



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO BIOQUÍMICO E COMPORTAMENTAL EM CAMUNDONGOS

SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DOS

PEPTÍDEOS BETA-AMILÓIDE $A\beta_{1-40}$ E $A\beta_{25-35}$ E O PAPEL

NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA

Tetsadê C.B. Piermartiri

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

Florianópolis, Fevereiro de 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO BIOQUÍMICO E COMPORTAMENTAL EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DOS
PEPTÍDEOS BETA-AMILÓIDE A β ₁₋₄₀ E A β ₂₅₋₃₅ E O PAPEL
NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA**

Tetsadê C.B. Piermartiri

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

Dissertação apresentada como quesito parcial para obtenção de grau de Mestre pelo Programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Carina – UFSC.

Florianópolis, Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus agradecimentos:

À professora Carla Inês Tasca, pela orientação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho,

Ao professor Rui Prediger, pelo seu apoio, comentários e sugestões que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho,

À professora Andreza de Bem e seu aluno Gianni, pela sua colaboração nos experimentos realizados neste trabalho,

Ao professor João Batista Calixto, pelo uso de materiais do seu laboratório,

À professora Andréa Trentin, pelo uso do microscópio,

Aos colegas de laboratório Tharine, Samuel, Bruno, Ellen, Denis, Ana e Suely pela amizade e ajuda durante o mestrado,

À recente amiga, Cláudia que possibilitou a finalização destes experimentos,

Aos membros da banca examinadora por suas sugestões,

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento CNPQ que proporcionaram os meios para a realização deste trabalho.

A Jesus, que colocou todos estes no meu caminho para que eu pudesse realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1 INTRODUCAO	
1.1. Doença de Alzheimer.....	9
1.2. O peptídeo A β e o sistema glutamatérgico.....	13
1.3. O peptídeo A β e o estresse oxidativo.....	17
1.4. Mediadores inflamatórios na Doença de Alzheimer.....	20
1.5. As estatinas.....	22
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivos Geral.....	27
3.1.1 Objetivos Específicos.....	27

4 MATERIAIS E METODOS

4.1. Materiais

4.1.1 Equipamentos.....	28
4.2 Animais.....	29
4.3 Infusão intracerebroventricular.....	29
4.4 Tratamento com Atorvastatina.....	30
4.5 Avaliação comportamental.....	31
4.6 Imunohistoquímica.....	32
4.7 Preparação e incubação das fatias de hipocampo.....	34
4.8 Ensaio da Captação de L-[³ H] glutamato.....	35
4.9 Parâmetros de estresse oxidativo	
4.9.1 Determinação de grupos tiois não protéicos (NPSH).....	35
4.9.2 Determinação dos níveis de TBARS.....	36
4.9.3 Dosagem de proteínas.....	37
4.10 Avaliação de viabilidade celular.....	37
4.11 Quantificação de morte celular.....	38
4.12 Análise Estatística.....	38

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do dano cognitivo induzido pelos peptídeos A β 25-35 e A β 1-40 e os efeitos do tratamento com atorvastatina.....	39
5.2 Avaliação da captação de glutamato em fatias hipocampais obtidas de camundongos tratados com os peptídeos A β 25-35 e A β 1-40 e atorvastatina.....	41

5.3 Expressão dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1 no hipocampo de camundongos tratados com A β 25-35 e A β 1-40 e atorvastatina.....	42
5.4 Avaliação do estresse oxidativo e os efeitos do tratamento com atorvastatina.....	45
5.5 Avaliação do dano celular e o papel neuroprotetor da atorvastatina.....	47
5.6 Detecção da ativação de células gliais no hipocampo de camundongos tratados com A β 25-35 e A β 1-40 e atorvastatina	50
5.7 Expressão da proteína inflamatória COX-2 no hipocampo de camundongos tratados com A β 25-35 e A β 1-40 e atorvastatina.....	52
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Geração do peptídeo A β	11
Figura 2. Esquema da transmissão glutamatérgica.....	14
Figura 3. Estresse oxidativo e A β	19
Figura 4. Efeitos reportados dos NSAIDs com respeito a doença de Alzheimer e produção do peptídeo A β	21
Figura 5. Efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	23
Figura 6. Esquema da seqüência de procedimentos realizados no protocolo experimental.....	30
Figure 7. Avaliação comportamental no Labirinto aquático de Morris, 16 dias após a infusão do peptídeo A β 1-40 e A β 25-35.....	40
Figure 8. Avaliação captação de glutamato em fatias de hipocampo de camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo A β 1-40 e A β 25-35.....	41
Figura 9. Efeito dos peptídeos A β 25-35 ou A β 1-40 e da atorvastatina sobre a expressão dos transportadores glutamatérgicos.....	43
Figura 10. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo NPSH e TBARS em camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo A β 1-40 e A β 25-35.....	46
Figure 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo A β 1-40 e A β 25-35.....	47
Figura 12. Quantificação de morte celular 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo A β 1-40 e A β 25-35 em fatias de hipocampo de camundongos.....	49
Figura 13. Avaliação da ativação de células gliais pela detecção de GFAP no hipocampo de camundongos.....	51

Figura 14. Efeito dos peptídeos A β 1-40 ou A β 25-35 e da atorvastatina sobre a expressão da proteína inflamatória COX-2.....53

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Anticorpos primários usados para imunohistoquímica.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

A β : beta-amiloide

Akt : proteína quinase B

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-isoxazole

ATP: adenosina-5'-trifosfato

DNA: acido desoxirribonucléico

GLAST: Transportador de glutamato-aspartato

GLT -1: Transportador de glutamato-1

HEPES: acido hidroxietil piperazina etanosulfonico

HMG-CoA: 3- hidroxi -3-methylglutaril coenzima A

IP: iodeto de Propideo

KRB: Tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPSH: tiois não protéicos

PI3-K: proteína quinase dependente de fosfatidil inositol

TBARS : substancias reativas ao acido tiobarbitúrico

RESUMO

O acúmulo e a agregação do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer resultam em ativação de células gliais, que por sua vez pode iniciar respostas inflamatórias, produção de proteínas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. Essas alterações deixam mais vulneráveis transportadores glutamatérgicos, podendo resultar em diminuição da suas funções. Neste trabalho foram estudados os efeitos da infusão intracerebroventricular dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$, sobre memória espacial, captação de L- $[^3H]$ glutamato, estresse oxidativo, inflamação e morte celular em camundongos. O peptídeo $A\beta_{1-40}$ demonstrou ser mais potente que o $A\beta_{25-35}$, de acordo com as metodologias estudadas, induzindo morte celular e produção da proteína inflamatória COX-2. A infusão de ambos os peptídeos $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ causaram prejuízo cognitivo, diminuição da captação de L- $[^3H]$ glutamato e de transportadores GLAST e GLT-1, aumento de peroxidação lípidica e diminuição de NPSH, além da ativação de células da glia. No intuito de procurar abordagens neuroprotetoras, a atorvastatina, inibidor da enzima HMG-CoA redutase, foi administrada durante 7 dias nos animais que receberam a infusão dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$. O tratamento com atorvastatina (10 mg/Kg/dia) não foi capaz de reverter o prejuízo cognitivo e a diminuição da captação de glutamato, mas se mostrou neuroprotetor contra a morte celular, aumentando a expressão de transportadores glutamatérgicos e diminuindo mediadores inflamatórios e TBARS. Portanto, a atorvastatina apresenta um potencial efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida pelos peptídeos beta-amilóide.

ABSTRACT

The accumulation and aggregation of beta-amyloid peptide ($A\beta$) in brain of patients with Alzheimer's disease results in activation of glial cells, which in turn may initiate inflammatory responses, release of inflammatory proteins and reactive oxygen species. These changes leave more vulnerable glutamatergic transporters and may result in reduction of their functions. In this study, the effects of intracerebroventricular infusion of peptides $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{25-35}$, on cognition, uptake of L-[3H] glutamate, oxidative stress, inflammation and cell death in mice were evaluated. The peptide $A\beta_{1-40}$ appears to be more potent than the $A\beta_{25-35}$, according to the methods studied, causing cell death and production of the inflammatory COX-2 protein. The infusion of both peptides $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{25-35}$ caused cognitive impairment, decreased uptake of L-[3H] glutamate and transporters GLAST and GLT-1, increased lipid peroxidation and reduction in NPSH and activation of glial cells. In order to seek neuroprotective approaches, atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, was administered for 7 days in animals that received infusion of peptides $A\beta_{1-40}$ or $A\beta_{25-35}$. Treatment with atorvastatin (10 mg/Kg/day) was not able to reverse the cognitive decline and decreased uptake of glutamate, but was neuroprotective against cell death by increasing the expression of glutamatergic transporters, decreasing inflammatory mediators and TBARS. Thus, atorvastatin has a potential neuroprotective effect against toxicity induced by beta-amyloid peptides.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência entre os idosos. A estimativa é que 10% dos idosos americanos com 65 anos e 50% com 85 anos desenvolvam essa doença. A DA é atualmente a terceira doença mais dispendiosa tratada nos Estados Unidos da América, custando perto de 100 bilhões de dólares anuais para a sociedade ([http://: www.alz.org](http://www.alz.org)). No Brasil, ainda não existem estudos com a incidência e prevalência da doença de Alzheimer.

A maior parte dos casos da DA (90 % a 95 %) é de início tardio e está relacionada a diversos fatores de risco, como o avanço da idade, sexo feminino, baixo nível educacional, tabagismo (Cankurtaran, Yavuz *et al.*, 2008), polimorfismo da apolipoproteína E (ApoE) e doenças graves, como diabetes mellitus, hipertensão e hipercolesterolemia (Casserly e Topol, 2004).

Embora a maioria dos casos da DA ocorra esporadicamente, a enfermidade é herdada por um padrão autossômico dominante em uma pequena fração de pacientes (cerca de 1 %) (Rogaeva, Kawarai *et al.*, 2006). Quatro genes têm sido associados com o desenvolvimento da doença, sendo que mutações em genes codificadores para a proteína precursora do peptídeo beta-amilóide (APP, do inglês amyloid precursor protein), presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2) são responsáveis pelos casos de DA de início precoce (Tanzi e Bertram, 2001), enquanto o gene da ApoE $\epsilon 4$ encontra-se associado com a forma mais comum da DA de início tardio (Lahiri, Sambamurti *et al.*, 2004).

A DA é uma enfermidade caracterizada por progressiva deterioração da memória e cognição, apresentando mudanças neuropatológicas específicas, incluindo placas senis, emaranhados neurofibrilares e prejuízo nas sinapses (Selkoe, 2001).

As placas senis são depósitos extracelulares de fibrilas e agregados amorfos de peptídeo beta-amilóide ($A\beta$, do inglês amyloid beta), que possui essencialmente 40 ou 42 aminoácidos (Glenner e Wong, 1984). Emaranhados neurofibrilares são agregados fibrilares intracelulares da proteína tau associada aos microtúbulos, a qual exibe hiperfosforilação e modificações oxidativas. As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente nas regiões do cérebro envolvendo aprendizado e memória e comportamento emocional, como o córtex entorrinal, hipocampo, cérebro anterior e amígdala (Mattson, 2004).

O $A\beta$ é gerado pela clivagem da proteína precursora amilóide (APP) (Figura 1). O APP é uma proteína transmembrana que no processo normal (ou via não-amiloidogênica) é clivado primeiramente pela α -secretase e então pela γ -secretase, gerando um fragmento p3 não tóxico. Na via amiloidogênica, a APP é inicialmente clivada pela β -secretase, identificada como uma protease aspártica BACE (do inglês, β -site APP-cleaving enzyme), que produz $APP\beta$ (sAPP β) e um β - fragmento C- terminal (CTF β). CTF β é então clivado pela γ -secretase que produz CTF γ e fragmento $A\beta$ (Shaw, Korecka *et al.*, 2007).

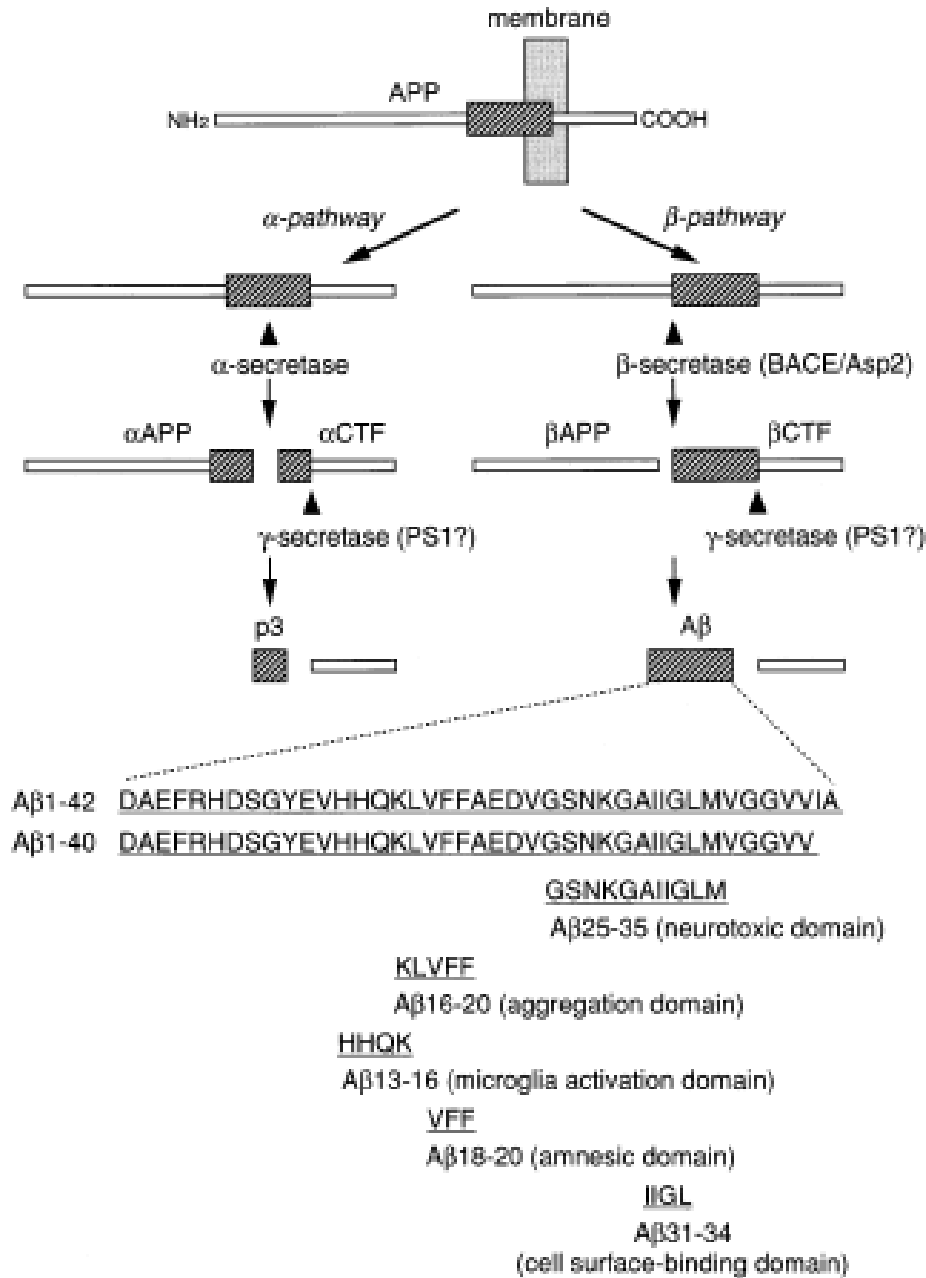


Figura 1. Geração do peptídeo Aβ. No processo normal a APP é sequencialmente clivada pela α-secretase (esquerda), quando ocorre a clivagem pela BACE, produz o peptídeo neurotóxico de 40 -42 aminoácidos (direita) (Yamada e Nabeshima, 2000)

O acúmulo e a agregação deste pequeno peptídeo hidrofóbico iniciam uma lenta, mas mortal cascata amiloidogênica que induz ativação da microglia e astrócitos, alterações sinápticas, modificação da proteína tau solúvel em oligômeros formando filamentos insolúveis e perda neuronal progressiva com prejuízo cognitivo (Haass e Selkoe, 2007).

As alterações sinápticas no progresso da patologia amiloidogênica envolvem prejuízos nos sistemas de neurotransmissores dos terminais pré-sinápticos, onde o sistema colinérgico parece ser primeiramente afetado, seguido pelo sistema glutamatérgico e finalmente os terminais gabaérgicos (Bell e Claudio Cuello, 2006).

As propriedades neurotóxicas do peptídeo A β de 40 e 42 aminoácidos permitiu aos pesquisadores que ele fosse usado como um modelo *in vivo* para o estudo dos mecanismos patofisiológicos do desenvolvimento da DA, provendo uma alternativa aos modelos baseados em animais transgênicos (McDonald e Overmier, 1998).

Adicionalmente ao A β 40 e A β 42, as placas senis também contêm outras formas truncadas de A β , incluindo o A β ₂₅₋₃₅ (Liao, Tzeng *et al.*, 2007), que têm sido frequentemente utilizado para mimetizar propriedades neurodegenerativas de agregação e toxicidade (Freir, Costello *et al.*, 2003; Holscher, Gengler *et al.*, 2007).

Recentes estudos têm demonstrado que uma única administração intracerebroventricular de A β ₂₅₋₃₅ induz a um prejuízo significativo na memória espacial e na memória de trabalho com diminuição no número de neurônios, principalmente na área CA1 do hipocampo de ratos (Stepanichev, Zdobnova *et al.*, 2004; Stepanichev, Zdobnova *et al.*, 2006).

O peptídeo A β pode ter outros efeitos deletérios alterando a homeostase dos íons cálcio (Ca²⁺), por inibir captação de Ca²⁺ no retículo endoplasmático (Ferreiro, Oliveira *et al.*, 2004), ou por aumentar a atividade de canais de Ca²⁺ do tipo L (Rovira, Arbez *et al.*, 2002).

1.2 O peptídeo A β e o sistema glutamatérgico

Parte dos efeitos neurotóxicos do peptídeo A β pode está relacionado com a modulação do sistema glutamatérgico.

O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, e uma vez liberado na fenda sináptica ativa seus receptores de membrana ionotrópicos e metabotrópicos encontrado por todo o sistema nervoso central (SNC) com intensos efeitos na excitabilidade neural (Figura 2).

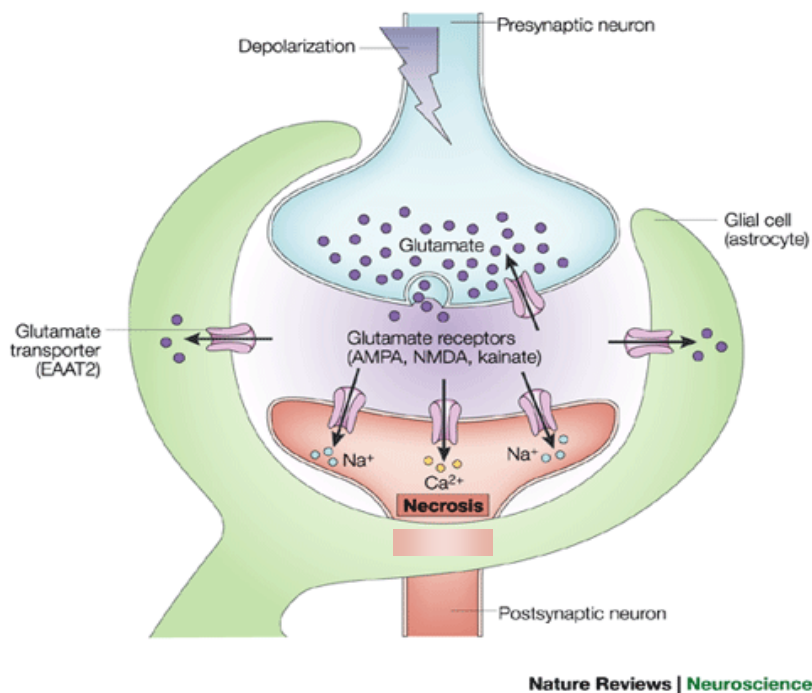


Figura 2. Esquema da transmissão glutamatérgica. O impulso nervoso causa a liberação de glutamato do neurônio pré-sináptico. Uma vez na fenda sináptica ele pode se unir aos receptores na membrana pós-sináptica ou ser recaptado através da ação de transportadores glutamatérgicos (Syntichaki e Tavernarakis, 2003).

Os receptores metabotrópicos estão acoplados a proteínas G e são classificados em 8 subtipos: mGluR1 ao 8. Eles foram identificados e divididos em 3 grupos (I, II e III), baseados na homologia da seqüência de aminoácidos, vias de transdução de sinais e seletividade farmacológica (Kenny e Markou, 2004).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes da ativação por ligantes específicos. Três subgrupos de receptores ionotrópicos têm sido identificados por suas afinidades com agonistas sintéticos. Os receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico) são responsáveis pela reação inicial de glutamato na sinapse (Dingledine, Borges *et al.*, 1999). Sua ativação abre os poros permitindo o fluxo de Na⁺ para dentro, resultando em despolarização da membrana neuronal. Estes receptores estão localizados principalmente no hipocampo, na região CA1 e no córtex cerebral e são essenciais durante a potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), ambos correlacionados com a regulação da memória (Carroll, Lissin *et al.*, 1999; Hayashi, Shi *et al.*, 2000). Os receptores de cainato (KA) contribuem para corrente excitatória pós-sináptica em várias regiões do sistema nervoso central incluindo o hipocampo, córtex, medula espinal e retina. Em alguns casos, receptores pós-sinápticos de cainato são co-distribuídos com os receptores AMPA e NMDA (Huettner, 2003).

Os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) estão localizados principalmente no cérebro anterior e na região CA1 do hipocampo. Este receptor possui várias subunidades denominadas NR1 (onde se liga a glicina), NR2A-D (onde se liga o GLU) e NR3A-B. A combinação de duas subunidades NR1 com duas subunidades NR2 compõem os receptores presentes em maior número no SNC (Boulter, Hollmann *et al.*, 1990). O potencial de repouso deste receptor é

mantido por um íon Mg^{+2} . Quando ocorre despolarização da membrana há a passagem de íons Ca^{2+} através do receptor (Ozawa, Kamiya *et al.*, 1998).

A ativação excessiva de receptores NMDA, que ocorre durante o evento conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica, faz com que grandes quantidades de Ca^{+2} extracelular passem para o interior da célula, alterando a homeostase deste íon, o que pode resultar na ativação de proteases, lípases, fosfatases e endonucleases que medeiam morte celular (Ozawa, Kamiya *et al.*, 1998; Arundine e Tymianski, 2003). Além disso, a elevada concentração de Ca^{+2} pode induzir estresse oxidativo (Mattson, 2003) através da ativação de oxigenases, perturbação do Ca^{2+} mitocondrial e metabolismo energético (Mattson, 2007).

Recentes trabalhos demonstraram que a ação do peptídeo $A\beta$, pode alterar a função e reduzir a expressão de receptores AMPA na superfície da membrana. O $A\beta$ parece também modular receptores NMDA assim como receptores metabotrópicos o que pode levar à disfunção sináptica, resultando em neurodegeneração excitotóxica durante a progressão da DA (para revisão ver: (Parameshwaran, Dhanasekaran *et al.*, 2008).

Para prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica, o glutamato é removido do espaço extracelular por transportadores (EAATs, do inglês excitatory aminoacid transporters) presentes na membrana plasmática de astrócitos e neurônios, que possuem a função de terminar a transmissão glutamatérgica e manter baixas as concentrações de glutamato na fenda sináptica. O glutamato captado por astrócitos é convertido em glutamina pela ação da glutamina-sintase (Torres e Amara, 2007). O transporte de Glu por EAAT envolve o co-transporte de 3 íons Na^{+} e 1 H^{+} , e o transporte contrário de 1 K^{+} permitindo aos EAATs manter um gradiente de concentração através da membrana celular, utilizando a energia gerada pela Na^{+} - K^{+} -ATPase (Danbolt, 2001); (Kanai e Hediger, 2003; Shigeri, Seal *et al.*, 2004).

Cinco tipos de transportadores foram identificados. Os transportadores descritos em roedores e considerados transportadores gliais, GLAST (glutamate-aspartate transporter, homólogo humano EAAT1) e GLT-1 (glutamate transporter-1, homólogo humano EAAT2) (Danbolt, 2001). E o transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro, o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3), encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos clonados incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e EAAT5, localizado em neurônios retinianos (Danbolt, 2001) (Beart e O'shea, 2007).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o peptídeo A β é capaz de inibir a atividade de transportadores glutamatérgicos e da Na⁺-K⁺-ATPase o que resulta em elevadas concentrações neurotóxicas de glutamato (Gu, Zhao *et al.*, 2004);(Matos, Augusto *et al.*, 2008)

Além disso, o peptídeo A β pode causar estresse oxidativo, gerando radicais livres e produtos da peroxidação lipídica (Shen, Xu *et al.*, 2002); (Zeng, Chen *et al.*, 2004);(Jang, Piao *et al.*, 2007) que são capazes de danificar a mitocôndria e inibir a atividade dos transportadores de glutamato (Lauderback, Hackett *et al.*, 2001).

A excitotoxicidade causada pelo acúmulo de glutamato extracelular pode resultar em dois tipos distintos de morte celular: a apoptose e a necrose (Ankarcrona, Dypbukt *et al.*, 1995; Bonfoco, Krainc *et al.*, 1995).

A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por condensação da cromatina, fragmentação do DNA por endonucleases e formação dos corpos apoptóticos ou vesículas apoptóticas que estão envoltos por membrana (Pettmann e Henderson, 1998). A superfície celular altera-se e adquire propriedades que provocam a fagocitose imediata por macrófagos ou células vizinhas, antes de haver liberação do conteúdo celular (Duke, Ojcius *et al.*, 1996; Leblanc, 2003). Várias proteases participam dos processos de indução de apoptose,

sendo que as mais conhecidas são as caspases (cisteína-aspartato proteases), as quais ativam ou inibem, por clivagem proteolítica, inúmeros alvos intracelulares como proteínas do citoesqueleto, da lâmina nuclear, e proteínas envolvidas com o DNA e com a transdução de sinais (Ashe e Berry, 2003).

As células onde ocorre morte necrótica são caracterizadas morfológicamente por tumefação citoplasmática e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas (Mcconkey, 1998).

Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um intumescimento celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^+ -ATPase, ocasionando depleção de ATP e morte celular (Nicotera e Leist, 1997).

1.3 O peptídeo A β e o estresse oxidativo

Como já citado anteriormente, alguns estudos demonstraram que o peptídeo A β pode causar estresse oxidativo, gerando radicais livres e produtos da peroxidação lipídica responsáveis pela neurodegeneração na DA (Butterfield, Reed *et al.*, 2007) (Figura 5).

O estado redox das células é uma conseqüência do balanço entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Emerit, Edeas *et al.*, 2004). Elevação nos níveis de ERO acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular os níveis dessas espécies resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Sob esta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos podem danificar o DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios responsáveis pela integridade da membrana, levando a morte celular. Apesar de várias

macromoléculas estarem sujeitos ao ataque de ERO, os ataques a nucleotídeos livres ou ao DNA podem ocasionar danos permanentes devido aos efeitos deletérios destas espécies (Allen e Tresini, 2000).

A reação da ERO com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação. As alterações nas membranas celulares levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (Barber e Harris, 1994). Os produtos gerados durante as fases do processo de lipoperoxidação também chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) podem ser avaliados e utilizados como um indicador do estresse oxidativo celular.

Os antioxidantes, tais como a glutatona (GSH) e outros tióis não protéicos (NPSH), agem como seqüestradores de radicais livres e ERO, antes que esses iniciem as reações, participando assim, da proteção contra o estresse oxidativo (Dirnagl, Simon *et al.*, 2003).

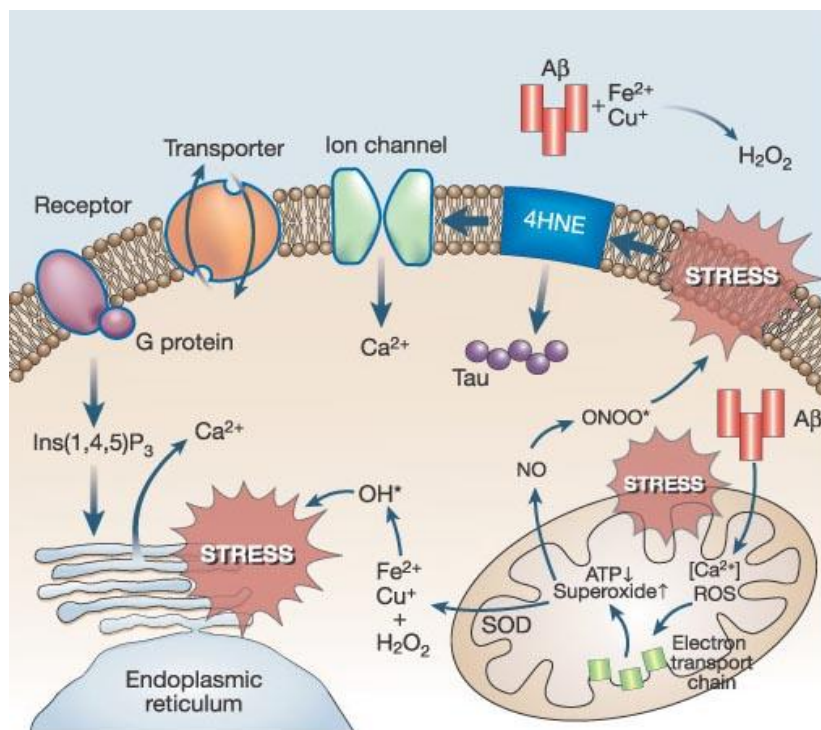


Figura 3. Estresse oxidativo e Aβ. O peptídeo Aβ é capaz de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por um mecanismo que reduz Fe³⁺ e Cu²⁺ pela reação de Fenton. O peptídeo Aβ pode também causar dano oxidativo mitocondrial e desregular a homeostase de Ca²⁺ resultando no aumento do radical ânion superóxido e diminuição de ATP. O Superóxido é convertido para H₂O₂ pela atividade da superóxido dismutase (SOD) e também pode interagir com o óxido nítrico (NO), através de óxido nítrico sintase (NOS) para a produção de peroxinitrito (ONOO•). As espécies reativas de oxigênio danificam a membrana que pode gerar produtos da peroxidação lipídica (4-hidróxinonenal, 4HNE). Estes podem modular canais iônicos, receptores ligados à proteína-G e alterar função de transportadores de glicose e glutamato. Modificações oxidativas da tau pela 4HNE podem promover a sua agregação e induzir a formação de emaranhados. Interação de H₂O₂ com Fe²⁺ ou Cu⁺ gera o radical hidroxila (OH•), um potente e altamente reativo oxiradical que contribui para a disfunção do retículo endoplasmático (Retirado de Mattson, 2004).

1.4 Mediadores inflamatórios na Doença de Alzheimer

O envolvimento da neuroinflamação na DA já foi bem estabelecido (para revisão ver: (Akiyama, Barger *et al.*, 2000). Nestes pacientes, a acumulação de placas com o peptídeo A β ativa astrócitos e microglia (Luber-Narod e Rogers, 1988) que participam da produção de toxinas e citocinas inflamatórias contribuindo para o processo neurodegenerativo (Mcgeer e Mcgeer, 2002).

Confirmando esta hipótese, estudos epidemiológicos revelam que indivíduos que fizeram ou fazem uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs, do inglês, nonsteroidal anti-inflammatory drugs) apresentam menor risco de desenvolver a doença de Alzheimer (Rogers, Kirby *et al.*, 1993; McDonald, Overmier *et al.*, 1996; Zandi, Breitner *et al.*, 2002).

O principal alvo dos NSAIDs é através da inibição da enzima cicloxigenase (COX) (Figura 4).

Aumento nos níveis de RNA mensageiro para a COX-2 foi encontrado em homogenatos de cérebro com DA. A COX possui duas formas ligeiramente diferentes, designadas COX-1 e COX-2, sendo que a COX-2 possui pouca expressão em tecidos normais, mas apresenta-se aumentada durante condições patológicas. Estas enzimas transformam o ácido aracônico (aa), uma substância formada a partir de lipídios presentes na membrana celular pela ação da fosfolipase A, em dois tipos de compostos, as prostaglandinas e os tromboxanos. A COX-2 pode ser induzida por mitógenos e citocinas como interleucina (IL)-1, IL-2 e fator de necrose tumoral- α (TNF)- α (Eikelenboom, Rozemuller *et al.*, 2000).

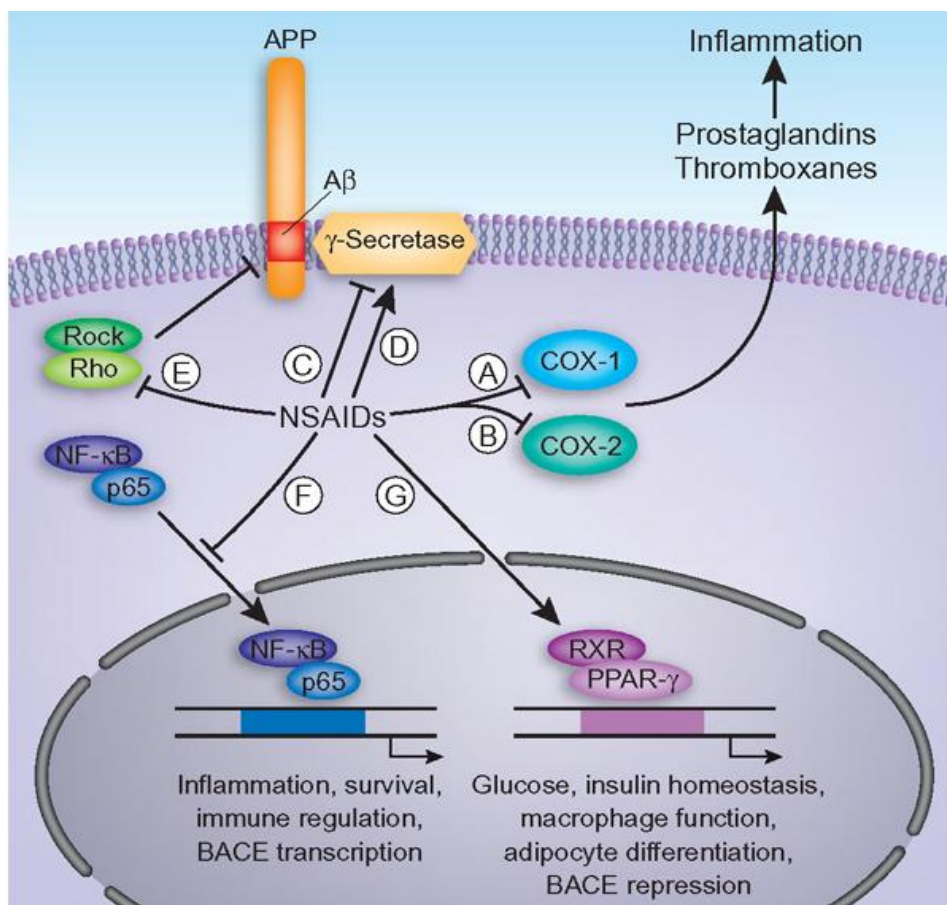


Figura 4. Efeitos reportados dos NSAIDs com respeito à doença de Alzheimer e produção do peptídeo Aβ. NSAIDs inibem a produção de prostaglandinas e tromboxanos, importantes indutores de inflamação, por inibir seus principais alvos COX-1 e COX-2 (A,B). Os NSAIDs possuem outros efeitos, incluindo a inibição (C) e modulação (D) de γ -secretase, inibição de pequenas proteínas GTP Rho e sua associação com a cinase Rock (E) e inibição da translocação de fator de transcrição NF- κ B (F), responsável por ativar genes que promovem inflamação e também podem ativar a transcrição da BACE. Os NSAIDs também estimulam a ativação do receptor nuclear PPAR- γ (G), que juntamente com receptor X retinóide (RXR), se liga ao DNA para aumentar a função de macrófagos e reprimir a transcrição da BACE (Retirado de (Wyss-Coray, 2006).

1.5 Estatinas

As estatinas são os mais potentes agentes de redução dos níveis de colesterol sérico entre todas as drogas hipolipidêmicas (Sprecher, 2000; Gotto, 2002). Existem oito tipos de estatinas divididas em naturais: lovastatina, mevastatina, pravastatina e simvastatina e as sintetizadas quimicamente: fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina e rosuvastatina, sendo que a atorvastatina é relativamente mais lipofílica que as outras estatinas e sua segurança foi confirmada, utilizando altas doses em humanos (80 mg/dia/adulto) (Waters, 2005).

O SNC contém cerca de 20 % do total de colesterol do corpo, a maioria é encontrada na membrana neuronal e na mielina dos axônios (Puglielli, Tanzi *et al.*, 2003). O colesterol é o maior regulador da fluidez e organização da membrana, e sendo assim, os mamíferos possuem um complexo e sofisticado mecanismo que mantêm os níveis celulares de colesterol dentro de uma estreita faixa. Alterações ou distúrbios neste mecanismo de homeostase, de forma genética, ambiental, induzida pela dieta ou pelo envelhecimento podem causar alterações no funcionamento da célula e doença (Maxfield e Tabas, 2005).

O colesterol é sintetizado a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), através de várias reações enzimáticas. Esta via também produz outras importantes moléculas, como isoprenóides, ubiquinona e Heme A.

No cérebro a maioria do colesterol é sintetizada *in situ*. A renovação cerebral pode ocorrer pela conversão de colesterol a cerebrosterol (24S-hidróxicolesterol), um importante mecanismo para eliminação do colesterol no cérebro humano (Bretillon, Lutjohann *et al.*, 2000).

Vários estudos sugerem que a concentração plasmática de 24S-hidróxicolesterol está elevada na doença de Alzheimer (Lutjohann, Papassotiropoulos *et al.*, 2000; Schonknecht,

Lutjohann *et al.*, 2002), e esta concentração é reduzida pela ação das estatinas (Locatelli, Lutjohann *et al.*, 2002).

Além disso, evidências têm demonstrado que o processo amiloidogênico parece ocorrer em micro-domínios de membrana, ricos em colesterol. BACE1 endógeno e a ativação biológica do complexo PS (presenilina) / γ -secretase, têm sido detectados nestes domínios (Ehehalt, Keller *et al.*, 2003).

O colesterol e seus precursores possuem um importante papel no metabolismo do peptídeo beta-amilóide. A diminuição nos níveis de colesterol via tratamento com estatinas, induz diminuição na atividade de β -secretase. Conseqüentemente, diminui a produção de beta-amilóide, reduzindo também sua deposição e a formação de placas (Sjogren, Mielke *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que o aumento nos níveis de colesterol pode resultar em aumento da produção de A β (Reid, Urano *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação das estatinas se dá através da inibição da enzima HMG-CoA (3-hidróxi-3metil-glutaril-coenzima A redutase) bloqueando a formação de mevalonato, nos primeiros estágios da via (Miida, Hirayama *et al.*, 2004; Miida, Takahashi *et al.*, 2007), esta enzima também é importante na formação de lipoproteínas plasmáticas, e a regulação destas confere as estatinas diversos efeitos independentes da redução de colesterol, conhecido como efeitos pleiotrópicos (Figura 5) (Veillard e Mach, 2002), que agem inibindo o processo patofisiológicos presente na doença de Alzheimer (Sjogren, Mielke *et al.*, 2006).

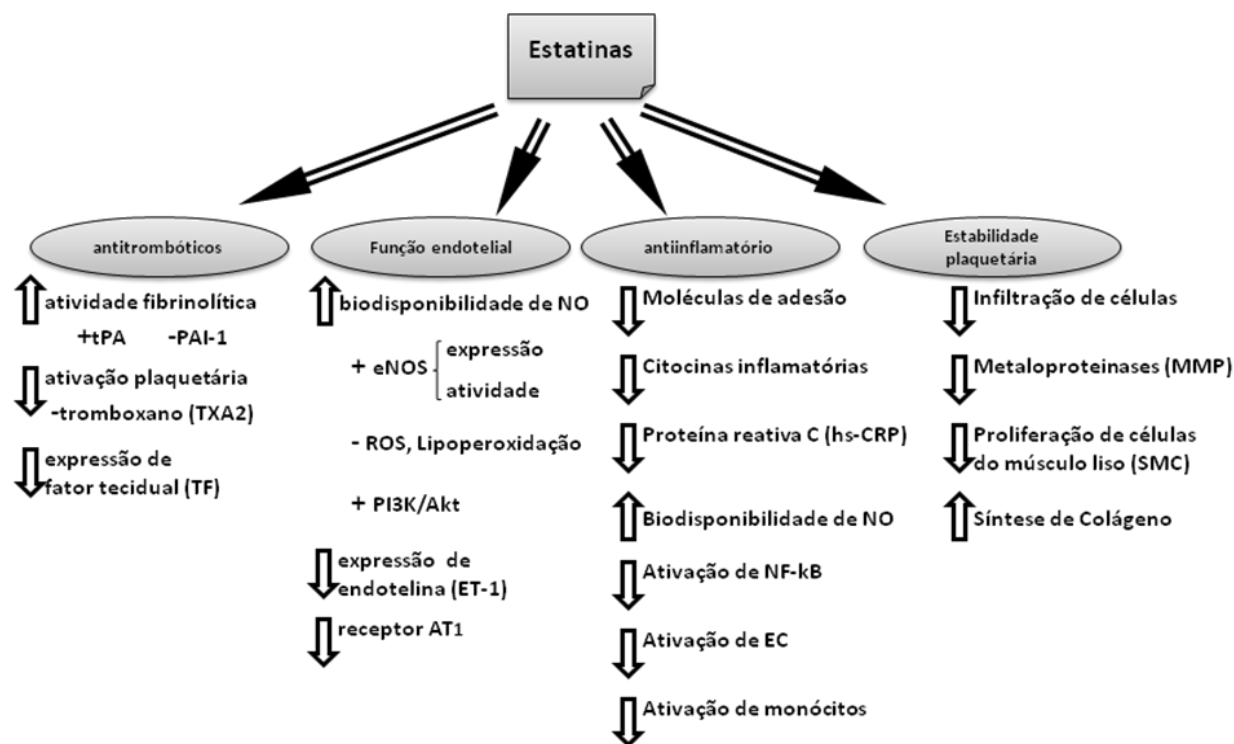


Figura 5. Efeitos pleiotrópicos das estatinas (Cimino, Gelosa *et al.*, 2007)

Muitos dos efeitos pleiotrópicos das estatinas são mediados principalmente pela inibição de isoprenóides, como o farnesilpirofosfato (FPP) e geranyl-geranylpirofosfato (GGPP), o que reduz a atividade de moléculas-chave da sinalização celular. Uma vez que estes metabólitos induzem a modificação pós-traducional em uma variedade de proteínas citosólicas, incluindo a superfamília da proteína-G monomérica como Ras, Rab e Rho facilitando seu acoplamento na membrana e aumentando sua atividade (Liao e Laufs, 2005).

Parte dos efeitos neuroprotetores das estatinas é também devido a sua ação sobre o sistema glutamatérgico. A diminuição da biossíntese de colesterol por inibição de HMG-CoA redutase protege os neurônios corticais da excitotoxicidade mediada por receptores NMDA *in vitro* (Zacco, Togo *et al.*, 2003).

Além disso, em culturas corticais expostas à toxicidade glutamatérgica as estatinas parecem modular a atividade de receptores NMDA e a dinâmica do Ca^{2+} intracelular (Bosel, Gandor *et al.*, 2005).

Efeitos adicionais das estatinas envolvem ação antiinflamatória. Ratos tratados *in vivo* com atorvastatina por três semanas apresentaram aumento da produção de citocinas antiinflamatórias, interleucina-4 no hipocampo, protegendo contra déficit em LTP causado por injeção aguda de $\text{A}\beta_{1-40}$ (Clarke, O'connell *et al.*, 2007).

E alguns estudos demonstraram que a administração de atorvastatina por uma semana após injúria cerebral traumática reduziu significativamente déficits neurológicos aumentando a sobrevivência e sinaptogênese nas margens da lesão e nas regiões CA3 do hipocampo (Lu, Goussev *et al.*, 2004; Lee, Chu *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

O crescimento da expectativa de vida média da população mundial tem sido acompanhado do aumento na prevalência de doenças neurodegenerativas, características do envelhecimento, como a doença de Parkinson, isquemia cerebral e, especialmente, a Doença de Alzheimer (DA).

Conhecer os mecanismos envolvidos nestas patologias é de fundamental importância para o desenvolvimento de abordagens neuroprotetoras.

Alguns estudos epidemiológicos sugerem uma forte ligação entre altos níveis de colesterol sanguíneo e a DA e que o uso de drogas que reduzem colesterol, especialmente as estatinas, previnem o aparecimento de DA (Puglielli, Tanzi *et al.*, 2003). Mais ainda, recentes trabalhos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a atorvastatina possui importantes efeitos modulatórios no sistema glutamatérgico e inflamatório.

No entanto ainda não está de todo esclarecido o mecanismo envolvido na neuroproteção das estatinas nas doenças neurodegenerativas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar os efeitos comportamentais e bioquímicos resultantes da administração intracerebroventricular dos peptídeos beta-amilóide $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ e avaliar o papel neuroprotetor da atorvastatina

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar se a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ causa alterações no aprendizado e memória;
- 2) Determinar se a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ modula a transmissão glutamatérgica, através da avaliação da captação de glutamato e expressão de transportadores GLAST e GLT-1 no hipocampo;
- 3) Avaliar se a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ provoca estresse oxidativo no hipocampo;
- 4) Avaliar se a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ provoca alterações na viabilidade celular no hipocampo;
- 5) Avaliar se a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ ativa GFAP e a proteína inflamatória COX-2 no hipocampo;
- 6) Avaliar se o tratamento *in vivo* com atorvastatina previne alterações comportamentais, alterações do sistema glutamatérgico, estresse oxidativo, dano celular e inflamação que pode ser causado pela infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

A β ₁₋₄₀ e A β ₂₅₋₃₅ adquiridos de Sigma

Atorvastatina (Lipitor) adquirida da Pfizer

Anticorpo primário anti-GLAST e anti-GLT-1 adquiridos da Chemicon

Anticorpo primário anti-COX-2 adquiridos da Cell Signaling

Anticorpo secundário anti IgG de guinea pig foram adquiridos da Cell signaling.

Anticorpo secundário anti IgG de camundongo foram adquiridos da Cell signaling.

L-[H³]glutamato foi adquirido da GE Healthcare.

Líquido de cintilação foi adquirido da Perkin Elmer.

Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico (MTT) foi adquirido da Amresco

Iodeto de Propideo foi adquirido da Calbiochem-Vovabiochem

Streptavidina-Biotina-Peroxidase adquirido de Dako Cytomation

Etellan adquirido da Merck

4.1.2 Equipamentos

Labirinto Aquático – Laboratório de Farmacologia, UFSC

Microscópio (Eclipse 50i) - Nikon

Câmera digital (DS-5M-L1) - Nikon

Fatiador de tecidos McIlwain – Brinkmann Laboratory

Banho Maria – Biomatic

Agitador magnético, Q-221-2 – Quimis

Centrífuga, 5415 D – Eppendorf

Estufa de cultura modelo 002 - CB FANEM LTDA

Cintilador Tri-Carb 1600 TR – Packard

Leitora de Elisa – Labsystems Multiskan MS

Microscópio de epifluorescência invertido (IX 71) - Olympus

Máquina fotográfica (C5060) - Olympus

4.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos com idade entre 60 a 90 dias. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro por 12 horas e a 25 °C com água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tratamento e o procedimento experimental aprovado pelo CEUA/UFSC com o protocolo de pesquisa PP000142.

4.3 Infusão intracerebroventricular do peptídeo β -amilóide

Os peptídeos A β ₂₅₋₃₅ (solúvel 10 nmol/3 μ l/camundongo) (Freir, Costello *et al.*, 2003) e A β ₁₋₄₀ (agregado 400 pmol/3 μ l/camundongo) (Medeiros, Prediger *et al.*, 2007) ou veículo (PBS) foram administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.) como descrito anteriormente (Laursen e Belknap, 1986). Para tanto, foi utilizada uma microseringa Hamilton com agulha 29 gauges de 3 mm de comprimento. Esta foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio equidistante entre os olhos e a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. As soluções foram injetadas gradualmente durante um intervalo de 5 s. Os

animais foram sacrificados 16 dias após a infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$ para as subseqüentes avaliações bioquímicas e imunohistoquímicas.

4.4 Tratamento com Atorvastatina

Os animais foram tratados com atorvastatina (Lípitor Atorvastatina cálcica - Pfizer) (10 mg/Kg/dia) via oral durante 7 dias (Lu *et al.*, 2004). Os animais controles foram tratados com solução de cloreto de sódio (0,9 %) via oral pelo mesmo período. A atorvastatina foi diluída em solução salina nas concentrações de 10 mg/kg. O tratamento foi feito pela administração de 10 μ l/g de peso do animal, tanto para as soluções de atorvastatina como para a solução salina. O protocolo experimental deste estudo esta sumarizado na Figura 6.

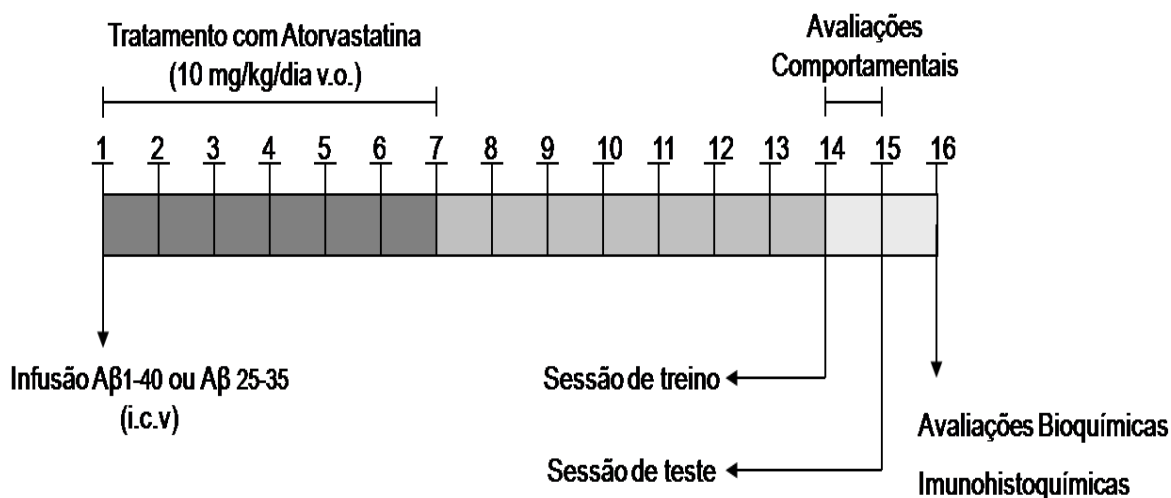


Figura 6. Esquema da seqüência de procedimentos realizados no protocolo experimental.

4.5 Avaliação comportamental

Os efeitos da administração i.c.v. dos fragmentos beta-amilóide sobre a memória espacial em camundongos foram avaliados através do teste do labirinto aquático de Morris (Morris,

Garrud *et al.*, 1982). O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), estando localizado no interior de uma sala com algumas pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água, sendo a temperatura da água mantida (25 ± 2 °C) através de um sistema automatizado de resistência. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). No interior do tanque (posição sudoeste) foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm), submersa 1 cm da superfície da água.

O protocolo experimental consistiu em uma sessão de treino e uma sessão de teste, conforme descrito anteriormente (Medeiros, Prediger *et al.*, 2007; Prediger, Franco *et al.*, 2007; Prediger, Medeiros *et al.*, 2008). Os animais foram treinados 14 dias após a injeção de A β ₁₋₄₀ ou A β ₂₅₋₃₅. As sessões de teste foram realizadas 24 h após o treino. Durante o treinamento os animais foram liberados para nadar até encontrar a plataforma ou até um período máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era conduzido manualmente até esta, onde permanecia por 20 s. O tempo (latência) até o animal encontrar a plataforma foi registrado. Após os 20 s sobre a plataforma, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 5 min, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. Este procedimento foi realizado 10 vezes na sessão de treino, sendo que os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória e a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após a sessão de treinamento, os animais foram liberados para nadar a partir da posição Norte, no entanto, a plataforma foi removida do labirinto. O tempo de nado gasto pelos animais no quadrante onde se encontrava a

plataforma na sessão de treino (no dia anterior) foi utilizado como índice de aprendizado e memória.

4.6 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada 16 dias após o tratamento com $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ em cérebros de camundongos. Para tal os cérebros dos animais foram coletados após processo de perfusão com solução salina e paraformaldeído 4%. As amostras foram submetidas ao processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 3-4 μm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50 °C durante 1 h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinados em xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). Após preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas

do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS. A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos anti-ciclooxigenase-2 (anti-COX), proteína fibrilar acida (anti-GFAP) e dos transportadores de glutamato GLAST (anti-GAST) e GLT-1 (anti-GLT-1) (Tabela 1). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os respectivos cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IgG/IgM de coelho, camundongo ou porco da índia; 1:500) em câmara úmida durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, em temperatura ambiente e submetidas a incubação com solução de Streptavidina-Biotina-Peroxidase, pronta para uso, durante 30 minutos. Os cortes foram submetidos a uma revelação colorimétrica com solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) previamente diluído em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem utilizando um meio de montagem permanente (Entellan). Para cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário nas reações. Os resultados foram obtidos através de microscópio óptico acoplado a câmera digital. O efeito do tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀ ou A β ₂₅₋₃₅ sobre a detecção da COX-2, GFAP, GLAST e GLT-1 foi avaliado nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo. As imagens digitalizadas correspondentes as subregiões do hipocampo foram transferidas para o computador e a intensidade média de marcação para as proteínas COX-2, GFAP, GLAST e

GLT-1 foi determinada através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA) (Cummings, Mason *et al.*, 2002).

Tabela 1. Anticorpos primários usados para imunohistoquímica

Anticorpo	Diluição	Procedência	Fabricante
Anti-GLAST	1:4000	porco da Índia	Chemicon, Temecula, CA, EUA
Anti-GLT-1	1:5000	porco da Índia	Chemicon, Temecula, CA, EUA
Anti-COX-2	1:100	Coelho	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA
Anti- GFAP	1:300	camundongo	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA

4.7 Preparação e incubação das fatias de hipocampo

Os animais foram mortos por decapitação 16 dias após a infusão i.c.v. dos peptídeos A β ₁₋₄₀ e A β ₂₅₋₃₅ e os hipocampos 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 e pré-incubadas em placas de 96-well em tampão KRB por 1 hora a 37 °C. Após este período de incubação, as fatias foram submetidas às avaliações de viabilidade celular.

4.8 Ensaio da Captação de L-[³H] glutamato

A captação de 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 na solução salina balanceada de Hanks (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 tirar 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 para obter a concentração final de 100 µM e realizada 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 L-[³H]glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida. A dosagem de proteínas foi realizado através do método de Lowry et al. (1975).

4.9 Parâmetros de estresse oxidativo:

4.9.1 Determinação de grupos tióis não proteicos (NPSH)

A determinação dos níveis de tióis não proteicos (NPSH) foi seguida de acordo com o método de Ellman (1959). Grupos NPSH foram determinados da fração obtida depois da diluição dos homogenatos teciduais com 1 de volume de ácido tricloroacético 10% (TCA) seguido por centrifugação. Uma alíquota (80 µL) do sobrenadante foi adicionada a 100 µL de tampão fosfato (20 mmol/L pH 7,4) e 25 µL de DTNB (5,5'-ditio-bis (ácido 2- nitrobenzóico, 10 mmol/L). O desenvolvimento da cor é resultado de reação do DTNB com grupos tióis. Absorbância foi lida a 405 nm. Para a quantificação do conteúdo de NPSH foi utilizado o coeficiente de extinção molar $\xi = 13,6 \times 10^3$ M/cm da GSH.

4.9.2 Determinação dos níveis de TBARS

O nível tecidual de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinado pelo método de Ohkawa (1979). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo colorido. Alíquotas de homogenatos teciduais foram incubadas, a temperatura de 100°C por 45 minutos, em meio contendo 0,45% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1,4 M de ácido acético pH 3.5, e 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após incubação o produto da reação foi extraído com butanol e lido em 540 nm. Para o cálculo dos níveis de TBARS foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M/cm.

4.9.3 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com o método de BRADFORD (Bradford et al., 1976), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

4.10 Avaliação de viabilidade celular

O MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue) é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson & Fowler, 1999). Após o período de 1 hora de pré-incubação as fatias hipocâmpais foram incubadas por 20 minutos com MTT (0,5 mg/ml) à 37° C e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido (DMSO). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540 nm).

4.11 Quantificação de morte celular

O iodeto de propídio (IP) é um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o PI complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (630 nm) que é excitada por luz verde (495 nm) (Boeck *et. al.*, 2004). Após o período de 1 hora de pré-incubação as fatias hipocampais foram incubadas por 30 minutos com IP (7 µg/ml) à 37° C e depois lavadas uma vez com o tampão KRB para a subsequente análise em um microscópio de epifluorescência invertido, com filtro de rodamina. As fotos foram tiradas utilizando-se uma máquina fotográfica. As imagens foram capturadas e então analisadas usando um software Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). A área fluorescente pela incorporação do IP (transformada em pixels) foi detectada e analisada usando a opção “density slice” do software Scioncorp através da divisão da fluorescência do IP pela área total da fatia. A intensidade do IP, determinando morte celular, foi expressa como porcentagem de fluorescência: % morte celular = $F_d/F_0 \times 100$, onde F_d é a área da fatia hipocampal onde ha fluorescência pela captação do IP e F_0 é a área total de cada fatia hipocampal (Frezza et al 2008).

4.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via. As diferenças individuais entre as médias foram comparadas pelo teste *post hoc* Duncan para captação de glutamato, MTT, IP, TBARS e NPSH, e o teste de Newman-Keuls para as análises imunohistoquímica e comportamentais. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

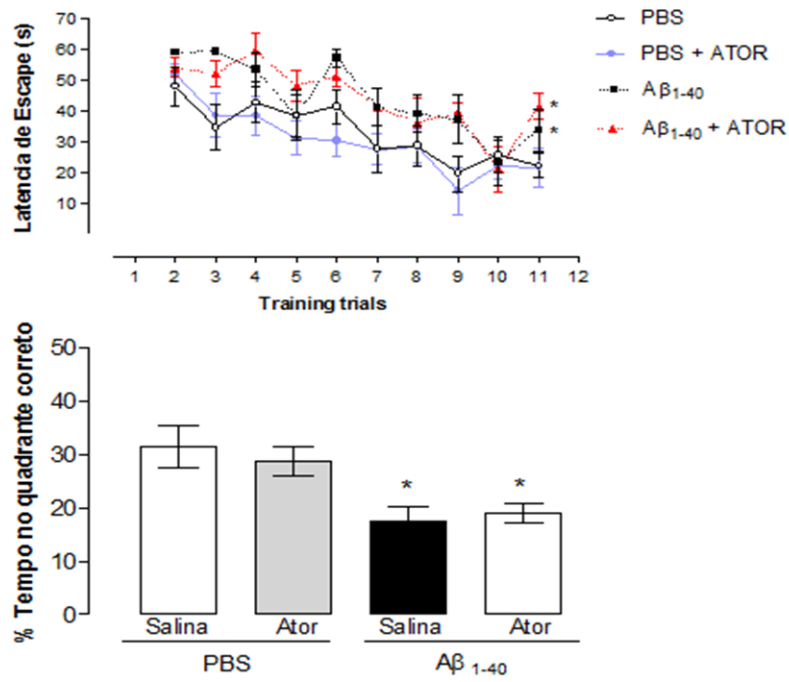
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do dano cognitivo induzido pelos peptídeos A β ₂₅₋₃₅ e A β ₁₋₄₀ e os efeitos do tratamento com atorvastatina

Para mensurar possíveis prejuízos de aprendizado e memória espacial causados pela infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀ ou A β ₂₅₋₃₅ em camundongos, foi utilizado o teste do labirinto aquático de Morris (Figura 6). As sessões de treino foram realizadas 14 dias após uma única administração i.c.v dos peptídeos A β ₁₋₄₀ (400 pmol/3 μ l por camundongo) ou A β ₂₅₋₃₅ (10nmol/3 μ l por camundongo) ou veículo (PBS). Nas sessões de treino, foi possível observar uma significativa aumento da latência para encontrar a plataforma nos animais infundidos com o peptídeo A β ₁₋₄₀ ($F_{(1, 17)}=19.28$, $P < 0.05$) e ($F_{(9, 153)}=4.7949$, $P < 0.05$), sem alterações significativas nos animais infundidos com o peptídeo A β ₂₅₋₃₅ em comparação com o grupo controle. Nas sessões de teste, realizadas no 15º dia, 24h após as sessões de treino, ambos os peptídeos A β ₁₋₄₀ ou A β ₂₅₋₃₅ apresentaram alterações significativas ($F_{(1, 17)}=5.05$, $P < 0.05$) e ($F_{(1, 17)}=5.05$, $P < 0.05$) respectivamente, indicando que a infusão i.c.v tanto do peptídeo A β ₁₋₄₀ quanto do A β ₂₅₋₃₅ é capaz de prejudicar a memória espacial nos camundongos (Figura 7)

Para avaliar o potencial efeito neuroprotetor da atorvastatina, os animais foram tratados durante 7 dias com atorvastatina (10 mg/kg/dia v.o) após a infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀ (vide protocolo Figura 5). No entanto, o tratamento com atorvastatina não foi capaz de reverter os danos causados pela infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀ e A β ₂₅₋₃₅.

A



B

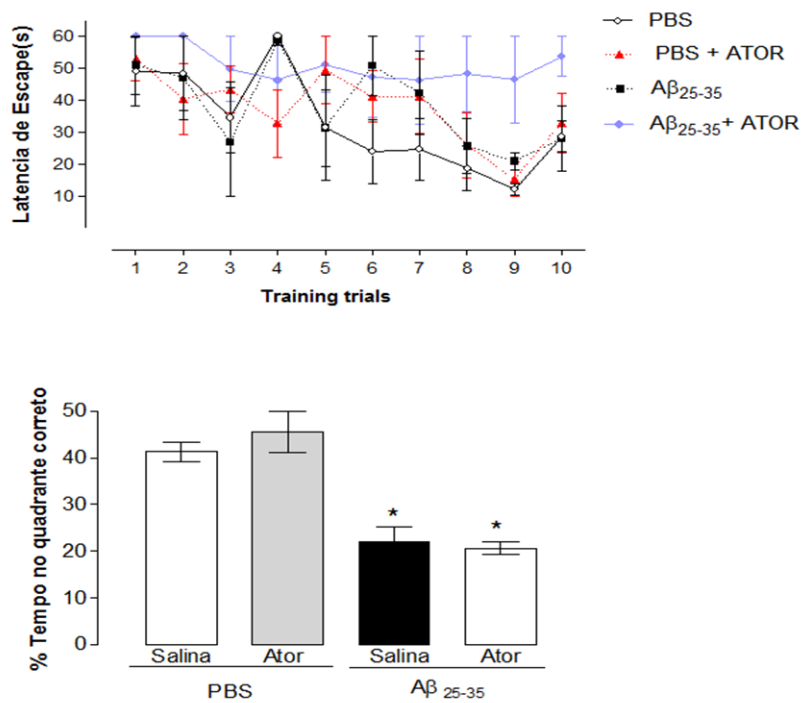


Figure 7. Avaliação comportamental no Labirinto aquático de Morris após a infusão dos peptídeos Aβ₁₋₄₀ (A) e Aβ₂₅₋₃₅ (B) e tratamento com Atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o) ou

veículo durante 7 dias.. O teste e treino foram realizados no 14^o e 15^o dia respectivamente. Valores expressos como média ± erro padrão. *P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo controle . Superior: Curvas de aprendizado de ratos ao longo da sessão no Labirinto aquático. Os valores da abscissa representam as latências para encontrar uma plataforma submersa a partir das várias posições (N1= norte, S= sul, L= leste, N2= Norte e O= oeste). Inferior: Os dados representam a porcentagem de tempo (de 60s) gasto no quadrante onde estava à plataforma submersa realizadas 24 horas apos o treino (N=10).

5.2 Avaliação da captação de glutamato em fatias hipocampais obtidas de camundongos infundidos com os peptídeos A β ₂₅₋₃₅ e A β ₁₋₄₀ e tratados com atorvastatina

Para realizar os experimentos de captação de glutamato os camundongos foram infundidos com os peptídeos A β ₁₋₄₀ e A β ₂₅₋₃₅. Um dia após os testes comportamentais, realizados no 14^o e 15^o dia, os animais foram sacrificados e seus hipocampos dissecados para realização do experimento. A Figura 8 mostra que a infusão dos peptídeos A β ₁₋₄₀ e A β ₂₅₋₃₅ causou uma significativa diminuição na captação de glutamato em relação ao grupo controle. O tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/dia v.o.) durante 7 dias não reverteu os efeitos causados pelos peptídeos A β ₁₋₄₀ ou A β ₂₅₋₃₅. A atorvastatina *per se* não alterou a captação basal de glutamato quando comparado com o grupo controle.

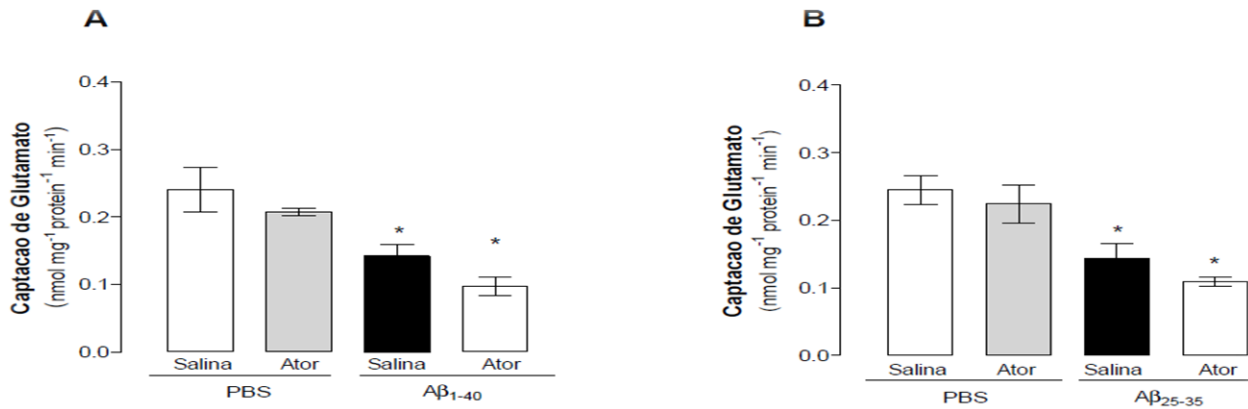
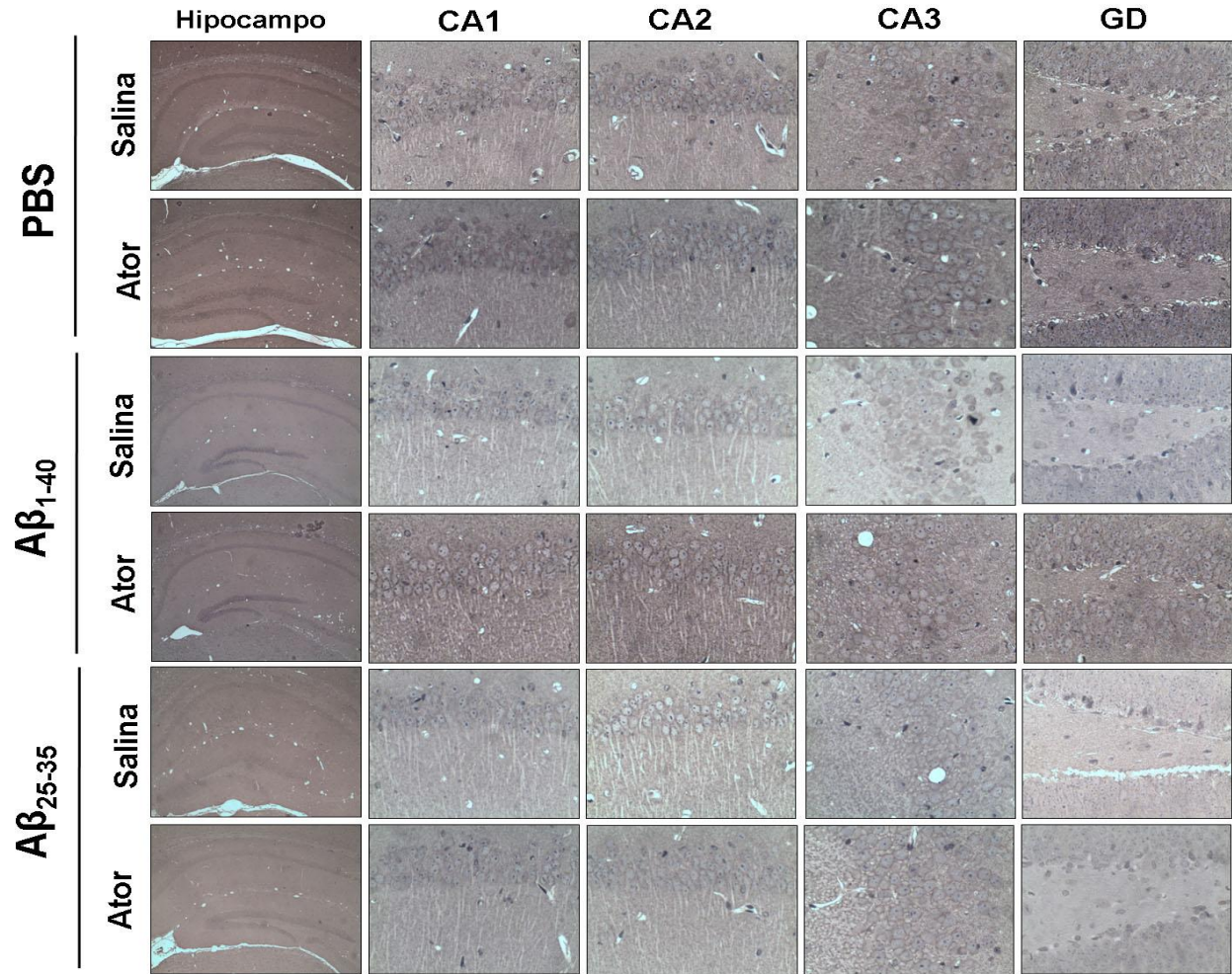
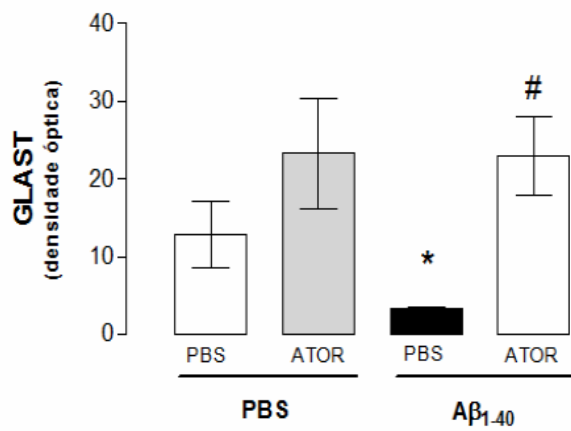
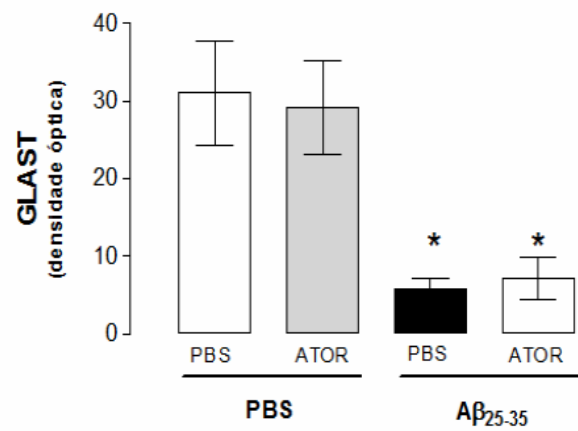


Figure 8. Avaliação captação de glutamato em fatias de hipocampo de camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ (A) e Aβ₂₅₋₃₅ (B). A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o.) foi administrada após a infusão i.c.v. de Aβ₂₅₋₃₅ ou Aβ₁₋₄₀ durante 7 dias consecutivos. Valores expressos como média ± erro padrão. *P <0,05 comparado com o grupo controle (N=5-4).

5.3 Expressão dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1 no hipocampo de camundongos tratados com Aβ₂₅₋₃₅ e Aβ₁₋₄₀ e atorvastatina

Para confirmar o efeito inibitório dos peptídeos Aβ₂₅₋₃₅ e Aβ₁₋₄₀ sobre a captação de glutamato foram realizadas análises imunohistoquímicas para avaliação da expressão dos transportadores glutamatérgicos nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo (Figura 9 A-F). O tratamento i.c.v. com os peptídeos Aβ₁₋₄₀ e Aβ₂₅₋₃₅ promoveu uma diminuição significativa na expressão dos transportadores GLAST e GLT-1 nas diferentes sub-regiões do hipocampo quando comparado ao grupo controle (p<0,05). O tratamento com a atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) foi capaz de bloquear a diminuição da expressão dos transportadores GLAST e GLT-1 induzida pelo peptídeo Aβ₁₋₄₀. Este efeito não foi observado nos animais infundidos com Aβ₂₅₋₃₅.

A**B****C**

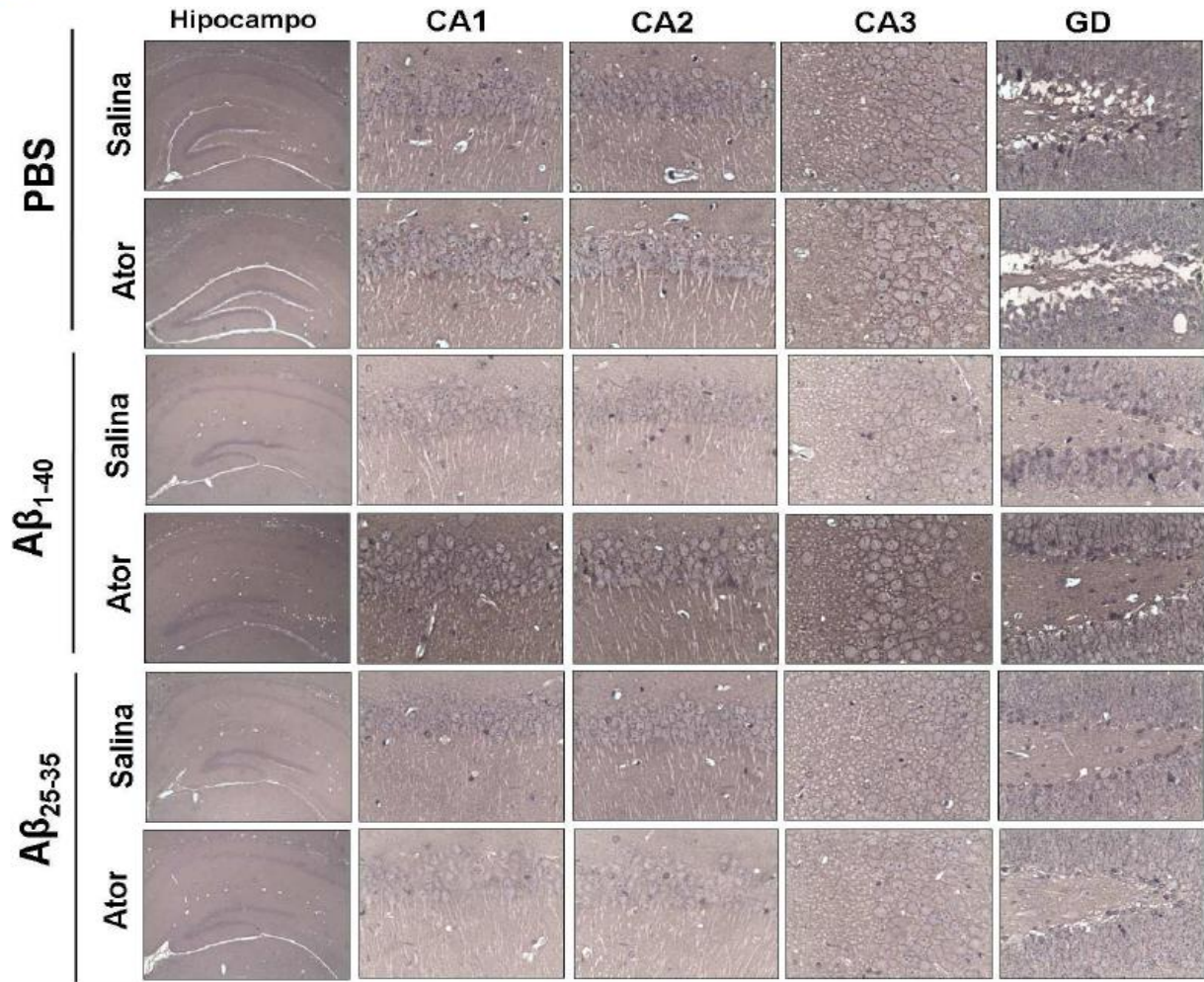
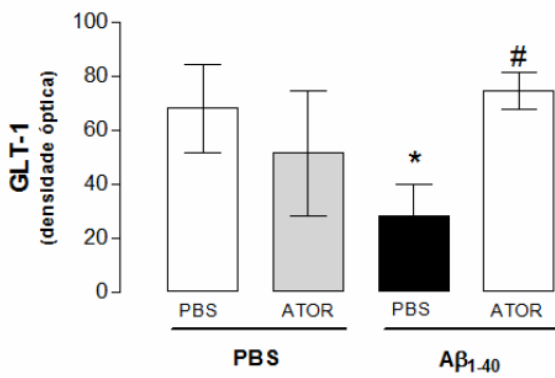
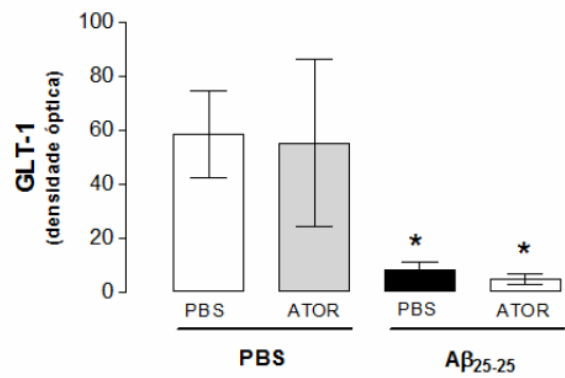
D**E****F**

Figura 9. Efeito dos peptídeos $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{1-40}$ e da atorvastatina sobre a expressão dos transportadores glutamatérgicos. A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o.) foi administrada após a infusão i.c.v. de $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{1-40}$ durante 7 dias consecutivos. Imagens representativas da reação de imunohistoquímica para a GLAST (A) e GLT-1 (D) analisada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD). Aumento de 4x e 400x. Medida da densidade óptica (D.O.) nas amostras imunoreativas para GLAST (B-C) e GLT-1 (E-F) avaliada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD. Os valores estão expressos como a média \pm erro padrão *P < 0,05 comparado ao grupo controle. #P < 0,05 comparado com o grupo $A\beta_{1-40}$ (N = 3).

5.4 Avaliação do estresse oxidativo e os efeitos do tratamento com atorvastatina

O estresse oxidativo está largamente implicado na doença de Alzheimer, sendo que o peptídeo $A\beta$ pode gerar EROs (Chauan & Chauan, 2006) causando a oxidação de lipídios e proteínas que pode fortemente afetar a atividade de transportadores glutamatérgicos (Lauderback et al. 2001; Harris, 1996).

A Figura 10 mostra que a infusão i.c.v. dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$ causou um significativo aumento nos na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diminuição nos níveis de tióis não-proteicos (NPSH), em relação ao grupo controle. O tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/dia v.o.) durante 7 dias foi capaz de reverter os efeitos da peroxidação lipídica, mas não foi capaz de prevenir a diminuição nos níveis de NPSH causados pelos peptídeos $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$. A atorvastatina *per se* não alterou a produção de TBARS e os níveis de tióis não-proteicos quando comparada com o grupo controle.

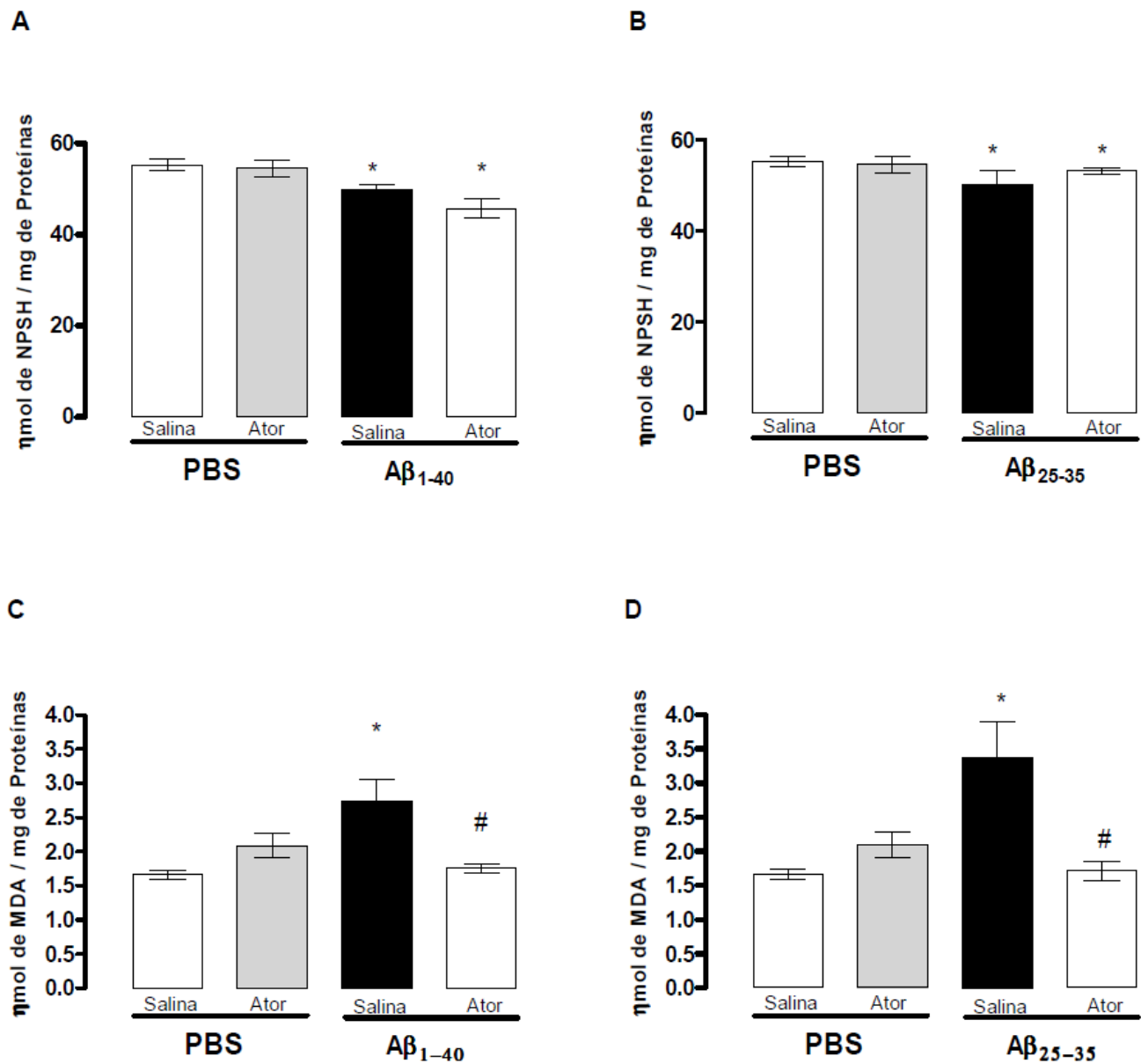


Figura 10. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo NPSH (A-B) e TBARS (C-D) no hipocampo de camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ e Aβ₂₅₋₃₅. A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o.) foi administrada após a infusão i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ e Aβ₂₅₋₃₅ durante 7 dias consecutivos. Valores expressos como média ± erro padrão. *P<0,05 comparado com o grupo controle. #P<0,05 comparado ao grupo Aβ₁₋₄₀ ou Aβ₂₅₋₃₅.

5.5 Avaliação do dano celular e o papel neuroprotetor da atorvastatina

Apesar do semelhante padrão de prejuízo cognitivo, a viabilidade celular foi diferentemente afetada pela infusão dos peptídeos beta-amilóide. A Figura 11 mostra uma significativa redução da viabilidade celular no hipocampo 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$, entretanto, o peptídeo $A\beta_{25-35}$ não promoveu nenhuma alteração significativa na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com atorvastatina (10mg/kg/dia) não alterou a redução de viabilidade celular induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, quando mensurado pelo método da redução do MTT.

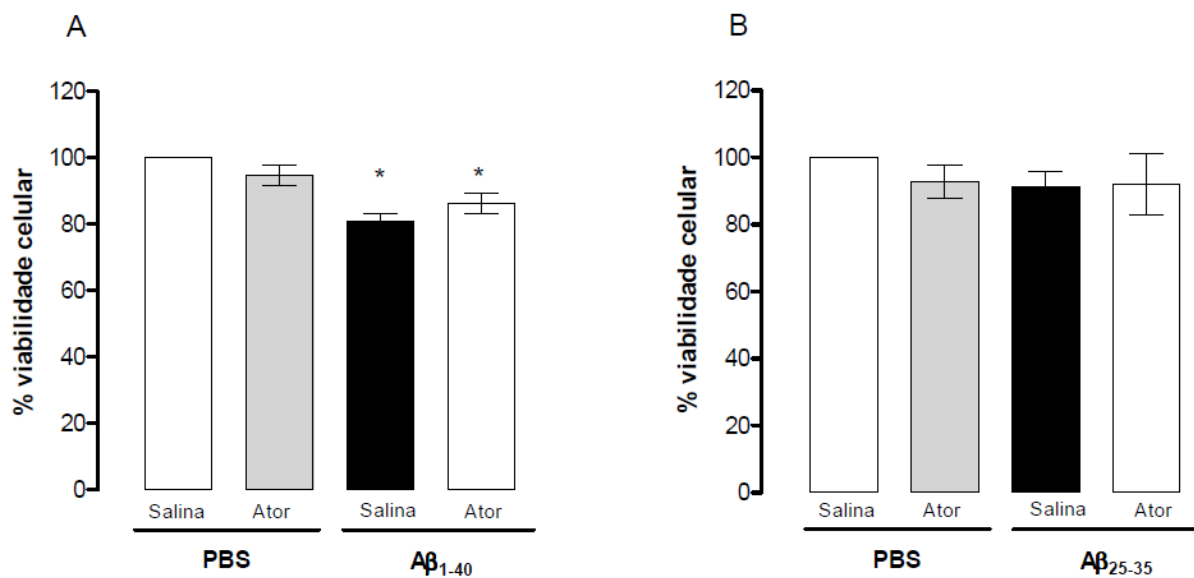


Figure 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de camundongos 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ (A) e $A\beta_{25-35}$ (B). A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o.) foi administrada após a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$ durante 7 dias consecutivos. Valores expressos como média \pm erro padrão. *P<0,05 comparado com o grupo controle.

A morte celular foi também avaliada por um método mais sensível, através da incorporação de iodeto de propídeo (IP) por células que tem a permeabilidade da membrana celular alterada ou comprometida, o que geralmente caracteriza uma morte celular necrótica.

A Figura 12A e B demonstra fotografias da captação de IP nas fatias de hipocampo em diferentes grupos de animais, e a Figura 12C e D mostra a quantificação de morte celular dada pela porcentagem de fluorescência de IP. A fluorescência presente no grupo controle representa o dano devido ao fatiamento do tecido hipocampal. A infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$, mas não $A\beta_{25-35}$, promoveu o aumento da morte celular, e este efeito foi revertido pelo tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/dia).

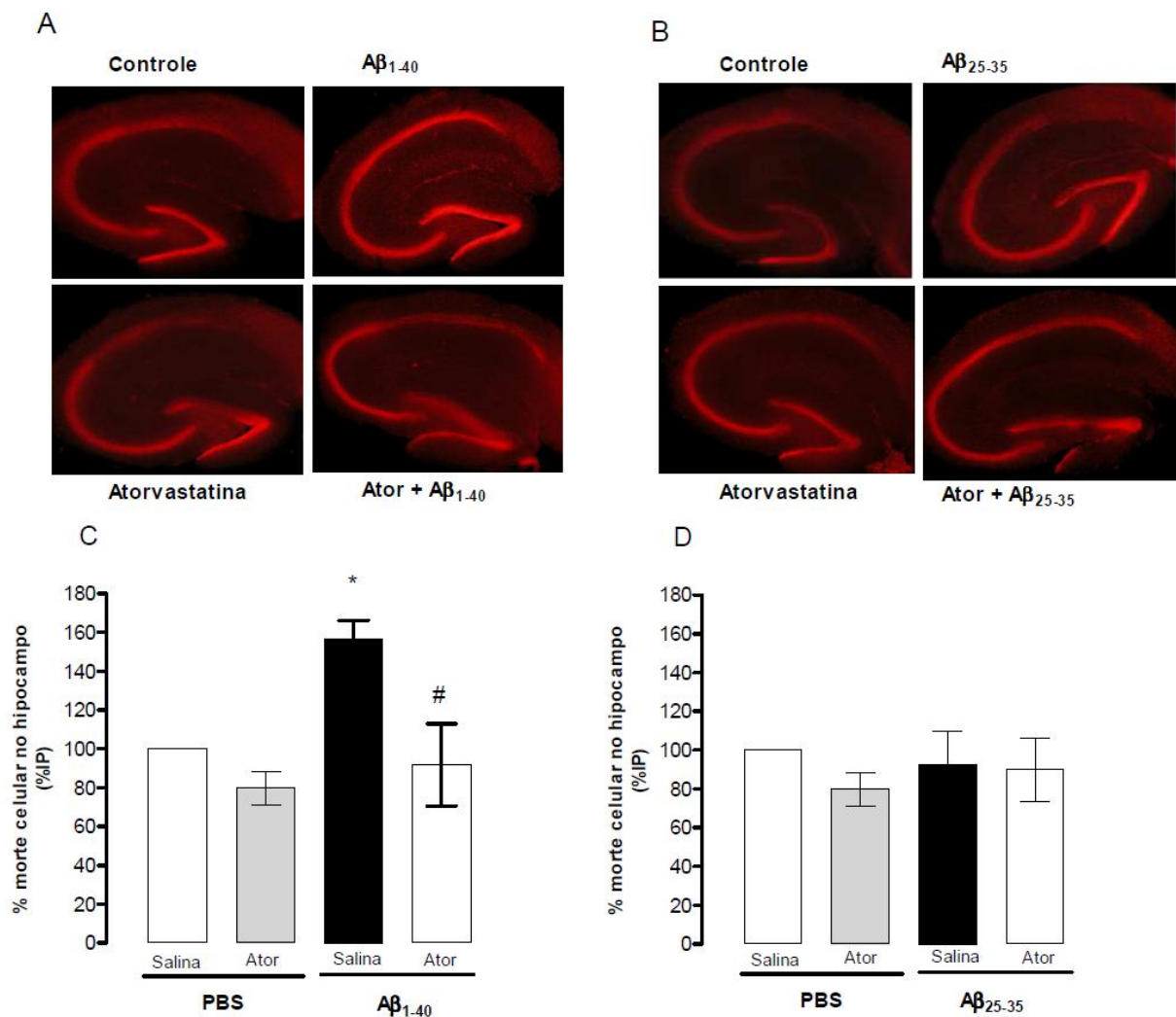
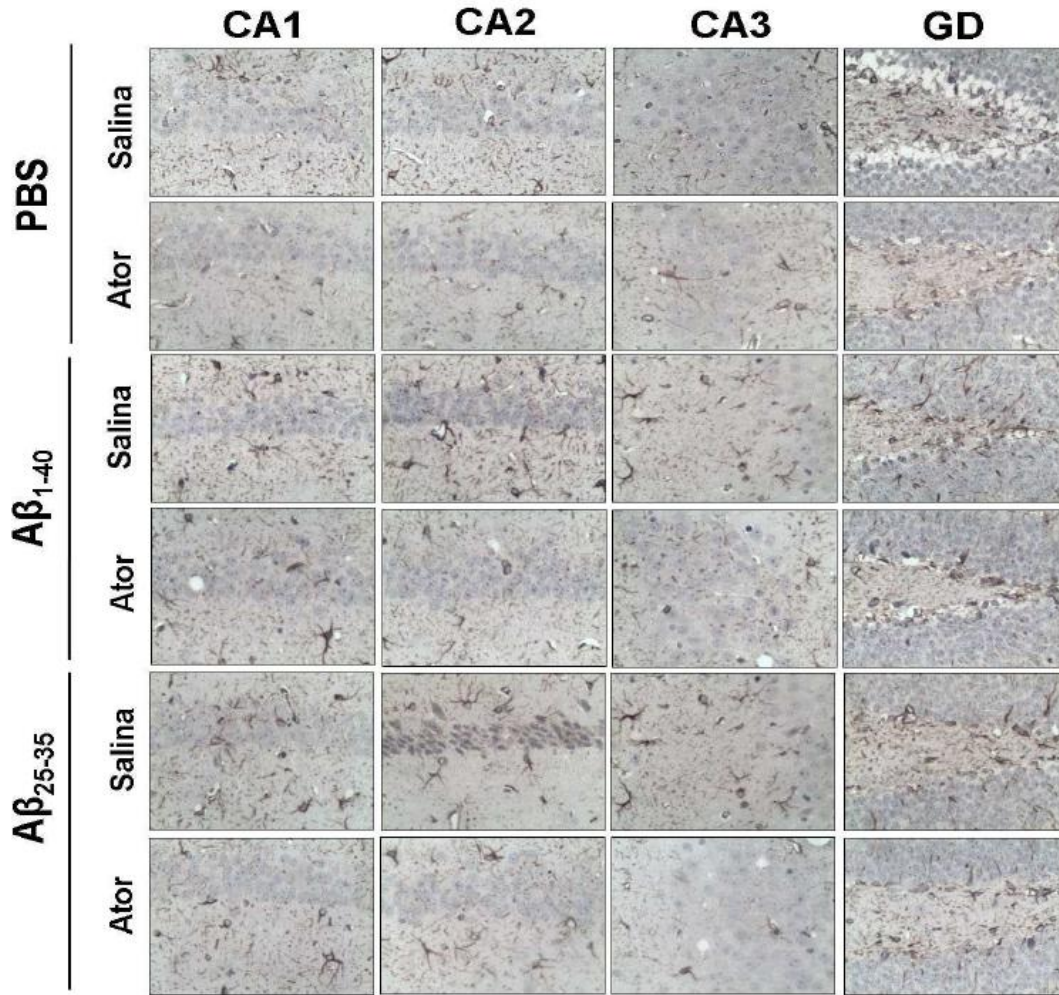


Figura 12. Quantificação de morte celular 16 dias após a infusão i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ e Aβ₂₅₋₃₅ em fatias de hipocampo de camundongos. A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o) foi administrada após a injeção i.c.v. de Aβ₁₋₄₀ ou Aβ₂₅₋₃₅ durante 7 dias consecutivos. As imagens capturadas foram analisadas utilizando Scion Image software (A-B). A área fluorescente pelo iodeto de propídeo (IP) foi determinada por análise densitométrica (C-D). Valores expressos como média ± erro padrão. *P <0,05 comparado com o grupo controle. #P <0,05 comparado ao grupo Aβ₁₋₄₀ e Aβ₂₅₋₃₅.

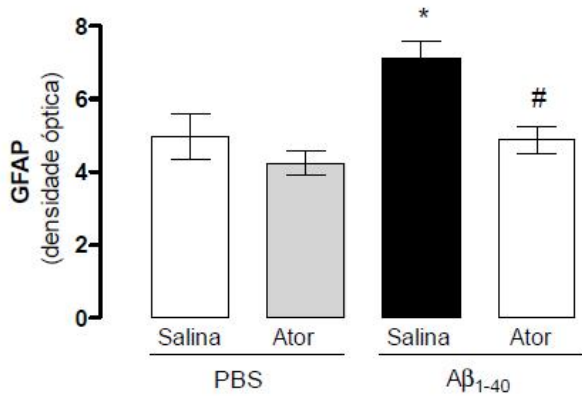
5.5 Detecção da ativação de astrócitos no hipocampo de camundongos tratados com $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$ e atorvastatina

A ativação das células da glia é considerada um dos primeiros sinais da doença de Alzheimer e ocorre em resposta ao aumento na degeneração das sinapses e neurônios ou pelo acúmulo de placas amilóides no cérebro. No presente estudo, foi avaliada a ativação dos astrócitos através da imunodetecção da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Hipocampos obtidos de animais tratados com $A\beta_{1-40}$ (Figura 13B) e $A\beta_{25-35}$ (Figura 13C) apresentaram um aumento na marcação para GFAP nas subregiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) quando analisados 16 dias após o tratamento com os peptídeos. O efeito da atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) no processo de migração celular induzido pela injeção i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{25-35}$, também foi avaliado. O tratamento com atorvastatina reduziu de forma significativa o aumento no número de células imunorreativas para GFAP, induzido tanto pelo $A\beta_{1-40}$ como pelo $A\beta_{25-35}$, quando comparados ao grupo de animais tratados com veículo (Fig. 13A,B).

A



B



C

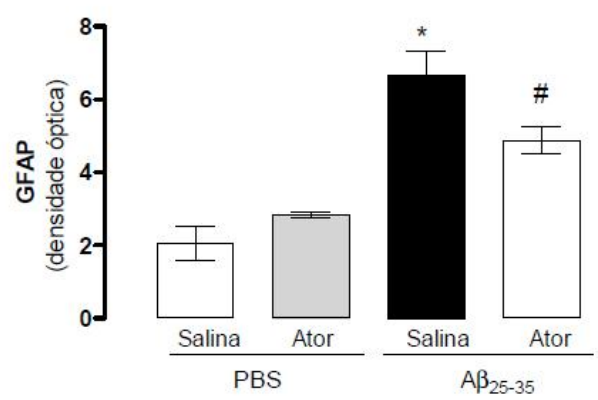


Figura 13. Avaliação da ativação de células gliais pela detecção de GFAP no hipocampo de camundongos. A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o) foi administrada após a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$ durante 7 dias consecutivos. Imagens representativas da reação de imunohistoquímica para a GFAP (A) analisada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD). Aumento de 4x e 400x. Medida da densidade óptica (D.O.) nas amostras imunoreativas para GFAP (B-C) avaliada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD (C-D). Os valores estão expressos como a média \pm erro padrão * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$. (N = 3).

5.6 Expressão da proteína inflamatória COX-2 no hipocampo de camundongos tratados com $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$ e atorvastatina

A expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) foi avaliada no hipocampo de camundongos 16 dias após o tratamento com os peptídeos, através da técnica de imunohistoquímica. A enzima COX-2 foi detectada no hipocampo de animais tratados com veículo (PBS, i.c.v.). Por sua vez, o tratamento i.c.v. com $A\beta_{1-40}$ promoveu um aumento significativo na expressão da COX-2 nas diferentes sub-regiões do hipocampo (Figura 14B). A administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{25-35}$ também mostrou um aumento na expressão de COX-2, no entanto este não atingiu significância estatística (Figura 14C). Como demonstrado na Figura 14 o tratamento com atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) reduziu o aumento na expressão da COX-2 induzido pelo $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,05$). A atorvastatina promoveu uma inibição de aproximadamente 50 % no aumento da expressão da COX-2 induzido pela $A\beta_{1-40}$. Estes resultados sugerem que a atorvastatina apresenta um efeito mediador na regulação da expressão da proteína COX-2 neste modelo animal da doença de Alzheimer.

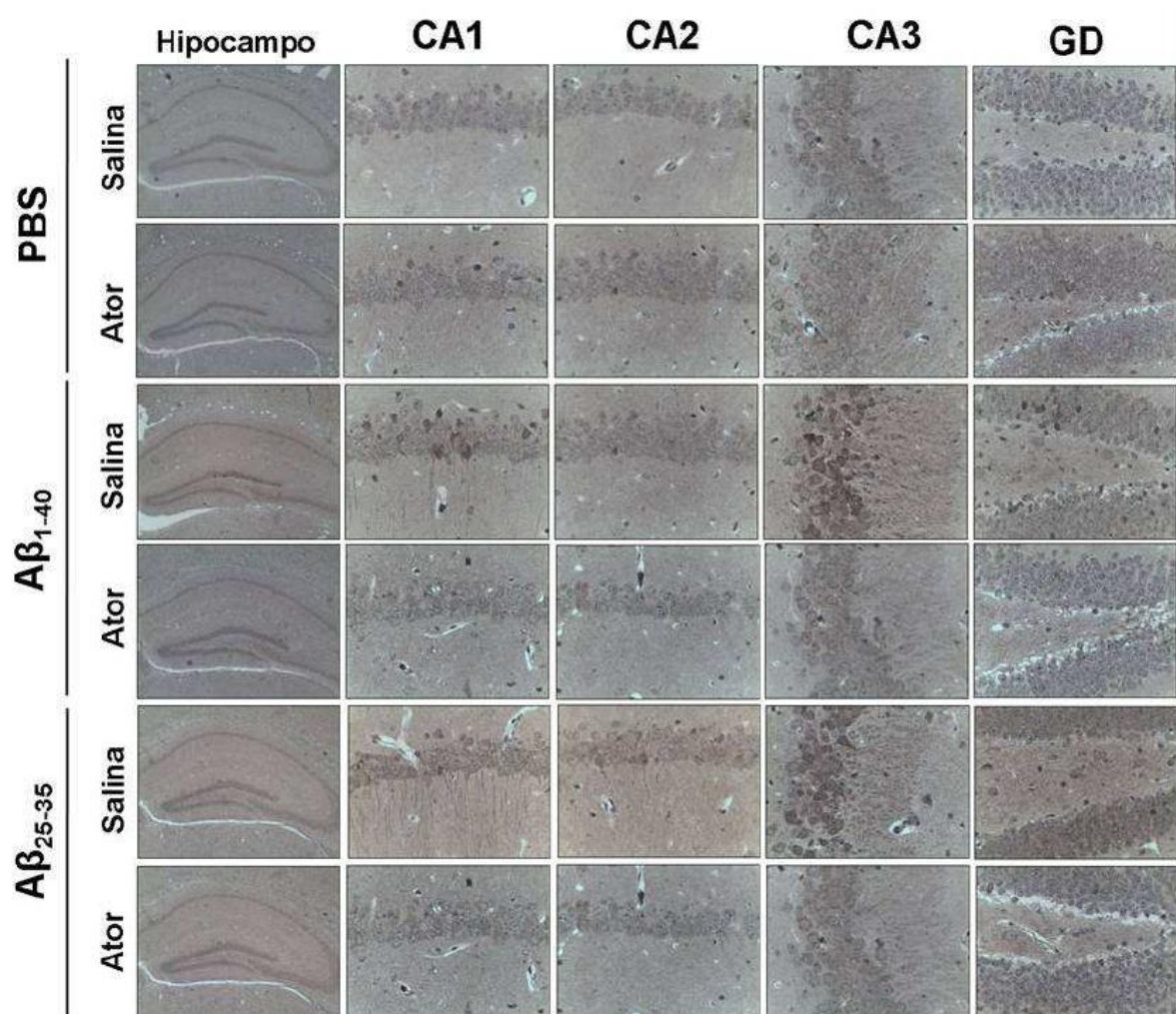
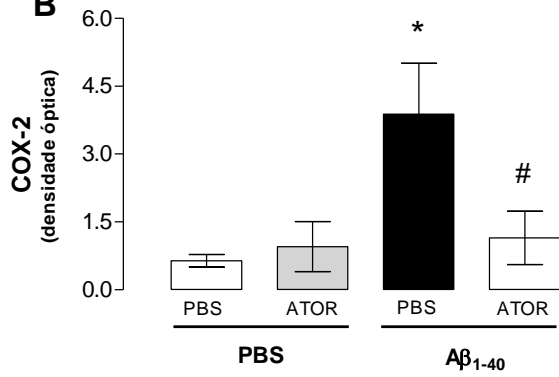
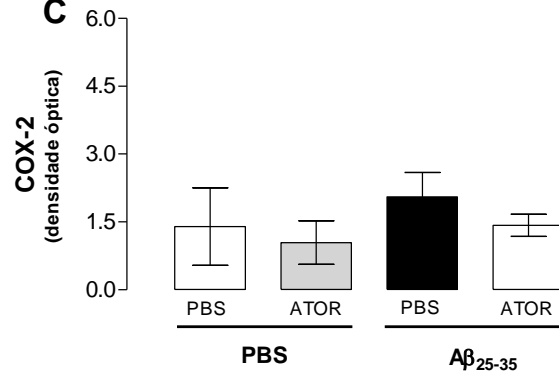
A**B****C**

Figura 14. Efeito dos peptídeos $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$ e da atorvastatina sobre a expressão da proteína inflamatória COX-2. A atorvastatina (10 mg/Kg/dia, v.o.) ou salina (v.o) foi administrada após a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$ durante 7 dias consecutivos. Imagens representativas da reação de imunohistoquímica para a proteína inflamatória COX-2 (A) analisada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD). Aumento de 4x e 400x. Medida da densidade óptica (D.O.) nas amostras imunoreativas para COX-2 (B-C) avaliada nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD (C-D). Os valores estão expressos como a média \pm erro padrão *P < 0,05 comparado ao grupo controle. #P < 0,05 comparado ao grupo $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{25-35}$. (N = 3).

6 DISCUSSÃO

O peptídeo β -amilóide é o principal componente das placas senis e o maior contribuinte para a patogênese da doença de Alzheimer. Os resultados aqui demonstrados indicam que o prejuízo cognitivo induzido 16 dias após uma única injeção intracerebroventricular dos peptídeos A β 1-40 ou A β 25-35 em camundongos são acompanhadas com mudanças no sistema glutamatérgico, alterando a captação de glutamato e diminuindo os níveis de expressão dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1. A interação entre o peptídeo A β e o sistema glutamatérgico possuem um importante papel no desenvolvimento da patologia da DA (Butterfield e Pocernich, 2003; Hynd, Scott et al., 2004; Gasparini e Dityatev, 2008).

Para visualizar as alterações bioquímicas, foram obtidas fatias hipocampais provenientes dos camundongos infundidos com os peptídeos A β 1-40 ou A β 25-35. Nestes animais foi possível observar uma significativa redução da captação de glutamato (Figura 7). As análises imunohistoquímicas revelaram redução na expressão dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1 nas sub-regiões hipocampais.

Os resultados aqui apresentados, utilizando um modelo in vivo da DA, corroboram com estudos in vitro demonstrando que a captação de glutamato e também níveis e funcionalidade de transportadores são especificamente diminuídos pelo peptídeo A β (Harris, Wang et al., 1996; Mattson & Chan, 2003; Fernandez-Tome, Brera et al., 2004; Matos, Augusto et al., 2008)

A ação destes transportadores é de vital importância para impedir a excitotoxicidade, sendo que os transportadores gliais, GLAST e GLT-1 (EAAT1 e 2) são os principais responsáveis pelo transporte de glutamato presente no espaço extracelular. Estudos prévios demonstraram a importância da regulação desses transportadores usando animais que não expressavam EAAT2.

Esses animais desenvolveram progressiva neurodegeneração e epilepsia resultante da perturbação da homeostase do glutamato (Rothstein, Dykes-Hoberg et al., 1996). As alterações no transporte de glutamato podem ser provenientes do estresse oxidativo e da presença de inflamação resultante da infusão do peptídeo A β 1-40 ou A β 25-35 (Figura 10). Juntas, essas alterações podem contribuir para a morte celular presente na doença de Alzheimer.

O HNE (4-hidróxinonal) já demonstrou causar modificações protéicas em resíduo de cisteína, lisina e histidina por um processo chamado de adição de Michael (Trotti et al., 1996). Essas modificações prejudicam a função de ATPases de transporte iônico e do transportador de glutamato GLT-1 (Blanc, Keller et al., 1998; Lauderback, Hackett et al., 2001). Recentemente, Matos e colaboradores (2008), demonstraram que o estresse oxidativo pode ativar MAP cinases, ERK, p38 e c-Jun, na primeira fase do tratamento com A β 1-40 e essas vias podem modular a atividade e níveis de transportadores de glutamato.

Embora, experimentos *in vitro* tenham demonstrado que a inibição dos transportadores de glutamato induzido pelo A β 25-35 geralmente está acompanhada de morte celular (Fernandez-Tome, Brera et al., 2004; Matos, Augusto et al., 2008), *in vivo* a ação do peptídeo A β 25-35 não resultou em mudanças significativas da viabilidade celular pelas metodologias utilizadas neste estudo (Figura 11 e 12), apesar de apresentar prejuízo cognitivo e diminuição da captação de glutamato semelhante ao peptídeo A β 1-40 (Figura 7 e 8).

No entanto, cabe lembrar que a forma agregada do peptídeo A β 25-35 pode causar diminuição no número de células na região CA1 do hipocampo 30 dias após infusão intracerebroventricular (Stepanichev, Zdobnova et al., 2004), diferentemente do realizado neste estudo, em que a viabilidade celular foi avaliada 16 dias após a infusão dos peptídeos (Figuras

11 e 12). Por outro lado, o peptídeo A β 1-40 apresentou efeitos significativos na morte celular, consistentes com a literatura (Miguel-Hidalgo, Alvarez et al., 2002).

Para determinar a possível ativação das células da glia pela administração i.c.v. dos peptídeos A β 1-40 e A β 25-35, foi realizada a imunodeteção de GFAP e da ciclooxigenase-2 (COX-2) no hipocampo. Os resultados do presente estudo fornecem evidências moleculares significativas, indicando que a injeção i.c.v. de peptídeos A β 1-40 e A β 25-35 promove a ativação das células inflamatórias no SNC.

Entretanto, a infusão do peptídeo A β 25-35 não modificou de forma significativa a expressão da COX-2. Outros estudos identificaram presença de proteínas inflamatória apenas com concentrações maiores deste peptídeo (50 nmol/5 μ l/animal) (Cheng, Whitehead et al., 2006).

A presença de mediadores inflamatórios já foi descrita 24hs após a infusão do peptídeo A β 1-40 (Medeiros, Prediger et al., 2007) . Acredita-se que COX-2 seja de primária importância nas respostas inflamatórias (O'banion, 1999). De maneira interessante, o aumento na expressão da COX-2 parece persistir até 16 dias após a infusão do peptídeo (Figura 13).

Em várias condições patológicas, como na doença de Alzheimer, ocorre aumento da expressão da enzima COX-2, principalmente na microglia (Pasinetti, 1998; Minghetti, Walsh et al., 1999; Mirjany, Ho et al., 2002). Por razões ainda não totalmente esclarecidas, a morte ou disfunção de neurônios resulta tipicamente na ativação da microglia vizinha. Uma vez ativada, a microglia torna-se uma fonte proeminente de oxidantes, prostanóides e citocinas inflamatórias. Essas podem agir diretamente sobre os neurônios, ou prejudicar a capacidade dos astrócitos de seqüestrar e metabolizar o glutamato, que por sua vez, promove morte e disfunção nos neurônios (Trotti, Rossi et al., 1996; Bezzi, Carmignoto et al., 1998; Mirjany, Ho et al., 2002), resultando em um ciclo vicioso com progressiva perda neuronal.

As evidências de que o tratamento com atorvastatina reduz o risco de desenvolver a doença de Alzheimer, tem motivado vários grupos de pesquisadores a examinar o impacto das estatinas nos mecanismos envolvidos nesta patologia.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o tratamento com atorvastatina protege contra a morte celular, lipoperoxidação e diminui significativamente a ativação de células gliais e a expressão de um mediador inflamatório induzidos pela infusão i.c.v dos peptídeos beta-amilóide. Por outro lado, a atorvastatina não protegeu contra o prejuízo cognitivo induzido pelos peptídeos beta-amilóide (Figura 6) e também não alterou a redução na captação de glutamato (Figura 7). No entanto, a redução na expressão dos transportadores astrocitários de glutamato foi revertida pelo tratamento com atorvastatina (Figura 11).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o trânsito e a expressão de transportadores glutamatérgicos nas membranas podem ser mediados pela ativação da via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) e proteína cinase B (Akt) (Sims, Straff et al., 2000; Guillet, Velly et al., 2005; Krizman-Genda, Gonzalez et al., 2005). A fosforilação e conseqüentemente ativação da PI3K/Akt está aumentada após o tratamento com atorvastatina (Zhang, Zhang et al., 2007; Piermartiri, Vandresen-Filho et al., 2008) o que poderia regular a expressão dos transportadores GLAST e GLT-1 na superfície celular.

Por outro lado, o fato de que a atividade destes transportadores permanece reduzida mesmo após o aumento da sua expressão, pode estar relacionado com a alteração do estado redox celular, que não foi completamente revertido pelo tratamento com a atorvastatina (Figura 10A).

Recentemente (Kurinami, Sato et al., 2008), publicaram um trabalho utilizando a fluvastatina e observaram que apenas o pré-tratamento e não o pós-tratamento pode proteger contra estresse oxidativo e prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo beta-amilóide.

De fato, o pré-tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/dia v.o) foi capaz de prevenir a redução da captação de glutamato e o dano celular causado pela infusão de ácido quinolínico, um agonista do receptor NMDA (Piermartiri, Vandresen-Filho et al., 2008).

Diversos mecanismos têm sido associados ao efeito protetor da atorvastatina contra a morte celular. A inibição de produtos da peroxidação lipídica e de agentes antiinflamatórios pode contribuir para proteção celular em doenças neurodegenerativas. Corroborando com os nossos dados, o tratamento com atorvastatina durante 2 semanas causou diminuição de 4-hidróxinonenal (HNE) e 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) induzidos por insulto isquêmico (Hayashi, Hamakawa et al., 2005). E experimentos in vitro demonstraram que as estatinas podem atenuar respostas inflamatórias mediadas por A β 25-35 e A β 1-40, por limitar os níveis de GGPP e subseqüentemente inibir a prenilação de Rho GTPase (Cordle e Landreth, 2005).

Nas últimas décadas o papel da ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas (PGs) nas doenças cerebrais vêm sendo extensivamente estudado. A expressão aumentada da COX-2 tem sido associada com neurotoxicidade (Minghetti, 2007). Efeitos modulatórios da atorvastatina na expressão de COX-2 por células endoteliais na periferia já foi previamente demonstrado (Deng, Zhao et al., 2006), mas esta é a primeira evidência que uma estatina pode modular a expressão da COX-2 também no cérebro.

Outros efeitos adicionais das estatinas envolvem o aumento da expressão e ativação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (Sironi, Cimino et al., 2003), que converte o nitrogênio da guanidina presente na L-arginina para NO. NO vascular regula a perfusão cerebral em parte por relaxar a musculatura vascular. Este mecanismo pode ser neuroprotetor após indução de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média (Amarenco e Moskowitz, 2006). Entretanto, o NO mantido pelas estatinas, pode reagir com o aniôn superóxido e formar o

ONOO-, que pode oxidar resíduos de cisteína e/ou tirosina dos transportadores de glutamato e dessa forma prejudicar a sua função, diminuindo a captação (Trotti, Danbolt et al., 1998).

Efeitos deletérios induzidos por algumas estatinas já foram demonstrados. Após 4 semanas de tratamento, a lovastatina (0,5 - 10 mg/Kg/dia) (Chauhan, Siegel et al., 2004), aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF α de maneira dependente do dose no cérebro de camundongos que expressavam APP. Estas observações foram associadas à histotoxicidade no fígado e músculo.

Resumindo, esses resultados sugerem a existência de diferentes mecanismos envolvidos no déficit cognitivo induzido pelos peptídeos A β 1-40 e A β 25-35. O peptídeo A β 25-35 tem sido largamente utilizado para mimetizar a neurotoxicidade do fragmento inteiro A β 40 ou A β 42 e estudos in vitro relatam que ambos os peptídeos induzem um padrão similar de neurotoxicidade (Frezza, Horn et al., 2009). É provável que a agregação do peptídeo A β 25-35 possa resultar em observações diferentes das reportadas neste estudo, embora a forma solúvel utilizada em nosso estudo tenha produzidos efeitos semelhantes no prejuízo cognitivo, alteração glutamatérgica e estresse oxidativo, que não são acompanhadas de morte celular, sugerindo uma maior neurotoxicidade por parte do A β 1-40.

O tratamento com atorvastatina não reverteu a diminuição cognitiva e da captação de glutamato, mas reverte parâmetros associados a viabilidade celular reduzindo o processo de neurodegeneração. Neste contexto a diminuição da ativação de células gliais pode ocasionar diminuição na expressão de produtos inflamatórios, como a COX-2, um importante mecanismo para reduzir respostas inflamatórias presentes na patologia da DA.

Essas ações conferem a atorvastatina uma larga escala de aplicações terapêuticas ou preventivas no tratamento de várias doenças neurais, uma vez que seu uso em humanos é bem tolerado.

7 CONCLUSÕES

1. A infusão i.c.v. dos peptídeos $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$ causou prejuízos cognitivos nos camundongos, no entanto o tratamento com atorvastatina não reverteu esse processo.
2. Houve diminuição na captação de glutamato observadas em fatias hipocampais obtidas de camundongos infundidos com os peptídeos $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$, sem reversão pelo tratamento com atorvastatina.
3. Observou-se diminuição da expressão dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT1 no hipocampo de camundongos infundidos com $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$. O tratamento com atorvastatina foi capaz de reverter e aumentar a expressão destes transportadores no animais infundidos com o $A\beta_{1-40}$.
4. O tratamento com atorvastatina reverteu o aumento de TBARS, mas não a diminuição de NPSH causada pela infusão i.c.v. dos peptídeos $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{1-40}$ em camundongos.
5. A infusão i.c.v. dos peptídeos $A\beta_{1-40}$, mas não $A\beta_{25-35}$ causou morte celular, e o tratamento com atorvastatina reverteu este dano.
6. A ativação de astrócitos pela imunorreatividade para GFAP, foi observada no hipocampo dos animais infundidos com $A\beta_{1-40}$, e $A\beta_{25-35}$, e o aumento da expressão da proteína inflamatória COX-2 apenas nos camundongos infundidos com o peptídeo $A\beta_{1-40}$.
7. A atorvastatina reduziu de forma significativa o aumento no número de células positivas para GFAP, e COX-2 no hipocampo.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akiyama, H., S. Barger, *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, v.21, n.3, May-Jun, p.383-421. 2000.

Allen, R. G. e M. Tresini. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med, v.28, n.3, Feb 1, p.463-99. 2000.

Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, *et al.* Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron, v.15, n.4, Oct, p.961-73. 1995.

Arundine, M. e M. Tymianski. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Cell Calcium, v.34, n.4-5, Oct-Nov, p.325-37. 2003.

Ashe, P. C. e M. D. Berry. Apoptotic signaling cascades. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.27, n.2, Apr, p.199-214. 2003.

Barber, D. A. e S. R. Harris. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm, v.NS34, n.9, Sep, p.26-35. 1994.

Beart, P. M. e R. D. O'shea. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. Br J Pharmacol, v.150, n.1, Jan, p.5-17. 2007.

Bell, K. F. e A. Claudio Cuello. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. Eur J Pharmacol, v.545, n.1, Sep 1, p.11-21. 2006.

Bezzi, P., G. Carmignoto, *et al.* Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. Nature, v.391, n.6664, Jan 15, p.281-5. 1998.

Blanc, E. M., J. N. Keller, *et al.* 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. Glia, v.22, n.2, Feb, p.149-60. 1998.

Bonfoco, E., D. Krainc, *et al.* Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.16, Aug 1, p.7162-6. 1995.

Bosel, J., F. Gandor, *et al.* Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. J Neurochem, v.92, n.6, Mar, p.1386-98. 2005.

Boulter, J., M. Hollmann, *et al.* Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. Science, v.249, n.4972, Aug 31, p.1033-7. 1990.

Bretillon, L., D. Lutjohann, *et al.* Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. J Lipid Res, v.41, n.5, May, p.840-5. 2000.

Butterfield, D. A. e C. B. Pocernich. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. CNS Drugs, v.17, n.9, p.641-52. 2003.

Butterfield, D. A., T. Reed, *et al.* Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Free Radic Biol Med, v.43, n.5, Sep 1, p.658-77. 2007.

Cankurtaran, M., B. B. Yavuz, *et al.* Risk factors and type of dementia: vascular or Alzheimer? Arch Gerontol Geriatr, v.47, n.1, Jul-Aug, p.25-34. 2008.

Carroll, R. C., D. V. Lissin, *et al.* Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. Nat Neurosci, v.2, n.5, May, p.454-60. 1999.

Cassery, I. e E. Topol. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. Lancet, v.363, n.9415, Apr 3, p.1139-46. 2004.

Cheng, G., S. N. Whitehead, *et al.* Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on beta-amyloid (25-35)-induced inflammatory responses and memory deficits in the rat. Neurobiol Dis, v.23, n.1, Jul, p.140-51. 2006.

Cimino, M., P. Gelosa, *et al.* Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. Neuroscientist, v.13, n.3, Jun, p.208-13. 2007.

Clarke, R. M., F. O'connell, *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of amyloid-beta1-42 in the rat hippocampus in vivo. Neuropharmacology, v.52, n.1, Jan, p.136-45. 2007.

Cordle, A. e G. Landreth. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses. J Neurosci, v.25, n.2, Jan 12, p.299-307. 2005.

Cummings, B. J., A. J. Mason, *et al.* Optimization of techniques for the maximal detection and quantification of Alzheimer's-related neuropathology with digital imaging. Neurobiol Aging, v.23, n.2, Mar-Apr, p.161-70. 2002.

Danbolt, N. C. Glutamate uptake. Prog Neurobiol, v.65, n.1, Sep, p.1-105. 2001.

Deng, P., S. P. Zhao, *et al.* Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response. Clin Chem, v.52, n.2, Feb, p.300-3. 2006.

Dingledine, R., K. Borges, *et al.* The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev, v.51, n.1, Mar, p.7-61. 1999.

Dirnagl, U., R. P. Simon, *et al.* Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. Trends Neurosci, v.26, n.5, May, p.248-54. 2003.

Duke, R. C., D. M. Ojcius, *et al.* Cell suicide in health and disease. Sci Am, v.275, n.6, Dec, p.80-7. 1996.

Eehalt, R., P. Keller, *et al.* Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. J Cell Biol, v.160, n.1, Jan 6, p.113-23. 2003.

Eikelenboom, P., A. J. Rozemuller, *et al.* Neuroinflammation and Alzheimer disease: clinical and therapeutic implications. Alzheimer Dis Assoc Disord, v.14 Suppl 1, p.S54-61. 2000.

Emerit, J., M. Edeas, *et al.* Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomed Pharmacother, v.58, n.1, Jan, p.39-46. 2004.

Fernandez-Tome, P., B. Brera, *et al.* Beta-amyloid₂₅₋₃₅ inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. Neurobiol Dis, v.15, n.3, Apr, p.580-9. 2004.

Ferreiro, E., C. R. Oliveira, *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. J Neurosci Res, v.76, n.6, Jun 15, p.872-80. 2004.

Freir, D. B., D. A. Costello, *et al.* A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil. J Neurophysiol, v.89, n.6, Jun, p.3061-9. 2003.

Gasparini, L. e A. Dityatev. Beta-amyloid and glutamate receptors. Exp Neurol, v.212, n.1, Jul, p.1-4. 2008.

Glenner, G. G. e C. W. Wong. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun, v.120, n.3, May 16, p.885-90. 1984.

Gotto, A. M., Jr. The cardiology patient page. Statins: powerful drugs for lowering cholesterol: advice for patients. Circulation, v.105, n.13, Apr 2, p.1514-6. 2002.

Gu, Q. B., J. X. Zhao, *et al.* Modulation of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾ pumping and neurotransmitter uptake by beta-amyloid. Neuroscience, v.126, n.1, p.61-7. 2004.

Guillet, B. A., L. J. Velly, *et al.* Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. Neurochem Int, v.46, n.4, Mar, p.337-46. 2005.

Haass, C. e D. J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.2, Feb, p.101-12. 2007.

Harris, M. E., Y. Wang, *et al.* Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. J Neurochem, v.67, n.1, Jul, p.277-86. 1996.

Hayashi, T., K. Hamakawa, *et al.* HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. Brain Res, v.1037, n.1-2, Mar 10, p.52-8. 2005.

Hayashi, Y., S. H. Shi, *et al.* Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. Science, v.287, n.5461, Mar 24, p.2262-7. 2000.

Holscher, C., S. Gengler, *et al.* Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. Eur J Pharmacol, v.561, n.1-3, Apr 30, p.85-90. 2007.

Huettner, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. Prog Neurobiol, v.70, n.5, Aug, p.387-407. 2003.

Hynd, M. R., H. L. Scott, *et al.* Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Neurochem Int, v.45, n.5, Oct, p.583-95. 2004.

Jang, M. H., X. L. Piao, *et al.* Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. Biol Pharm Bull, v.30, n.6, Jun, p.1130-4. 2007.

Kanai, Y. e M. A. Hediger. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. Eur J Pharmacol, v.479, n.1-3, Oct 31, p.237-47. 2003.

Kenny, P. J. e A. Markou. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.5, May, p.265-72. 2004.

Krizman-Genda, E., M. I. Gonzalez, *et al.* Evidence that Akt mediates platelet-derived growth factor-dependent increases in activity and surface expression of the neuronal glutamate transporter, EAAC1. Neuropharmacology, v.49, n.6, Nov, p.872-82. 2005.

Kurinami, H., N. Sato, *et al.* 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, v.21, n.5, May, p.531-7. 2008.

Lahiri, D. K., K. Sambamurti, *et al.* Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, v.25, n.5, May-Jun, p.651-60. 2004.

- Lauderback, C. M., J. M. Hackett, *et al.* The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. J Neurochem, v.78, n.2, Jul, p.413-6. 2001.
- Laursen, S. E. e J. K. Belknap. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. J Pharmacol Methods, v.16, n.4, Dec, p.355-7. 1986.
- Leblanc, A. C. Natural cellular inhibitors of caspases. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.27, n.2, Apr, p.215-29. 2003.
- Lee, S. T., K. Chu, *et al.* Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. J Neurochem, v.104, n.5, Mar, p.1190-200. 2008.
- Liao, J. K. e U. Laufs. Pleiotropic effects of statins. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.45, p.89-118. 2005.
- Liao, M. Q., Y. J. Tzeng, *et al.* The correlation between neurotoxicity, aggregative ability and secondary structure studied by sequence truncated Abeta peptides. FEBS Lett, v.581, n.6, Mar 20, p.1161-5. 2007.
- Locatelli, S., D. Lutjohann, *et al.* Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. Arch Neurol, v.59, n.2, Feb, p.213-6. 2002.
- Lu, D., A. Goussev, *et al.* Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. J Neurotrauma, v.21, n.1, Jan, p.21-32. 2004.
- Luber-Narod, J. e J. Rogers. Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system. Neurosci Lett, v.94, n.1-2, Nov 22, p.17-22. 1988.
- Lutjohann, D., A. Papassotiropoulos, *et al.* Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. J Lipid Res, v.41, n.2, Feb, p.195-8. 2000.
- Matos, M., E. Augusto, *et al.* Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. Neuroscience, v.156, n.4, Oct 28, p.898-910. 2008.
- Mattson, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. Neuromolecular Med, v.3, n.2, p.65-94. 2003.
- _____. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature, v.430, n.7000, Aug 5, p.631-9. 2004.

_____. Calcium and neurodegeneration. Aging Cell, v.6, n.3, Jun, p.337-50. 2007.

Mattson, M. P. e S. L. Chan. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. Cell Calcium, v.34, n.4-5, Oct-Nov, p.385-97. 2003.

Maxfield, F. R. e I. Tabas. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature, v.438, n.7068, Dec 1, p.612-21. 2005.

Mcconkey, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. Toxicol Lett, v.99, n.3, Nov 12, p.157-68. 1998.

Mcdonald, M. P. e J. B. Overmier. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. Neurosci Biobehav Rev, v.22, n.1, p.99-120. 1998.

Mcdonald, M. P., J. B. Overmier, *et al.* Reversal of beta-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues. Neurobiol Learn Mem, v.65, n.1, Jan, p.35-47. 1996.

Mcgeer, P. L. e E. G. Mcgeer. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. J Neurovirol, v.8, n.6, Dec, p.529-38. 2002.

Medeiros, R., R. D. Prediger, *et al.* 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, v.27, n.20, May 16, p.5394-404. 2007.

Miguel-Hidalgo, J. J., X. A. Alvarez, *et al.* Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). Brain Res, v.958, n.1, Dec 20, p.210-21. 2002.

Miida, T., S. Hirayama, *et al.* Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. J Atheroscler Thromb, v.11, n.5, p.253-64. 2004.

Miida, T., A. Takahashi, *et al.* Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. Pharmacol Ther, v.113, n.2, Feb, p.378-93. 2007.

Minghetti, L. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases. Subcell Biochem, v.42, p.127-41. 2007.

Minghetti, L., D. T. Walsh, *et al.* In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. J Neuropathol Exp Neurol, v.58, n.11, Nov, p.1184-91. 1999.

Mirjany, M., L. Ho, *et al.* Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. J Pharmacol Exp Ther, v.301, n.2, May, p.494-500. 2002.

Morris, R. G., P. Garrud, *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature, v.297, n.5868, Jun 24, p.681-3. 1982.

Nicotera, P. e M. Leist. Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. Cell Death Differ, v.4, n.6, Aug, p.435-42. 1997.

O'banion, M. K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. Crit Rev Neurobiol, v.13, n.1, p.45-82. 1999.

Ozawa, S., H. Kamiya, *et al.* Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol, v.54, n.5, Apr, p.581-618. 1998.

Parameshwaran, K., M. Dhanasekaran, *et al.* Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. Exp Neurol, v.210, n.1, Mar, p.7-13. 2008.

Pasinetti, G. M. Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. J Neurosci Res, v.54, n.1, Oct 1, p.1-6. 1998.

Pettmann, B. e C. E. Henderson. Neuronal cell death. Neuron, v.20, n.4, Apr, p.633-47. 1998.

Piermartiri, T. C. B., S. Vandresen-Filho, *et al.* Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death Due to Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice by Increasing Akt phosphorylation and Glutamate Uptake [Abstract] www.sfn.org Artigo submetido. 2008.

Prediger, R. D., J. L. Franco, *et al.* Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. Behav Brain Res, v.177, n.2, Feb 27, p.205-13. 2007.

Prediger, R. D., R. Medeiros, *et al.* Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience, v.151, n.3, Feb 6, p.631-43. 2008.

Puglielli, L., R. E. Tanzi, *et al.* Alzheimer's disease: the cholesterol connection. Nat Neurosci, v.6, n.4, Apr, p.345-51. 2003.

Reid, P. C., Y. Urano, *et al.* Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. J Cell Mol Med, v.11, n.3, May-Jun, p.383-92. 2007.

Rogaeva, E., T. Kawarai, *et al.* Genetic complexity of Alzheimer's disease: successes and challenges. J Alzheimers Dis, v.9, n.3 Suppl, p.381-7. 2006.

Rogers, J., L. C. Kirby, *et al.* Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. Neurology, v.43, n.8, Aug, p.1609-11. 1993.

Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron, v.16, n.3, Mar, p.675-86. 1996.

Rovira, C., N. Arbez, *et al.* Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. Biochem Biophys Res Commun, v.296, n.5, Sep 6, p.1317-21. 2002.

Schonknecht, P., D. Lutjohann, *et al.* Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. Neurosci Lett, v.324, n.1, May 10, p.83-5. 2002.

Selkoe, D. J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. J Alzheimers Dis, v.3, n.1, Feb, p.75-80. 2001.

Shaw, L. M., M. Korecka, *et al.* Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. Nat Rev Drug Discov, v.6, n.4, Apr, p.295-303. 2007.

Shen, Y. X., S. Y. Xu, *et al.* The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. J Pineal Res, v.32, n.2, Mar, p.85-9. 2002.

Shigeri, Y., R. P. Seal, *et al.* Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. Brain Res Brain Res Rev, v.45, n.3, Jul, p.250-65. 2004.

Sims, K. D., D. J. Straff, *et al.* Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem, v.275, n.7, Feb 18, p.5228-37. 2000.

Sjogren, M., M. Mielke, *et al.* Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? Mech Ageing Dev, v.127, n.2, Feb, p.138-47. 2006.

Sprecher, D. L. Where to draw the line using statins: lessons from 4S to AFCAPS/TexCAPS. Cleve Clin J Med, v.67, n.3, Mar, p.169-71. 2000.

Stepanichev, M. Y., I. M. Zdobnova, *et al.* Studies of the effects of central administration of beta-amyloid peptide (25-35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory. Neurosci Behav Physiol, v.36, n.1, Jan, p.101-6. 2006.

_____. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. Physiol Behav, v.80, n.5, Feb, p.647-55. 2004.

Syntichaki, P. e N. Tavernarakis. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? Nat Rev Neurosci, v.4, n.8, Aug, p.672-84. 2003.

Tanzi, R. E. e L. Bertram. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. Neuron, v.32, n.2, Oct 25, p.181-4. 2001.

Torres, G. E. e S. G. Amara. Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. Curr Opin Neurobiol, v.17, n.3, Jun, p.304-12. 2007.

Trotti, D., N. C. Danbolt, *et al.* Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? Trends Pharmacol Sci, v.19, n.8, Aug, p.328-34. 1998.

Trotti, D., D. Rossi, *et al.* Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. J Biol Chem, v.271, n.11, Mar 15, p.5976-9. 1996.

Veillard, N. R. e F. Mach. Statins: the new aspirin? Cell Mol Life Sci, v.59, n.11, Nov, p.1771-86. 2002.

Waters, D. D. Safety of high-dose atorvastatin therapy. Am J Cardiol, v.96, n.5A, Sep 5, p.69F-75F. 2005.

Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? Nat Med, v.12, n.9, Sep, p.1005-15. 2006.

Yamada, K. e T. Nabeshima. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacol Ther, v.88, n.2, Nov, p.93-113. 2000.

Zacco, A., J. Togo, *et al.* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. J Neurosci, v.23, n.35, Dec 3, p.11104-11. 2003.

Zandi, P. P., J. C. Breitner, *et al.* Is pharmacological prevention of Alzheimer's a realistic goal? Expert Opin Pharmacother, v.3, n.4, Apr, p.365-80. 2002.

Zeng, H., Q. Chen, *et al.* Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. Free Radic Biol Med, v.36, n.2, Jan 15, p.180-8. 2004.

Zhang, L., Z. G. Zhang, *et al.* The PI3K/Akt pathway mediates the neuroprotective effect of atorvastatin in extending thrombolytic therapy after embolic stroke in the rat. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.11, Nov, p.2470-5. 2007.