras demências, na DA, a disfunção colinérgica é acompanhada dos dois grandes marcadores desta patologia, placas amiloidogénicas e emaranhados neurofibrilares, provocando a pergunta se esses processos têm papel na indução ou mediação da disfunção colinérgica nesta doença (Auld *et al.*, 2002, Yan *et al.*, 2004).

Achados neuroquímicos em cérebros com DA levaram a formulação da “hipótese colinérgica” para a patologia. Essa hipótese sugere que há uma perda de neurônios colinérgicos em pacientes com DA (Bartus *et al.*, 1982; Bartus *et al.*, 2000), onde a atividade de enzimas como, acetilcolinesterase (AChE) e colina acetiltransferase encontram-se diminuídas, enquanto a captação de colina Na^+ -dependente de alta afinidade encontra-se aumentada, provavelmente devido a um mecanismo compensatório (Slotkin *et al.*, 1994; Bissette *et*

al., 1996; Shinotoh et al., 2000; DeKosky et al., 2002). Durante a progressão da DA, ocorre intensiva morte neuronal, essa morte pode ser observada no prosencéfalo onde há perda de neurônios colinérgicos, que é acompanhada por progressivo declínio de acetilcolina (Davies & Maloney, 1976; Perry et al., 1977). Sendo assim, a AChE é considerada uma enzima chave para o sistema neuronal colinérgico em pacientes com DA, visto que regula os níveis extracelulares de acetilcolina.

Tem sido sugerido que a redução na atividade da AChE que ocorre em encéfalos de pacientes com DA não é causada somente pela depleção colinérgica, já que a densidade de fibras ricas em AChE diminui em áreas corticais dos pacientes com DA não sendo correlacionadas com o número de neurônios ricos em AChE (Heckers et al., 1992). Portanto, é importante notar que uma alteração nos níveis de AChE podem não refletir uma alteração na neurotransmissão colinérgica (García-Ayllón et al., 2011).

1.4 TRATAMENTO E MODELOS ANIMAIS

O tratamento da DA atualmente inclui estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. Inúmeras substâncias psicoativas têm sido propostas para restabelecer ou preservar as funções cognitivas dos pacientes (Mount & Downton, 2006). A reposição da acetilcolina tem mostrado eficácia na melhora da capacidade cognitiva de portadores da doença. Os medicamentos usados nesse tipo de terapia são os inibidores da AChE (como a tacrina e a galantamina) e a memantina (antagonista não-competitivo de receptores NMDA). Acredita-se também que essas substâncias possam retardar a evolução natural da doença, possibilitando uma melhora temporária no estado funcional do paciente (Mount & Downton, 2006; Blennow et al., 2006).

Como recentemente encontram-se apenas tratamentos sintomáticos para essa doença, novos agentes terapêuticos devem ser estudados a fim de promover uma melhora no tratamento das deficiências cognitivas causadas pela DA. E é com esse intuito e uma melhora na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à DA, que os modelos animais têm contribuído consideravelmente para novos avanços, tendo um grande papel na avaliação de eventuais drogas com potencial terapêutico, não apenas para combater a degeneração neuronal associada à DA, mas também para modificar a progressão que esta apresenta (Van Dam & De Deyn, 2006).

Uma série de trabalhos tem descrito um modelo de neuroinflamação induzida por uma única injeção intracerebroventricular (icv) de $A\beta_{1-40}$ que mimetiza a fase inicial da DA (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008; Piermatiri et al., 2010, Dos Santos et al., 2011). Mesmo sendo incapaz de induzir todas as características patológicas de DA, como placa amilóide, hiperfosforilação da tau e perda neuronal bruta (Van Dam & De Deyn, 2006; Takeda et al., 2009), essa infusão aguda de peptídeos $A\beta$ em cérebro de roedores vem sendo utilizada como um modelo experimental para a caracterização da toxicidade $A\beta$, induzindo uma resposta inflamatória associada à déficits de aprendizagem e memória (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008; Takeda et al., 2009).

Além disso, tem sido demonstrado que a administração i.c.v. destes fragmentos em roedores é capaz de promover prejuízo cognitivo significativo em diversos testes comportamentais utilizados em laboratório para avaliar a cognição dos animais, como por exemplo, teste de reconhecimento de objetos (Furukawa-Hibi et al., 2011), esQUIVA inibitória (Giovannelli et al., 1995; Nitta et al., 1994), labirinto em Y (McDonald et al., 1996) e labirinto aquático de Morris (Harkany et al., 1999).

1.5 ATORVASTATINA

Estatinas são inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. A HMG-CoA redutase tem como função reduzir o HMG-CoA em mevalonato na via de biossíntese do colesterol e isoprenóides, sendo então consideradas como enzimas marca-passo deste processo (Nelson & Cox, 2000; Lee et al., 2008), por esse motivo, esses fármacos são utilizados atualmente como tratamento para a hipercolesterolemia. Estudos retrospectivos sugerem que a prevalência da doença de Alzheimer e demência vascular é menor em pacientes que são tratados com estatinas (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000), reduzindo até mesmo os níveis de peptídeos $A\beta$ em um modelo de trauma cerebral induzido (Abrahamson et al., 2009). Dados recentes demonstraram efeitos anti-inflamatórios com o tratamento de estatinas em pacientes com esclerose múltipla, X-adrenoleucodistrofia, modelos de encefalomielite auto-imune e de lesão da medula espinhal em ratos (Stanislaus et al, 1999; Nath et al, 2004; Paintlia et al, 2005; Pannu et al, 2007), sugerindo um amplo efeito neuroprotetor diante de diversas condições patológicas.

A atorvastatina, um membro da família das estatinas, é relativamente mais lipofílica e possui uma atividade mais prolongada na inibição da HMG-CoA redutase quando comparado a outras estatinas (Schachter, 2005). Além disso, a segurança de seu uso, mesmo em altas dosagens, já foi demonstrada em pessoas adultas (Waters, 2005). Atualmente um vasto número de trabalhos tem estudado esta estatina em questão pelos seus efeitos pleiotrópicos, pois este fármaco demonstrou efeitos neuroprotetores em diversas condições patológicas, como em modelos animais de traumatismo crânio-encefálico, reduzindo déficits neurológicos e aumentando a sinaptogênese, angiogênese e sobrevivência neuronal em animais tratados por sete dias após insulto (Lu et al., 2004) e em modelo de epilepsia induzido por kainato, no qual pôde ser observado que o pré-tratamento com atorvastatina reduziu a atividade de crises e morte neuronal no hipocampo de ratos (Lee et al., 2008).

Em nosso laboratório foi demonstrado que o tratamento de camundongos com atorvastatina (10 mg/kg, via oral) por sete dias reduziu o número de animais que convulsionaram após a administração icv de ácido quinolínico, um agonista do receptor NMDA e modulador do transporte de glutamato. Além disto, a atorvastatina apresentou efeito neuroprotetor sobre a morte celular hipocampal induzida por este agente glutamatérgico (Piermartiri et al., 2009).

Também em nosso laboratório, foi demonstrado que o tratamento de camundongos com atorvastatina (10mg/kg, via oral) por sete dias consecutivos após a infusão de $A\beta_{1-40}$ (i.c.v.), apresenta um efeito neuroprotetor contra a degeneração celular induzida pelo peptídeo β -amilóide. Essa neuroproteção pode ser devida a uma extensa gama de respostas encefálicas, tais como, uma redução das respostas inflamatórias, onde a atorvastatina reverteu o aumento da expressão de cyclooxygenase-2 (COX-2) (Piermartiri et al., 2010). Na reorganização astrocitária em resposta ao insulto, visto que a atorvastatina reverteu o aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína que compõe o citoesqueleto astrocitário. Adicionalmente a atorvastatina pode estar envolvida na captação glutamatérgica, através do aumento da expressão dos transportadores astrocitários deste neurotransmissor (GLAST e GLT-1), visto que, quando em excesso na fenda sináptica o glutamato gera excitotoxicidade e conseqüente dano neuronal.

Outro possível mecanismo de ação desta estatina é a redução do estresse oxidativo, já que resultados demonstraram uma redução nos níveis de peroxidação lipídica em animais que receberam o tratamento

por sete dias com a droga. Entretanto, mesmo apresentando tantos efeitos positivos na neuroproteção, a atorvastatina falhou em melhorar os déficits de memória espacial e aprendizagem quando testados 15 dias após a infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$ nesses animais (Piermartiri et al., 2010), o que sugere que sejam estudados com mais detalhes os possíveis efeitos neuroprotetores e moduladores da alteração cognitiva da atorvastatina em modelos animais de neurodegeneração.

2. JUSTIFICATIVA

Os inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase têm se mostrado como drogas potencialmente neuroprotetoras, inclusive na diminuição dos níveis de A β e sua toxicidade em modelos de DA. Este estudo utilizou a atorvastatina visto que em relação às outras estatinas, ela é relativamente mais lipofílica e possui uma maior meia-vida de inibição da HMG-CoA redutase, além da segurança na aplicação de altas dosagens em indivíduos adultos (Waters, 2005). Além disso, como descrito anteriormente, estudos demonstraram que o pré-tratamento com atorvastatina reduz a atividade epiléptica e a morte neuronal no hipocampo de ratos e apresentou efeitos neuroprotetores frente à isquemia cerebral *in vitro*, prevenindo a redução nos níveis de antioxidantes, ajudando no combate às espécies reativas de oxigênio e promovendo aumento na captação de glutamato (Martins, 2009). Utilizando como base o trabalho de Piermartiri (2010) onde o pós-tratamento com atorvastatina não apresentou efeito na reversão do déficit cognitivo causado pelo peptídeo β -amilóide e o fato de que uma mesma estatina pode apresentar diferentes efeitos quando utilizadas em um pós e/ou um pré-tratamento (Kurimani et al., 2008), verificamos se um pré-tratamento com atorvastatina em um modelo de DA em camundongos desempenha alguma mudança comportamental em animais com déficit cognitivo promovido pelo peptídeo A β , bem como estudamos a modulação do sistemas glutamatérgico, colinérgico e a defesa antioxidante enzimática nestes animais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar se o pré-tratamento com atorvastatina apresenta uma melhora nos déficits cognitivos em camundongos promovidos pela infusão intracerebroventricular do peptídeo β -amilóide ($A\beta_{1-40}$), observando se este efeito está relacionado a mudanças no sistema glutamatérgico, colinérgico ou na atividade de enzimas relacionadas à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se o pré-tratamento com atorvastatina apresenta uma melhora no déficit cognitivo observado em camundongos submetidos à infusão com peptídeos $A\beta_{1-40}$;

- Determinar se o pré-tratamento de camundongos com atorvastatina apresenta ação na captação e liberação de glutamato em fatias hipocâmpais após infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$;

- Avaliar a ação da atorvastatina sobre a atividade da glutamina sintetase em fatias hipocâmpais de camundongos submetidos a infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$;

- Verificar a ação da atorvastatina sobre as atividades da glutatona redutase e glutatona peroxidase em hipocampo e córtex cerebral de camundongos submetidos à infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$;

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

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos (3 meses/ 40–50g), mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas com água e ração disponíveis *ad libitum*. Os protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC – PP00575). Os experimentos foram realizados durante o período diurno para evitar a variação circadiana.

4.2 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Foi preparada uma solução de $A\beta_{1-40}$ humano (Tocris, Ellisville, MO, USA) em concentração de 1 mg/ml em 0,1 M de um tampão salina tamponado por fosfato (PBS) (pH 7.4) estéril e alíquotas foram armazenadas a -20°C . Soluções de $A\beta$ foram incubados a 37°C por 4 dias antes do uso para agregação dos peptídeos, como descrito previamente (El Houry et al., 1996). A forma agregada de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo) foi administrada i.c.v. como descrito anteriormente (Medeiros et al., 2007; Prediger et al., 2007; 2008). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) usando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, E.U.A.) e, em seguida, suavemente retidos por mão para a administração i.c.v. A esterilização do local da injeção foi realizada com uma gaze embebida em 70% de etanol. Sob anestesia leve (ou seja, apenas o necessário para a perda do reflexo postural), a agulha foi introduzida unilateralmente 1mm a direita do ponto equidistante médio de cada olho e 1 mm posterior a uma linha traçada através da base anterior dos olhos (usada como referência externa). Um volume de 3 μl de $A\beta_{1-40}$ ou solução de PBS foi injetado no ventrículo lateral, com as seguintes coordenadas do bregma: ântero-posterior (AP) = -0,1 mm, médio-lateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral (DV) = - 3 mm. A localização exata do local da injeção foi confirmada no momento da dissecação dos animais para a realização dos testes bioquímicos. Resultados de camundongos apresentando qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística. Para estudar o papel das estatinas nas alterações moleculares e

comportamentais induzidas por $A\beta_{1-40}$, os animais foram tratados via oral (v.o.) com atorvastatina (Lipitor atorvastatina cálcica, Pfizer) 10 mg/kg/dia dissolvida em salina, uma vez por dia durante sete dias consecutivos antes da infusão de $A\beta_{1-40}$ ou PBS. Um grupo de animais controle foram tratados com veículo (NaCl a 0,9%) via oral no mesmo período. O tratamento foi feito pela administração de 10 μ l/g de peso dos animais, tanto para as soluções de atorvastatina como para as de salina. O protocolo experimental deste estudo está apresentado na Figura 1.

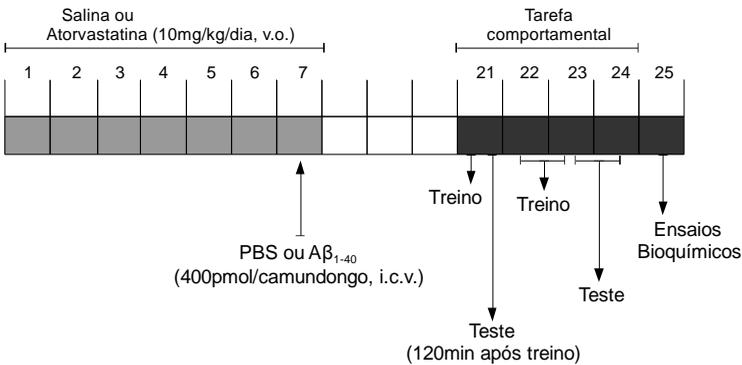


Figura 1. Visão geral da sequência dos procedimentos experimentais.

4.3 TAREFA DE REALOCAÇÃO DE OBJETO

A realocação de objetos (RO) é uma tarefa baseada no comportamento natural de roedores (preferência pelo novo), um instinto inato que leva os animais a aprender sobre seu ambiente (relação de discriminação). Além disso, foi relatado por outros trabalhos que esta tarefa envolve regiões de aprendizado e memória do cérebro, como hipocampo e córtex pré-frontal (Binder et al., 2012). O RO foi realizado em um aparato constituído por uma câmara de acrílico de pequeno porte: 25 cm \times 25 cm \times 40 cm. Antes das sessões experimentais, os animais foram habituados para a sala de experimental por 90 à 120 min em condições de luz não ofuscantes. Uma lâmpada de luz vermelha foi ligada durante as sessões experimentais. A intensidade de luz foi igual

em todo o aparelho. Os objetos foram colocados equidistantes a partir de dois cantos, 6 cm a partir da parede. Camundongos foram colocados individualmente dentro da câmara e executaram a tarefa durante 5 minutos. Em sessões de treino, 2 objetos semelhantes foram utilizados. Em sessões de testes, realizados 120 min depois, um objeto foi deslocado para outro canto da câmara. Os objetos utilizados foram dois Legos apresentando a mesma textura, tamanho, forma e cor. Os objetos não são conhecidos por ter significância etológica para os camundongos. A relação de discriminação foi expressa pela relação $TN / (TN + TF)$, (TN tempo de exploração do objeto relocado, TF tempo de exploração do local familiar), tanto nas sessões de treinamento quanto nas de teste. Entre as sessões, os objetos foram limpos com solução de etanol 10%. A exploração foi definida pela direção do nariz para o objeto a uma distância inferior a 1 cm e / ou tocar o objeto com o nariz ou patas dianteiras. O tempo de exploração foi medido por 2 observadores-cegos (não cientes dos tratamentos de cada animal), com o uso de cronômetros. Animais que exploraram os objetos por menos de 1,5s em uma sessão foram excluídos do estudo.

4.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

O labirinto aquático de Morris consiste em um tanque circular (diâmetro = 97 cm; altura = 60 cm) contendo água a $22 \pm 2^\circ$ C. A plataforma alva (10 x 10 cm) estava submersa a 1 cm abaixo da superfície e localizada em uma posição fixa, equidistante do centro e da parede do tanque, em algum dos quadrantes. O tanque encontra-se localizado em uma sala de testes contendo vários elementos visuais de destaque. Camundongos foram submetidos a uma versão de referência da memória espacial do labirinto aquático de Morris, como descrito anteriormente (Medeiros et al., 2007; Prediger et al 2007; 2008). Uma sessão de treino foi realizada 14 dias após a infusão de $A\beta_{1-40}$ que consistiu de dez treinos consecutivos, onde os animais foram deixados com a face voltada para a parede e permitidos nadarem livremente até a plataforma. Os animais que não encontraram a plataforma em um período de 60s foram guiados até ela. O animal teve que manter-se na plataforma por 10s para ser retirado do tanque. Após 10 min de descanso, o animal era colocado em um novo ponto de partida. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para cada animal. A sessão de teste foi realizada 24h após o treinamento descrito anteriormente. Essa sessão de teste consistiu de uma única prova, onde a plataforma foi retirada e o animal deixado durante 60s no tanque. O tempo gasto no quadrante

correto (onde a plataforma estava localizada na sessão de treinamento), bem como o número de vezes que o animal cruzou o quadrante foi gravado e analisado pelo programa ANY-maze.

4.5 PREPARAÇÃO E INCUBAÇÃO DAS FATIAS DE HIPOCAMPO

Animais foram mortos por decapitação e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain, seguido por transferência e separação em fatias individuais para uma pré-incubação em KRB durante 30 min.

4.6 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

A captação L-[³H]glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al., 2005. Após a incubação, o meio contendo tampão KRB foi retirado e as fatias foram incubadas com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) ou HBSS colina (para retirar Na⁺, o NaCl e Na₂HPO₄ foram substituídos por Cloreto de colina (137 mM) por 15 min. A captação foi iniciada após a adição de 0,33 μCi/ml L-[³H]glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100 μM, por 7 min. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas 2 vezes com HBSS ou HBSS-colina gelados. Em seguida as fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular de [³H]L-Glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

4.7 LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

A liberação de glutamato foi realizada segundo descrito por (Molz et al., 2008). Após a incubação, o meio contendo tampão Krebs-Ringer foi retirado e as fatias incubadas com HBSS por 15 min. Em seguida foi adicionado 0,33 μCi/ml de D-[³H]Aspartato - um análogo do glutamato que não é metabolizado pelas células, fazendo com que tenhamos uma medida mais precisa da quantidade de glutamato liberado durante o processo reverso dos transportadores - (concentração final 100 μM) por 7 min iniciando a captação. Após esse período as fatias foram

lavadas 3 vezes com HBSS gelado para a retirada do excesso de D-[³H]Aspartato não captado. As fatias foram novamente incubadas por 15 minutos em 300 µl de HBSS, o sobrenadante coletado foi utilizado para medir a quantidade de D-[³H]Aspartato liberado. As fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/ 0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular e extracelular de D-[³H]Aspartato foi avaliada em um contador de cintilação líquida e a porcentagem de aspartato liberado foi expresso em relação a quantidade total de D-[³H]Aspartato.

4.8 GLUTAMINA SINTETASE

O ensaio da enzima glutamina sintetase (GS) foi adaptado a partir de Shapiro & Stadtman (1970) e Stanimirovic et al. (1999). A mistura de ensaio continha: 80mM de tampão imidazol-HCl (pH 7,0), 30mM glutamina, 3mM MnCl₂, 30mM hidroxilamina-HCl (pH 7,0), 20 mM arsenato de sódio (pH 7,0), 0,4mM de ADP e 50µl de homogenato do tecido. O ensaio foi interrompido após 30 min a 37 °C por adição de 100µl de uma mistura contendo 4/1/0.5/6.5 (v/v/v/v), de 10% (w/v) de cloreto férrico, 24% (w / v) de ácido tricloroacético, 6M HCl e água. A cor do produto da reação, γ -glutamil hidroxamato, foi medida a 540nm usando um leitor de Elisa e convertido para a quantidade do produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa como unidade(s) por miligrama de proteína na amostra.

4.9 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS

Os animais foram mortos por decapitação e o córtex pré-frontal e hipocampo removidos. O córtex pré-frontal e duas fatias de hipocampo foram homogeneizadas (1:10 w/v) em tampão HEPES (20 mM, pH 7,0). Os homogeneizados de tecido foram centrifugados a 3000 × g, a 4 °C durante 5 min e uma alíquota do sobrenadante de baixa velocidade foi utilizado para a determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Posteriormente, os sobrenadantes da primeira centrifugação foram centrifugados novamente a 16.000 × g, a 4 °C durante 20 min e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação das atividades de glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx).

4.10 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A atividade da AChE foi medida utilizando iodeto de acetiltiocolina como substrato. O método baseia-se na produção de tiocolina, a partir da hidrólise do iodeto de acetiltiocolina. Isto é acompanhado por uma reação da tiocolina com ácido 5',5 - ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para produzir o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptop - benzóico (TNB) com cor amarela, o qual é medido em espectrofotômetro em 412nm (Ellman et al., 1961).

4.11 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi medida através de um ensaio de redução do NADPH, conforme protocolo desenvolvido por Carlberg e Mannervik (1985), utilizando dissulfeto de glutathiona (GSSG) como substrato. A atividade da GR foi monitorada pela diminuição da absorbância do NADPH a 340 nm a 37 °C em uma Leitora Multifuncional de Microplacas, Infinite M200, TECAN (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Os resultados foram baseados em um coeficiente de extinção molar para o NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi medida utilizando um ensaio de redução do NADPH conforme a técnica de Wendel (1981). O sobrenadante tecidual (em torno de 200 ug de proteína) foi adicionado a uma mistura de reação contendo glutathiona reduzida, glutathiona redutase e NADPH em tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de terc-butil hidroperóxido e a diminuição da absorbância foi monitorado a 340nm a 37 °C em uma Leitora Multifuncional de Microplacas, Infinite M200, TECAN (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). A atividade obtida na ausência das amostras foi subtraída. Os resultados foram baseados em um coeficiente de extinção molar para o NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas para os experimentos de captação de L-[³H]glutamato, atividade da AChE, GR e GPx, foram realizadas através do método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5. RESULTADOS

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

A realocação de objeto (RO) é uma tarefa com base no comportamento natural de roedores, visto que estes animais exploraram o ambiente a que são expostos e apresentam capacidade de aprender sobre este ambiente (relação de discriminação). Os dados da RO foram separados em Relação de Discriminação e Tempo Total que os animais gastaram para explorar ambos os objetos e analisados por ANOVA de medidas repetidas. No treinamento, todos os grupos apresentam o mesmo desempenho na tarefa, dependendo 50% do tempo explorando cada um dos objetos, indicando o interesse destes animais pela novidade e ausência de preferência por um local específico. Na sessão de teste pode ser observado que o grupo controle passa a explorar 60% do tempo o objeto que foi realocado, indicando o aprendizado sobre o ambiente. Os animais tratados somente com $A\beta_{1-40}$ apresentam déficit cognitivo, dependendo novamente 50% do tempo explorando cada um dos objetos, não reconhecendo o objeto no local que já lhe era familiar. Este déficit cognitivo foi revertido no grupo em que os animais infundidos com $A\beta_{1-40}$ foram tratados previamente com atorvastatina. Também é demonstrado que a atorvastatina per se não afetou a resposta comportamental dos camundongos (Figura 2A). Todos os grupos apresentaram um tempo similar de exploração nos dois objetos em ambas as sessões. Estes resultados demonstram que a $A\beta_{1-40}$ e a atorvastatina, ou a associação dos dois, não alteram o interesse dos animais pelos objetos e sua locomoção nas duas sessões desta tarefa (Figura 2B). Estes resultados, assim como o de estudos prévios, nos levaram a estudar regiões encefálicas relacionadas à atividade de memória e descartar regiões ligadas à locomoção.

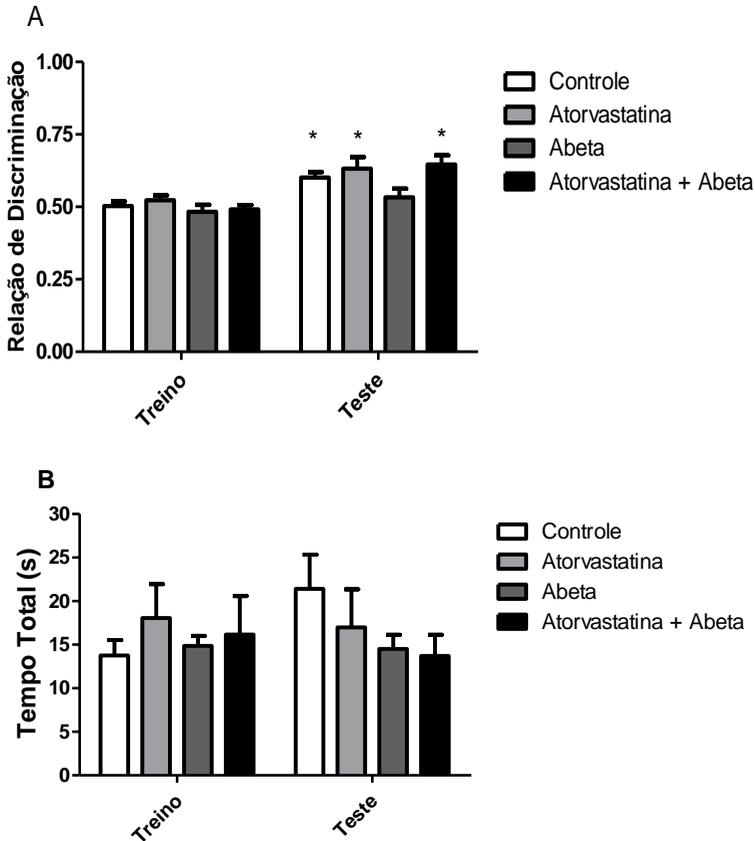


Figura 2. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a tarefa de realocação de objeto (A) e tempo total gasto na exploração de ambos os objetos (B). Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. A avaliação do teste comportamental foi realizada 14 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=14-21), * $P < 0,05$ quando comparado com grupos controle (Salina + PBS).

(A) Pré-tratamento [$F(1,57) = 4,65, P < 0,05$], tratamento [$F(1,57) = 1,76, P = 0,19$] e interação [$F(1,57) = 0,79, P = 0,38$].

(B) Pré-tratamento [$F(1,56) = 0,001, P = 0,97$], tratamento [$F(1,56) = 1,05, P = 0,31$] e interação [$F(1,56) = 0,003, P = 0,95$].

Outro teste comportamental bastante descrito na literatura (Nitta et al., 1994; Harkany et al., 1999; Prediger et al 2007; 2008) e utilizado para avaliar a memória espacial dos animais pré-tratados com atorvastatina e infundidos com $A\beta$ é o labirinto aquático de Morris. Os dados deste teste foram separados em latência para a chegada à plataforma durante o treino, número de vezes em que os animais cruzaram o quadrante onde se encontrava a plataforma e tempo gasto neste mesmo quadrante na sessão de teste. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas no treino e ANOVA de duas vias no teste. Como pode ser observado na figura 3A, 3B e 3C os animais infundidos com $A\beta_{1-40}$ não demonstraram déficits de memória e aprendizado nesta tarefa, não apresentando diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle.

Um dos principais sistemas envolvidos na memória e aprendizado é o sistema glutamatérgico. Assim, utilizamos alguns protocolos para observar se a melhora cognitiva observada na tarefa de realocação de objetos em animais pré-tratados com atorvastatina ocorre devido ao envolvimento deste sistema. No ensaio da captação de glutamato (Figura 4) observou-se uma redução significativa nos grupos atorvastatina ou $A\beta$ em relação ao grupo controle. O grupo de animais pré-tratados com atorvastatina e infundidos com $A\beta$ não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle e tampouco com os grupos atorvastatina e $A\beta$.

No ensaio de liberação do glutamato (Figura 5) não foi demonstrada nenhuma mudança significativa entre os grupos, porém se comparado apenas o pré-tratamento, nos animais tratados com atorvastatina ocorre um pequeno aumento da liberação em relação aos grupos tratados com salina.

O próximo ensaio realizado foi o da glutamina sintetase. Esta enzima é de grande importância e tem a finalidade de converter o glutamato retirado da fenda sináptica em glutamina. Esse processo ocorre nos astrócitos, onde após ser convertida, essa glutamina poderá ser transportada aos neurônios para uma nova conversão a glutamato e futura neurotransmissão, dando continuidade ao ciclo. Após análise dos dados, observamos que nenhuma mudança significativa ocorreu entre os diferentes tratamentos utilizados em nosso protocolo de estudo (Figura 6).

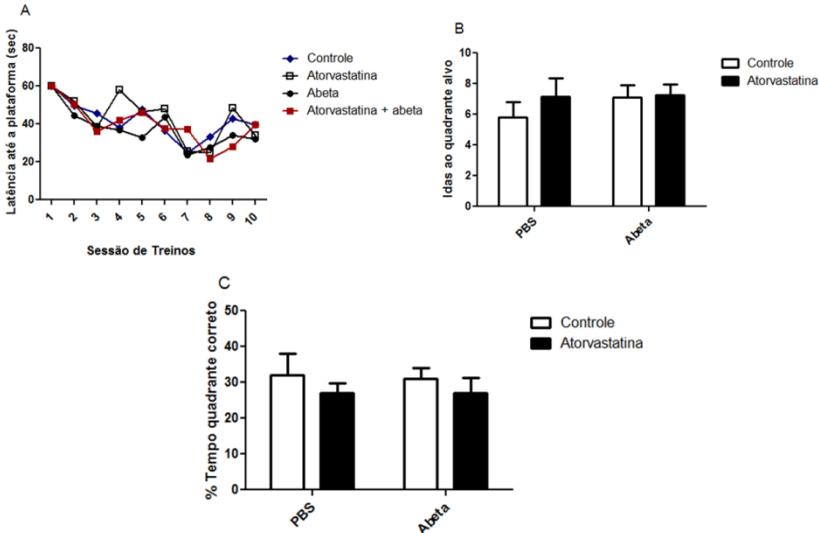


Figura 3. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a tarefa do labirinto aquático de Morris: (A) Latência de chegada na plataforma no treino, (B) Idas ao quadrante correto (C) Tempo no quadrante correto na sessão do teste. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. A avaliação do teste comportamental foi realizada 14 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls no treino e por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls no teste. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=10).

(B)Pré-tratamento [F(1,35) = 0,60, P = 0,44], tratamento [F(1,35) = 0,48, P = 0,49] e interação [F(1,35) = 0,39, P = 0,54].

(C)Pré-tratamento [F(1,35) = 1,11, P = 0,30], tratamento [F(1,35) = 0,01, P = 0,91] e interação [F(1,35) = 0,009, P = 0,92].

Outro sistema bastante importante envolvido com memória e aprendizado é o sistema colinérgico, do qual faz parte o neurotransmissor acetilcolina, muito estudado na doença de Alzheimer e

envolvido nos principais tratamentos atuais para pacientes que sofrem desta patologia. Em nosso trabalho utilizamos duas principais regiões encefálicas envolvida no processo cognitivo para verificar a atividade da enzima acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina liberada na fenda sináptica. Tanto no córtex pré-frontal (Figura 7A) quanto no hipocampo (Figura 7B) não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

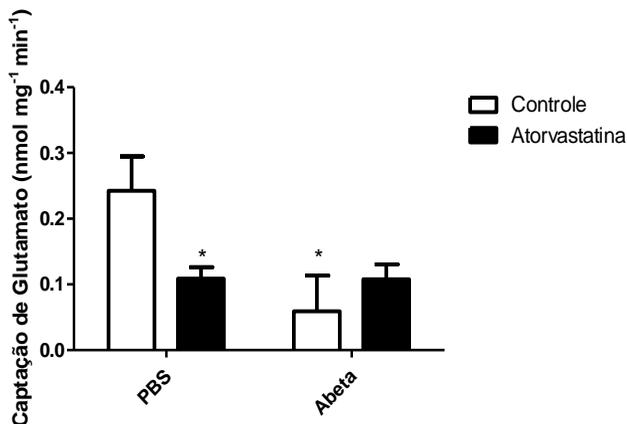


Figura 4. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=4), * $P < 0,05$ quando comparado com grupos controle (Salina + PBS).

Pré-tratamento [$F(1,12) = 0,12$, $P = 0,31$], tratamento [$F(1,12) = 5,21$, $P < 0,05$] e interação [$F(1,12) = 5,11$, $P < 0,05$].

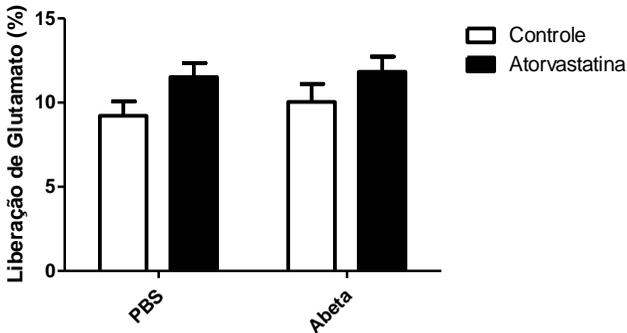


Figura 5. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a liberação de glutamato em fatias de hipocampo. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5).

Pré-tratamento [F(1,16) = 5,04 P<0,05], tratamento [F(1,16) = 0,38, P = 0,54] e interação [F(1,16) = 0,08, P = 0,78].

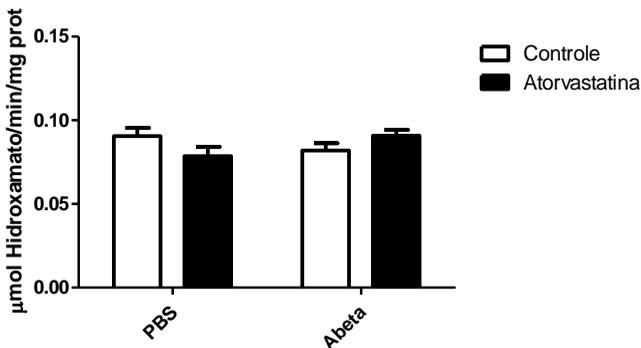


Figura 6. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina em camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ sobre a atividade de glutamina sintetase em fatias de hipocampo. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5).

Pré-tratamento [F(1,16) = 0,11, P = 0,74], tratamento [F(1,16) = 0,16, P = 0,69] e interação [F(1,16) = 5,03, P<0,05].

Um processo que pode vir a agravar a morte neuronal e consequente perda de sinapses, levando a maiores problemas cognitivos em diversas doenças neurodegenerativas é a produção de EROs. Partindo deste princípio, analisamos as atividades de duas enzimas antioxidantes, responsáveis por detoxificar radicais livres reduzindo ou impedindo danos oxidativos nas células do SNC. Novamente utilizamos em nossos ensaios o córtex pré-frontal e o hipocampo. Na atividade da glutatona redutase (GR) no córtex (Figura 8A) ocorreu um aumento significativo desta enzima no grupo infundido com o peptídeo β -amilóide, que foi prevenido totalmente no grupo em que os animais foram tratados anteriormente a infusão com atorvastatina. Já no hipocampo (Figura 8B), o grupo atorvastatina mais $A\beta$, teve um aumento significativo na atividade da GR em relação a todos os grupos. Os animais que receberam atorvastatina e os animais infundidos com $A\beta$ não demonstraram diferenças em relação ao grupo controle.

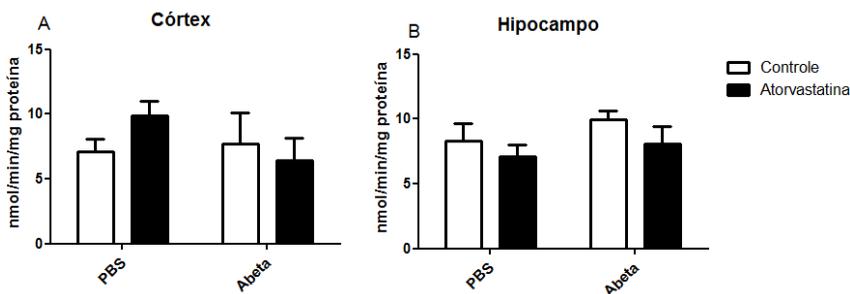


Figura 7. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5).
 (A)Pré-tratamento [F(1,16) = 0,22, P = 0,64], tratamento [F(1,16) = 0,74, P = 0,40] e interação [F(1,16) = 1,51, P = 0,24].
 (B)Pré-tratamento [F(1,16) = 0,49, P = 0,49], tratamento [F(1,16) = 2,59, P = 0,13] e interação [F(1,16) = 0,64, P = 0,43].

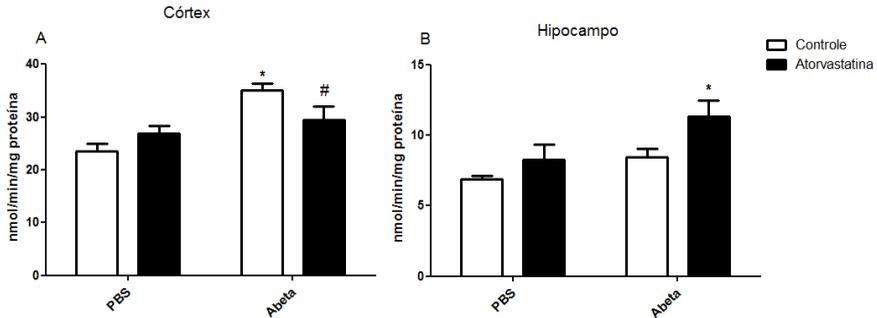


Figura 8. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da glutatona redutase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5), * $P < 0,05$ quando comparado com grupos controle (Salina + PBS), # $P < 0,05$ quando comparado com grupo Abeta (Salina + $A\beta_{1-40}$).

(A)Pré-tratamento [F(1,16) = 0,38, $P = 0,54$], tratamento [F(1,16) = 16,38, $P < 0,01$] e interação [F(1,16) = 6,82, $P < 0,05$].

(B)Pré-tratamento [F(1,16) = 6,28, $P < 0,05$], tratamento [F(1,16) = 7,58, $P < 0,05$] e interação [F(1,16) = 0,76, $P = 0,39$].

Em relação à atividade enzimática da glutatona peroxidase, observamos que o grupo $A\beta$ apresentou um aumento na atividade desta enzima e a atorvastatina novamente aboliu este aumento aos níveis do controle no córtex pré-frontal (Figura 9A). No hipocampo a atividade da GPx não apresentou diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos, apesar de ser possível notar uma diminuição da atividade desta enzima nos animais pré-tratados com atorvastatina e infundidos com PBS (Figura 9B).

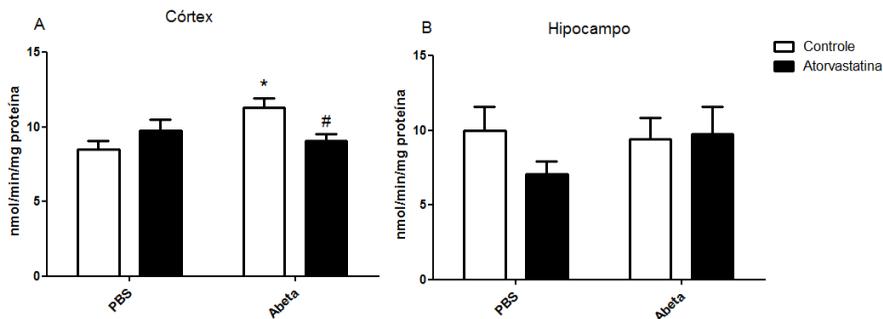


Figura 9. Efeito do pré-tratamento da atorvastatina sobre a atividade da glutatona peroxidase em homogenato de córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$. Animais foram tratados por 7 dias consecutivos com atorvastatina (10mg/kg, v.o.) ou salina e injetados i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ (400pmol/sítio) ou PBS. Análise realizada 18 dias após infusão do $A\beta_{1-40}$. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=5), * $P < 0,05$ quando comparado com grupos controle (Salina + PBS), # $P < 0,05$ quando comparado com grupo Abeta (Salina + $A\beta_{1-40}$).

(A)Pré-tratamento [F(1,16) = 0,67, $P = 0,42$], tratamento [F(1,16) = 3,16, $P = 0,09$] e interação [F(1,16) = 8,82, $P < 0,01$].

(B)Pré-tratamento [F(1,16) = 0,79, $P = 0,39$], tratamento [F(1,16) = 0,53, $P = 0,47$] e interação [F(1,16) = 1,19, $P = 0,29$].

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que uma infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ promove uma diminuição no desempenho dos camundongos na tarefa de realocação de objetos e o pré-tratamento com atorvastatina reverte este déficit cognitivo, porém estes resultados não foram reproduzidos na tarefa do labirinto aquático de Morris. Adicionalmente, demonstramos que a infusão deste mesmo peptídeo acarreta em mudanças no sistema glutamatérgico. Os tratamentos com $A\beta_{1-40}$ e com atorvastatina promovem uma diminuição na captação de glutamato. Na liberação de glutamato, quando comparado apenas o pré-tratamento, a atorvastatina promove um aumento na liberação deste neurotransmissor em relação aos grupos salinas, porém é necessário ressaltar que este ensaio não apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Foi visto ainda que os tratamentos com $A\beta_{1-40}$ e atorvastatina não provocaram mudanças na atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal 18 dias após a infusão.

Perda de memória e disfunções cognitivas são sintomas observados em pacientes com DA. Nossos achados demonstraram que os camundongos infundidos com $A\beta_{1-40}$ apresentam dificuldade no aprendizado e perda de memória de curto prazo na tarefa de realocação de objeto, corroborando outros estudos, onde a DA acarreta um déficit cognitivo envolvendo a região do hipocampo. O pré-tratamento com atorvastatina por 7 dias consecutivos, consegue prevenir o déficit de memória induzido pela infusão de $A\beta_{1-40}$. Além disso, demonstramos que a atorvastatina por si só, não causa mudanças nas respostas comportamentais dos camundongos nesta tarefa. Em outro estudo realizado em nosso laboratório, a atorvastatina (10mg/kg, v.o.) administrada por 7 dias após a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ falhou em reverter os déficits de aprendizado e memória espacial na tarefa do labirinto aquático em camundongos. Em nosso estudo, não observamos qualquer prejuízo cognitivo desencadeado pela infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$ no teste do labirinto aquático de Morris, diferentemente do que foi relatado previamente na literatura (Prediger et al., 2007; 2008; Piermartiri et al., 2010). Os animais infundidos com $A\beta_{1-40}$ não apresentaram déficits cognitivos em nenhum dos parâmetros analisados. Porém, na literatura existem alguns estudos que demonstram este mesmo problema neste tipo de tarefa. Arendash e colaboradores (2001; 2007) não obtiveram sucesso em dois trabalhos com camundongos transgênicos para a DA no labirinto aquático de Morris padrão, porém os animais apresentaram

déficits cognitivos em outras tarefas comportamentais, como por exemplo, no labirinto aquático radial.

Por outro lado, em um estudo utilizando a fluvastatina, membro da família das estatinas, foi observado que ela é capaz de prevenir o déficit cognitivo gerado pela infusão de $A\beta_{1-40}$ na tarefa de procura por água (*Water Finding Task*) quando administrada antes ao modelo da doença. Entretanto a reversão do déficit cognitivo gerado pelo $A\beta_{1-40}$ não foi observada com um pós-tratamento com esta mesma estatina (Kurinami et al., 2008). Adicionalmente os tratamentos com simvastatina ou pravastatina por quatro semanas, após a infusão i.c.v. de estreptozotocina são capazes de reverter o déficit cognitivo na tarefa do labirinto aquático em ratos (Tramontina et al., 2011). Nossos dados corroboram a idéia que diferentes membros da família das estatinas são capazes de reverter déficit cognitivo em modelos de DA, sendo que esta reversão pode depender também do momento em que este fármaco é utilizado. Adicionalmente, reforçamos a necessidade de entender melhor o mecanismo de ação das estatinas frente às alterações cognitivas promovidas pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, como uma possível estratégia para a prevenção ou tratamento da DA.

Atualmente, estudos têm demonstrado disfunção da transmissão glutamatérgica na DA (Piermartiri et al., 2010, Cassano et al., 2011). Em camundongos transgênicos 3XTg-AD, que apresentam deposição de $A\beta$, tau hiperfosforilada e, desta forma, são considerados como um modelo animal que mimetiza a DA em humanos, foi demonstrado que a liberação de glutamato diminui no córtex frontal e hipocampo e o imunocontéudo da proteína pré-sináptica SNAP-25 e transportadores de glutamato VGLUT-1, GLAST e GLT-1 diminui no hipocampo (Cassano et al., 2011). Outro estudo, utilizando um modelo de DA pela administração de estreptozotocina, foi observado que a atividade da glutamina sintetase (GS), uma enzima que possui a finalidade de converter o glutamato retirado da fenda sináptica em glutamina, diminui no hipocampo de ratos (Tramontina et al., 2011). Para corroborar a idéia desta disfunção do sistema glutamatérgico em DA, demonstramos que ocorre uma diminuição na captação de glutamato no hipocampo após a injeção de $A\beta_{1-40}$. Além disso, o modelo de uma única injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ promove diminuição na expressão de transportadores de glutamato GLAST e GLT-1 no hipocampo destes camundongos (Piermartiri et al., 2010).

Entretanto, em nosso estudo o pré-tratamento com atorvastatina e a infusão de $A\beta_{1-40}$ não exercem papel na mudança da atividade da enzima glutamina sintetase. Por outro lado, quando analisamos a

captação de glutamato o pré-tratamento com atorvastatina apresenta uma tendência em aumentar a captação em animais que foram infundidos com $A\beta_{1-40}$, apresentando valores de captação igual ao grupo $A\beta$ e ao grupo controle. Em nosso estudo a atorvastatina por si só acarretou em uma diminuição significativa da captação em relação ao grupo controle, porém outros membros da família das estatinas apresentam efeitos distintos na captação de glutamato. Por exemplo, a simvastatina, que após quatro semanas aumenta a captação e a pravastatina não altera este parâmetro (Tramontina et al., 2011). Adicionalmente é bem demonstrado que diferentes estatinas são protetoras da morte celular causada por insultos glutamatérgicos. Por exemplo, três dias de tratamento com rosuvastatina protege células de cultura primária de córtex cerebral da morte celular induzida por glutamato (Domoki et al., 2010).

Um ponto chave nesta questão parece ser o envolvimento astrocitário na transmissão glutamatérgica em modelos animais para DA, visto que, a infusão de $A\beta_{1-40}$ promove aumento na imunoreatividade para GFAP no hipocampo de camundongos, indicando uma reorganização do citoesqueleto astrocitário, adicionalmente a captação de glutamato é diminuída no mesmo modelo, assim como a imunorreatividade a dois transportadores astrocitários de glutamato GLAST e GLT-1 (Piermartiri et al., 2010). Por outro lado, em nosso trabalho a atorvastatina mesmo não alterando a liberação de glutamato entre os grupos, parece ter uma tendência a aumentar a liberação deste neurotransmissor quando comparamos apenas o pré-tratamento recebido pelos animais. Estes dados reforçam a necessidade de se entender melhor o envolvimento astrocitário e seu papel na transmissão glutamatérgica para melhor compreender os eventos associados à toxicidade do peptídeo $A\beta$, os quais podem desencadear a patofisiologia da DA.

Portanto, com a diminuição na captação e uma tendência de aumento da liberação de glutamato pela atorvastatina, seria esperado uma maior quantidade deste neurotransmissor na fenda sináptica. Deste modo, podemos pensar no fenômeno da neurotoxicidade acarretada por este aumento da transmissão glutamatérgica. Entretanto o que nos parece mais provável é que esta quantidade aumentada de glutamato na fenda pode estar promovendo uma melhora nos déficits cognitivos induzidos pelo $A\beta_{1-40}$. Em nosso laboratório foi visto por Piermartiri (2010) que o pós-tratamento com atorvastatina aumenta a expressão de transportadores de glutamato em animais infundidos com $A\beta$, entretanto a diminuição da captação de glutamato provocada pelo $A\beta$ não é

revertida pela atorvastatina. Neste sentido são necessários mais estudos para compreender o envolvimento temporal das estatinas em especial a atorvastatina com o sistema glutamatérgico.

Adicionalmente a DA altera a transmissão colinérgica, promovendo principalmente a perda do neurotransmissor acetilcolina e uma subsequente diminuição nas funções colinérgicas (Auld et al., 2002). Atualmente os tratamentos da DA são em sua maioria baseados em inibidores da AChE, que diminuem a degradação da acetilcolina na fenda sináptica, gerando assim um aumento na transmissão colinérgica. Entretanto estes fármacos apresentam efeitos terapêuticos modestos e muitas vezes apenas temporários para os pacientes (Giacobini, 2002; Kaduszkiewicz et al., 2005). Nossos resultados mostram que não ocorrem mudanças na atividade da enzima AChE no hipocampo e no córtex pré-frontal após 18 dias da infusão de $A\beta_{1-40}$, assim como não ocorre alterações nos animais tratados com atorvastatina durante 7 dias consecutivos e no grupo atorvastatina seguido de $A\beta_{1-40}$.

Estudo realizado em humanos demonstrou que, quando um diagnóstico confiável de pacientes em estágios iniciais da doença foi disponibilizado, pesquisadores examinaram marcadores colinérgicos em cérebros humanos idosos com déficit cognitivo de média intensidade, os quais foram comparados com cérebros de pacientes com DA em estágio tardio da doença. Neste caso, foi observada uma redução dos marcadores nos pacientes em estágios tardios da DA, mas não em estágios iniciais desta patologia, levando à conclusão que a disfunção colinérgica pode não ocorrer até estágios mais avançados da doença (Davis et al., 1999, Tiraboschi et al., 2000). Em nosso modelo os animais começam a apresentar disfunção cognitiva 7 dias após a administração de $A\beta$ (Prediger et al., 2008) e os estudos bioquímicos foram feitos 18 dias após essa administração. Talvez o tempo de exposição à toxicidade do $A\beta$ ainda não tenha sido o suficiente para modificar os parâmetros na atividade enzimática da AChE, ou ainda, pode estar ocorrendo um efeito compensatório entre a atividade e a síntese desta enzima.

O estresse oxidativo em modelos e pacientes com doenças neurodegenerativas é um grande causador de um aumento da disfunção sináptica e mortalidade de células neuronais. Espécies reativas de oxigênio também podem ter um papel na deposição amilóide na DA, já que condições de oxidação causam “cross-linking” de proteínas, agregação de $A\beta$ e tau (Mariani, et al., 2005). É também sabido que agregação de $A\beta$ estimula a produção de EROs, podendo levar a um dano oxidativo cíclico. Deste modo, optamos por avaliar a atividade de

algumas enzimas antioxidantes presentes no encéfalo que possam estar atuando para uma melhora nestes parâmetros em nosso modelo de DA.

Após análise de nossos resultados observamos um aumento significativo da atividade da GR no córtex dos animais infundidos com o peptídeo β -amilóide, sendo que o pré-tratamento com atorvastatina preveniu completamente este aumento. Trabalhos já existentes na literatura mostram um aumento da atividade da GR no córtex pré-frontal de camundongos 24h após a infusão de $A\beta_{1-40}$ (Prediger et al., 2007). Com nosso trabalho mostramos que os níveis de GR continuam aumentados mesmo 18 dias após a infusão de $A\beta_{1-40}$. Isto nos levou a pensar que este aumento na atividade desta enzima em animais $A\beta$ ocorre devido a uma resposta do sistema de defesas antioxidantes do organismo em combate à EROs, já que é de amplo conhecimento que o peptídeo $A\beta$ pode acarretar em formação de radicais livres e subsequente dano oxidativo (Butterfield and Lauderback, 2002). Enquanto a reversão promovida pela atorvastatina pode ser explicada através da inibição da produção de EROs. Neste sentido já é bem demonstrado que a fluvastatina é capaz tanto de inibir a atividade da NADPH oxidase quanto de exercer função como sequestro de espécies reativas de oxigênio (Cumaoglu et al., 2011). Sendo assim, a reversão da atividade da enzima GR no córtex pré-frontal dos animais infundidos com $A\beta_{1-40}$ e pré-tratados com atorvastatina pode estar relacionada a um efeito da atorvastatina na diminuição da produção ou aumento do sequestro de radicais livres.

É bem demonstrado que 24 horas após a infusão de $A\beta_{1-40}$ ocorre aumento na produção de EROs no hipocampo (Bicca et al., 2011). Entretanto, nossos resultados demonstram que a atividade da GR em animais tratados com $A\beta_{1-40}$ não é alterada no hipocampo. Neste caso o pré-tratamento com atorvastatina em animais infundidos com $A\beta$ foi o único grupo que apresentou aumento da atividade desta enzima. Nesta região o pré-tratamento com atorvastatina promove proteção aumentando a atividade de GR, provavelmente na tentativa de combater maiores níveis de EROs provocados pela $A\beta$. Estes dados se diferenciam de resultados obtidos com o pós-tratamento desta mesma estatina, onde ela não apresentou mudanças na atividade desta enzima (Piermartiri et al., 2010). Nossos resultados mostram novamente que o pré-tratamento com estatinas se diferencia do pós-tratamento, acarretando em diferentes mudanças nos parâmetros bioquímicos que podem levar à neuroproteção.

De mesmo modo, analisamos a atividade da enzima GPx, onde o grupo $A\beta$ apresentou novamente aumento da atividade enzimática no

córtex pré-frontal, que foi também prevenido pela atorvastatina. Como a GPx participa do mesmo sistema antioxidante da GR, a mesma explicação pode ser dada neste caso. Prediger (2007) também demonstrou aumento da atividade da GPx no córtex pré-frontal de camundongos 24h após a infusão de $A\beta_{1-40}$. Nossos resultados mostram que este aumento da atividade da GPx está presente mesmo após 18 dias da infusão de $A\beta_{1-40}$ nestes animais. Em nosso ensaio da atividade da GPx no hipocampo de camundongos, não encontramos diferença estatística entre grupos.

Resumindo, podemos observar que a infusão de $A\beta_{1-40}$ promove déficit cognitivo na tarefa de realocação de objeto, sendo o pré-tratamento com atorvastatina capaz de prevenir este déficit. Adicionalmente demonstramos que o $A\beta_{1-40}$ promove diminuição da captação de glutamato, sendo que o pré-tratamento com atorvastatina possui uma tendência de aumentar a liberação deste mesmo neurotransmissor. Por outro lado, a atividade da enzima acetilcolinesterase não esta alterada em nenhum grupo, o que nos leva a pensar que o sistema colinérgico possa estar envolvido em uma fase posterior da toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em nosso protocolo experimental. Além disso, vimos que o $A\beta_{1-40}$ provoca um aumento na atividade da GR e GPx no córtex pré-frontal de camundongos, onde a atorvastatina reverte esse aumento. Com este trabalho, mostramos que o pré-tratamento com atorvastatina apresenta um papel na melhora de déficits de memória e aprendizagem de camundongos submetidos à infusão com o peptídeo $A\beta_{1-40}$, podendo ser uma opção de fármaco não apenas para o tratamento desta doença, mas também para possível prevenção.

7. CONCLUSÃO

O pré-tratamento com atorvastatina preveniu o déficit cognitivo observado 14 dias após a administração do peptídeo β -amilóide (i.c.v.) na tarefa de realocação de objetos, mostrando-se um fármaco com possível potencial na prevenção de doenças que apresentam disfunção na memória e no aprendizado, como a doença Alzheimer;

A infusão de $A\beta_{1-40}$ provoca uma diminuição na captação de glutamato, que não é prevenida pelo pré-tratamento com atorvastatina. Além disso, a infusão deste peptídeo não altera significativamente a liberação deste neurotransmissor e a atividade da glutamina sintetase 18 dias após a injeção i.c.v. do peptídeo;

Quando comparado apenas o pré-tratamento, a atorvastatina promove um aumento na liberação deste neurotransmissor em relação aos grupos salinas, este aumento de glutamato na fenda pode estar promovendo uma melhora nos déficits cognitivos induzidos pelo $A\beta_{1-40}$;

O pré-tratamento com atorvastatina preveniu o aumento da atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase e glutathione peroxidase induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo β -amilóide no córtex pré-frontal de camundongos, mas não no hipocampo destes animais, mostrando um possível efeito da atorvastatina na diminuição da produção ou aumento do sequestro de radicais livres.

PERSPECTIVAS

Determinar se o pré-tratamento de camundongos com atorvastatina apresenta ação na viabilidade e/ou morte celular em fatias hipocámpais e corticais após infusão do peptídeo β -amilóide;

Avaliar a ação da atorvastatina em um estudo temporal da atividade colinérgica em no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos a infusão do peptídeo β -amilóide;

Verificar a ação da atorvastatina sobre a formação de espécies reativas de oxigênio no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos a infusão do peptídeo β -amilóide;

Avaliar se o pré-tratamento de camundongos com atorvastatina exerce papel neuroprotetor frente à sinaptotoxicidade após infusão do peptídeo β -amilóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, E.E., IKONOMOVIC, M.D., DIXON, C.E., DEKOSKY, S.T. Simvastatin therapy prevents brain trauma-induced increases in beta-amyloid peptide levels. *Ann. Neurol.* 66(3):407-414, 2009.

ARENDASH, G.W., KING, D.L., GORDON, M.N., MORGAN, D., HATCHER, J.M., HOPE, C.E., DIAMOND, D.M. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* 891:42-53, 2001.

ARENDASH, G. W., JENSEN, M. T., SALEM, N. JR., HUSSEIN, C N., CRACCHIOLO, J., DICKSON, A., LEIGHTYB, R., POTTER, H. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience* 149:286-302, 2007.

AULD, D.S., KORNECOOK, T.J., BASTIANETTO, S., QUIRION, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* 68:209-245, 2002.

BARTUS, R.T., DEAN III, R.L., BEER, B., LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-417, 1982.

BARTUS, R.T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163:495-529, 2000.

BICCA, M.A., FIGUEIREDO, C.P., PIERMARTIRI, T.C., MEOTTI, F.C., BOUZON, Z.L., TASCA, C.I., MEDEIROS, R., CALIXTO, J.B. The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl -deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid- β in mice. *Neuroscience.* 192:631-641, 2011.

BINDER, S., BAIER, P.C., MÖLLE, M., INOSTROZA, M., BORN, J., MARSHALL, L. Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats. *Neurobiol. Learn Mem.* 97(2):213-219, 2012.

BISSETTE, G., SEIDLER, F.J., NEMEROFF, C.B., SLOTKIN, T.A. High affinity choline transporter status in Alzheimer's disease tissue from rapid autopsy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 777:197-204, 1996.

BLENNOW, K., DE LEON, M.J., ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *Lancet* 368(9533):387-403, 2006.

BONDE, C., SARUP, A., SCHOUSBOE, A., GEGELASHVILI, G., ZIMMER, J., NORABERG, J. Neurotoxic and Neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem. Int.* 43:371-380, 2003.

BRAAK, H., BRAAK, E., BOHL, J., BRATZKE, H. Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J. Neural Transm. Suppl.* 54:97-106, 1998.

BUTTERFIELD, D. A., LAUDERBACK, C. M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid- β -peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32:1050-1060, 2002.

CAMACHO, A. & MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia its relation to neuronal death. *Arch. Med. Res.* 37:11-18, 2006.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-490, 1985.

CASSANO, T., SERVIDDIO, G., GAETANI, S., ROMANO, A., DIPASQUALE, P., CIANCI, S., BELLANTI, F., LACONCA, L., ROMANO, A.D., PADALINO, I., LAFERLA, F.M., NICOLETTI, F., CUOMO, V., VENDEMIALE, G. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging.* 27 de outubro, 2011. [online]

CHONG, Y. Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sci.* 61:2323-2333, 1997.

COTMAN, C.W., BERCHTO, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25(6):295-301, 2002.

CUMAOGLU, A., OZANSOY, G., IRAT, A.M., ARICIOGLU A., KARASU, C., NURAY ARI, N. Effect of long term, non cholesterol lowering dose of fluvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 654:80-85, 2011.

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

DAVIES, P., MALONEY, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 8000:1403, 1976.

DAVIS, K.L., MOHS, R.C., MARIN, D., PUROHIT, D.P., PERL, D.P., LANTZ, M. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.* 281:1401-1406, 1999.

DEKOSKY, S.T., IKONOMOVIC, M.D., STYREN, S.D., BECKETT, L., WISNIEWSKI, S., BENNETT, D.A., COCHRAN, E.J., KORDOWER, J.H., MUFSON, E.J. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 51:145-155, 2002.

DEMURO, A., PARKER, I., STUTZMANN, G.E. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 285(17):12463-12468, 2010.

DOMOKI, F., KIS, B., GASPAR, T., SNIPES, J.A., BARI, F., BUSIJA, D.W. Rosuvastatin induces delayed preconditioning against L-glutamate excitotoxicity in cultured cortical neurons. *Neurochem. Int.* 56:404-409, 2010.

EL KHOURY, J., HICKMAN, S. E., THOMAS, C. A., CAO, L., SILVERSTEIN, S. C., LOIKE, J. D. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382:716-719, 1996.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. Jr, FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95, 1961.

FURUKAWA-HIBI, Y., ALKAM, T., NITTA, A., MATSUYAMA, A., MIZOGUCHI, H., SUZUKI, K., MOUSSAOUI, S., YU, Q.S., GREIG, N.H., NAGAI, T., YAMADA, K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. *Behav. Brain Res.* 225(1):222-229, 2011.

GARCÍA-AYLLÓN, M.S., RIBA-LLENA, I., SERRA-BASANTE, C., ALOM, J., BOOPATHY, R., SÁEZ-VALERO, J. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. *PLoS One* 5(1):8701, 2010.

GARCÍA-AYLLÓN, M.S., SMALL, D.H., AVILA, J., SÁEZ-VALERO, J. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β -Amyloid. *Front. Mol. Neurosci.* 4:22, 2011.

GEARING, M., MIRRA, S.S., HEDREEN, J.C., SUMI, S.M., HANSEN, L.A., HEYMAN, A. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 45(3 Pt 1):461-466, 1995.

GEGELASHVILI, G., SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* 52:6-15, 1997.

GIACOBINI, E. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease. *J. Neural Transm.* 62:181-187, 2002.

GIOVANNELLI, L., CASAMENTI, F., SCALI, C., BARTOLINI, L., PEPEU, G. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* 66(4):781-792, 1995.

GITTER, B.D., COX, L.M., RYDEL, R.E., MAY, P.C. Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10738-10741, 1995.

GLENNER, G.G., WONG, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120(3):885-890, 1984.

GORELICK, P.B. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke* 35(11 Suppl 1):2620-2622, 2004.

GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y.C., QUINLAN, M., WISNIEWSKI, H.M., BINDER, L.I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4913-4917, 1986.

HAASS, C., SELKOE, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:101-112, 2007.

HARDY, J.A., HIGGINS, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054):184-185, 1992.

HARKANY, T., MULDER, J., SASVÁRI, M., ABRAHÁM, I., KÓNYA, C., ZARÁNDI, M., PENKE, B., LUITEN, P.G., NYAKAS, C. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 6(2):109-121, 1999.

HARRIS, M. E., WANG, Y., PEDIGO, N. W. Jr., HENSLEY, K., BUTTERFIELD, D. A., CARNEY, J. M. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 67(1):277-286, 1996.

HARTMANN, T., KUCHENBECKER, J., GRIMM, M.O.W. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem.* 103:159–170, 2007.

HECKERS, S., GEULA, C., MESULAM, M.M. Acetylcholinesterase-rich pyramidal neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13:455–460, 1992.

HUNTER, A.J., MACKAY, K.B., ROGERS, D.C. To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends Pharmacol. Sci.*, 19:59–66, 1998.

JICK, H., ZORNBERG, G. L., JICK, S. S., SESHADRI, S., DRACHMAN, D. A. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356: 1627-1631, 2000.

KADUSZKIEWICZ, H., ZIMMERMANN, T., BECK-BORNHOLDT, H.P., VAN DENBUSSCHE, H. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ* 331:321–327, 2005.

KURINAMI, H., SATO, N., SHINOHARA, M., TAKEUCHI, D., TAKEDA, S., SHIMAMURA, M., OGIHARA, T., MORISHITA, R. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int. J. Mol. Med.* 21(5):531-537, 2008.

LEE, J-K., WON, J-S., SINGH, A.K., SINGH, I. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci. Lett.* 440: 260–264, 2008.

LEVY-LAHAD, E., LAHAD, A., WIJSMAN, E.M., BIRD, T.D., SCHELLENBERG, G.D. Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 38(4):678-680, 1995.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New Engl. J. Med.* 330: 613-622, 1994.

LONGENBERGER, J., SHAH, Z.A. Simvastatin and other HMG-CoA reductase inhibitors on brain cholesterol levels in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 8(4):434-442, 2011.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

LU, D., GOUSSEV, A., CHEN, J., PANNU, P., LI, Y., MAHMUD, A., CHOPP, M. Atorvastatin Reduces Neurological Deficit and Increases Synaptogenesis, Angiogenesis, and Neuronal Survival in Rats Subjected to Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 21(1): 21-32, 2004.

LUCHSINGER, J.A., MAYEUX, R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6(4):261-266, 2004.

MARIANI, E., POLIDORI, M.C., CHERUBINI, A., MECOCCHI, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed Life Sci.* 827:65-75, 2005.

MATTSON, M.P. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann. Intern. Med.* 139(5 Pt 2):441-444, 2003.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639, 2004.

MEDEIROS, R., PREDIGER, R. D., PASSOS, G. F., PANDOLFO, P., DUARTE, F. S., FRANCO, J. L., DAFRE, A. L., DI GIUNTA, G., FIGUEIREDO, C. P., TAKAHASHI, R. N., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J. Neurosci.* 27(20):5394-5404, 2007.

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

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

MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J.L., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem. Res.* 30:83-89, 2005.

MOLZ, S., DAL-CIM, T., DECKER, H., TASCA, C.I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1231:113-120, 2008.

MOUNT, C., DOWNTON, C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nat. Med.* 12(7):780-784, 2006.

NATH, N., GIRI, S., PRASAD, R., SINGH, A.K., SINGH, I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J. Immunol.* 172:1273-1286, 2004.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry – 3rd ed. *New York, Worth Publishers* 799-814, 2000.

NITTA, A., KATONO, Y., ITOH, A., HASEGAWA, T., NABESHIMA, T. Nicotine reverses scopolamine-induced impairment of performance in passive avoidance task in rats through its action on the dopaminergic neuronal system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49(4):807-812, 1994.

OBRENOVITCH, T. P. & URENJAK, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51:39-87, 1997.

PAINTLIA, A.S., PAINTLIA, M.K., KHAN, H. M., VOLMER, T., SINGH, A.K., SINGH, I. HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis. *FASEBJ* 19:1407-1421, 2005.

PANNU, R., CHRISTIE, D.K., BARBOSA, E., SINGH, I., SINGH, A. K. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury *J. Neurochem.* 101:182–200, 2007.

PERRY, E.K., PERRY, R.H., BLESSED, G., TOMLINSON, B.E. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 1:189, 1977.

PIERMARTIRI, T. C. B., VANDRESEN-FILHO, S., DE ARAÚJO HERCULANO, B., MARTINS, W. C., DAL'AGNOLO, D., STROEH, E., CARQUEJA, C. L., BOECK, C. R., TASCA, C. I. Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death Due to Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice by Increasing Akt phosphorylation and Glutamate Uptake. *Neurotox Res.* 16(2):106-115, 2009.

PIERMARTIRI, T. C. B., FIGUEIREDO, C. P., RIAL, D., DUARTE, F. S., BEZERRA, S. C., MANCINI, G., DE BEM, A. F., PREDIGER, R. D. S., TASCA, C. I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp. Neurol.* 226(2):274-284, 2010.

POIRIER, J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26(3):355–361, 2005.

PREDIGER, R. D., FRANCO, J. L., PANDOLFO, P., MEDEIROS, R., DUARTE, F. S., DI GIUNTA, G., FIGUEIREDO, C. P., FARINA, M., CALIXTO, J. B., TAKAHASHI, R. N., DAFRE, A. L. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav. Brain Res.* 177(2):205-213, 2007.

PREDIGER, R. D., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P., DUARTE, F. S., PASSOS, G. F., PESQUERO, J. B., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B., TAKAHASHI, R. N. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151(3):631-643, 2008.

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

QUINTANILLA, R.A., ORELLANA, D.I., GONZALEZ, C., MACCIONI, R.B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* 295:245-257, 2004.

REISS, A.B., SILLER, K.A., RAHMAN, M.M., CHAN, E.S., GHISO, J., DE LEON, M.J. "Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease". *Neurobiol. Aging* 25(8):977-989, 2004.

RITCHIE, K., LOVESTONE, S. The dementias. *Lancet* 360(9347):1759-1766, 2002.

ROSSI, DJ., OSHIMA, T., ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321, 2000.

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

SCHLIEBS, R., ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 113:1625–1644, 2006.

SHAPIRO, B.M., STADTMAN, E.R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 24:501-524, 1970.

SHARKEY, K., KELLY, J. S., BUTCHER, S.P. Inflammatory Responses to Cerebral Ischemia: Implications for Stroke Treatment. *Clinical Pharmacology in Cerebral Ischemia (Ter Horst, G.J., Korf, J., eds) Human Press* 235-263, 1997.

SHINOTOH, H., NAMBA, H., FUKUSHI, K., NAGATSUKA, S., TANAKA, N., AOTSUKA, A., TANADA, S., ANDIRIE, T. Brain acetylcholinesterase activity in Alzheimer disease measured by positron emission tomography. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 14(Suppl.1):114–118, 2000.

SLOTKIN, T.A., NEMEROFF, C.B., BISSETTE, G., ANDSEIDLER, F.J. Overexpression of the high affinity choline transporter in cortical regions affected by Alzheimer's disease. Evidence from rapid autopsy studies. *J. Clin. Invest.* 94:696–702, 1994.

STANIMIROVIC, D.B., BALL, R., SMALL, D.L., MURUGANANDAM, A. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocyte cultures differentiated in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17(3):173-184, 1999.

STANISLAUS, R., PAHAN, K., SINGH, A.K., SINGH, I. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci. Lett.* 269: 71–74, 1999.

STRUZYNSKA, L., CHALIMONIUK, M., SULKOWSKI, G. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain. *Neurochem. Int.* 47:326-333, 2005.

TAKEDA, S., SATO, N., NIISATO, K., TAKEUCHI, D., KURINAMI, H., SHINOHARA, M., RAKUGI, H., KANO, M., MORISHITA, R. Validation of A β 1-40 Administration into Mouse Cerebroventricles as an animal Model for Alzheimer Disease. *Brain Res.* 1280:137-147, 2009.

TIRABOSCHI, P., HANSEN, L.A., ALFORD, M., MASLIAH, E., THAL, L.J., COREY-BLOOM, J. The decline in synapses and cholinergic activity in asynchronous Alzheimer's disease. *Neurol.* 55:1278–1283, 2000.

TRAMONTINA, A.C., WARTCHOW, K.M., RODRIGUES, L., BIASIBETTI, R., QUINCOZES-SANTOS, A., BOBERMIN, L., TRAMONTINA, F., GONÇALVES, C.A. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J. Neural Transm.* 118(11):1641-1649, 2011.

TROTTI, D., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19:328-334, 1998.

UYLINGS, H.B., DE BRABANDER, J.M. Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. *Brain Cogn.* 49(3):268-276, 2002.

VAN DAM, D., DE DEYN, P.P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(11):956-70, 2006.

WAGNER CARBOLIN MARTINS Estudo de Agentes Neuroprotetores em um Modelo de Isquemia Cerebral *in vitro*. *Trabalho de Conclusão de Curso - UFSC*. 2009

WALSH, D.M., SELKOE, D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 44:181-193, 2004.

WATERS, D.D. Safety of high-dose atorvastatin therapy. *Am. J. Cardiol.* 96(5A):69-75, 2005.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77:325-333. 1981.

WHITFIELD, J.F. Can statins put the brakes on Alzheimer's disease? *Expert Opin. Investig. Drugs.* 15:1479-1485, 2006.

WOLOZIN, B., KELLMAN, W., RUOSSEAU, P., CELESIA, G. G., SIEGEL, G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57:1439-1443, 2000.

YAN, Z., FENG, J. Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and β -amyloid. *Curr. Alzheimer Res.* 1:241-248, 2004.