

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Rafaela Ferreira Pacheco

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA SINVASTATINA E DO
ALENDRONATO EM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER DO TIPO
ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Porto Alegre

2019

Rafaela Ferreira Pacheco

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA SINVASTATINA E DO
ALENDRONATO EM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER DO TIPO
ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Carlos Alberto Saraiva
Gonçalves

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Pacheco, Rafaela Ferreira
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA
SINVESTATINA E DO ALENDRONATO EM MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER DO TIPO ESPORÁDICA INDUZIDA POR
ESTREPTOZOTOCINA / Rafaela Ferreira Pacheco. -- 2019.
86 f.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Modelo de Doença de Alzheimer. 2. Sinvastatina.
3. Alendrona. 4. Estatina. 5. Bisfophonato. I.
Gonçalves, Carlos Alberto Saraiva, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e ao Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

À minha amada família, aos meus pais Ana Lúcia e Geraldo, ao meu irmão Vinícius, os quais sempre me incentivaram a estudar, e me apoiaram ao longo desse caminho, com muito amor e dedicação;

Ao meu namorado e companheiro Rodrigo que esteve ao meu lado sempre, me ajudando e apoiando, com muita paciência, amor e carinho nesses últimos anos;

Ao professor Carlos Alberto “CA” por ter me acolhido e por todas as oportunidades oferecidas para a realização deste mestrado em seu laboratório;

A Ana Carolina que me ajudou durante a graduação e ter uma oportunidade de fazer estágio e mestrado no laboratório 33.

À Adri, a Ana e a Charlanne, pela amizade e por toda ajuda fornecida para a realização deste trabalho, pela paciência e dedicação;

À todos que fizeram e fazem parte do Laboratório 33.

À CAPES E CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 DEMÊNCIA	6
1.1.1 Doença de Alzheimer	7
1.2 METABOLISMO DE GLICOSE E DOENÇA DE ALZHEIMER	9
1.3 COLESTEROL E DOENÇA DE ALZHEIMER	12
1.4 ASTRÓCITOS E NEURODEGENERAÇÃO	16
1.5 NEUROPROTEÇÃO	22
1.5.1 Estatinas.....	22
1.5.2 Bisfosfonatos.....	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
PARTE II	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS.....	29
4.2 INDUÇÃO DO MODELO.....	29
4.3 TRATAMENTO.....	30
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
4.5 AVALIAÇÃO COGNITIVA	31
4.5.1 Teste de reconhecimento de objeto	31
4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS.....	32
4.6.1 Obtenção do fluido cerebrospinal, amostras de soro e hipocampo.....	32
4.6.2 Captação de glicose	33
4.6.3 Conteúdo de S100B	33
4.6.4 Conteúdo de GFAP	33
4.6.5 Atividade da glutamina sintetase (GS)	34

4.6.6	Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH).....	34
4.6.7	Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	35
4.6.8	Conteúdo de BDNF	35
4.6.9	Dosagem do colesterol hipocampal	36
4.6.10	Dosagens séricas	36
4.6.11	Determinação de proteína	36
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	AVALIAÇÃO COGNITIVA	38
5.2	METABOLISMO DE GLICOSE	38
5.3	MARCADORES ASTROCITÁRIOS	39
5.4	DISFUNÇÃO ASTROGLIAL.....	40
5.6	CONTEÚDO BDNF	41
5.7	DOSAGEM DE COLESTEROL HIPOCAMPAL.....	42
5.8	DOSAGENS SÉRICAS	43
PARTE III	45
6	DISCUSSÃO	46
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	LISTA DE FIGURAS E TABELAS	79

PARTE I

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma das desordens neurodegenerativas mais comuns na idade avançada). Esta condição neurológica progressiva e irreversível é caracterizada por perda cognitiva e da função ou morte de células neuronais. A maior parte dos casos de DA (90% a 95%) é de início tardio ou esporádica (DAe). As principais características fisiopatológicas são a deposição de peptídeo β -amiloide (β A) e emaranhados neurofibrilares, porém a DAe também está relacionada a outros eventos patológicos como a neuroinflamação, o polimorfismo da apolipoproteína E (ApoE), déficit colinérgico, e estresse oxidativo. A causa da DAe ainda é desconhecida, mas tem sido associada a vários fatores de risco, como o avanço da idade, o tabagismo, e as doenças crônicas graves, como *diabetes mellitus*, hipertensão e hipercolesterolemia. Estudos epidemiológicos sugerem uma forte ligação entre altos níveis de colesterol sanguíneo e a DAe, bem como uma baixa prevalência e um menor risco para a DAe em indivíduos que fazem uso de estatinas, fármacos usados eficazmente no controle da hipercolesterolemia. Além das estatinas, o tratamento com bisfosfonatos, usados no tratamento da osteoporose, também tem sido relacionado com menor chance de desenvolver a doença. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito neuroprotetor da sinvastatina e do alendronato sobre modelo de DAe induzido por administração intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) em ratos *Wistar* adultos. A administração oral de sinvastatina e alendronato revertem o déficit cognitivo induzido pela infusão ICV-STZ, avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos; bem como alterações metabólicas cerebrais, com a diminuição da captação de glicose em fatias hipocâmpais; o aumento de marcadores de reatividade de astrócitos, analisado pelo conteúdo hipocâmpal de GFAP, a redução da capacidade redox das células hipocâmpais analisados pelo conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); e o conteúdo de colesterol de membrana no hipocampo. Portanto, a sinvastatina e alendronato demonstraram um efeito neuroprotetor em modelo animal, reforçando o potencial terapêuticos desses dois fármacos na DAe.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, Alendronato, Astrócitos, Estreptozotocina, Sinvastatina.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases in old age. This progressive and irreversible neurological condition is characterized by cognitive loss and neuronal cell function or death. Most cases of AD (90% to 95%) are late-onset or sporadic (SAD). The main pathophysiological features are β -amyloid peptide (β A) and neurofibrillary deposition, but SAD is also using other pathological events such as neuroinfection, apolipoprotein E polymorphism (ApoE), cholinergic deficit and oxidative stress. The cause of SAD is still unknown, but it has been associated with several risk factors such as advancing age, smoking and serious chronic diseases such as diabetes mellitus, hypertension, and hypercholesterolemia. Epidemiological studies suggest a strong link between high blood cholesterol and SAD, as well as a low prevalence and lower risk for SAD in individuals who use statins, drugs that are effectively used to control hypercholesterolemia. In addition to statins, bisphosphonate used to treat osteoporosis was also related to the lower chance of developing a SDA. In this sense, the objective of this study was to evaluate the possible neuroprotective effects of simvastatin and alendronate in a model of SDA in adult Wistar rats induced by streptozotocin intracerebroventricular. Oral administration of simvastatin and alendronate reversed cognitive impairment in ICV-STZ model, assessed by the object recognition test; as well as cerebral metabolic alterations, with decreased glucose uptake in hippocampal slices; increased astrocyte reactivity markers analyzed by hippocampal content of GFAP, a reduction in redox capacity of hippocampal cells analyzed by controlled glutathione content (GSH) and a production of reactive oxygen species (ROS); and the membrane cholesterol content in the hippocampus. Therefore, simvastatin and alendronate demonstrated a neuroprotective effect in the animal model, reinforcing the therapeutic potential of these two drugs in SDA.

Keywords: Alzheimer's, Alendronate, Astrocytes, Streptozotocin, Simvastatin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 24-OH** - 24-hidroxicolesterol
- 27-OH** - 27-hidroxicolesterol
- ABRAz** - Associação Brasileira de Alzheimer
- AChE** - Acetilcolinesterase
- AG** - Aminoguanidina
- AL** - Alendronato
- ApoE** - Apolipoproteína E
- APP** - Proteína Precursora Amiloide
- β A** - β -amiloide
- BDNF** - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BF** – Bisfosfonatos
- BFN** - Bisfosfonato Nitrogenado
- BHE** - Barreira Hematoencefálica
- CAT** – Catalase
- CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DA** - Doença de Alzheimer
- DAe** - Doença de Alzheimer do tipo esporádica
- DM** - Diabetes *Mellitus*
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- FPP** - Farnesil Pirofosfato
- FPPS** - Farnesil Pirofosfato Sintase
- GABA** - Ácido gama-aminobutírico
- GFAP** - Proteína Glial Fibrilar Ácida
- GDNF** - Fator Neurotrófico Derivado da Glia
- GGPP** - Geranylgeranyl Pirofosfato
- GLUT 2** - Transportador de Glicose 2
- GS** - Glutamina Sintetase
- GSH** - Glutathiona Reduzida
- HDL** - Lipoproteína de Alta Densidade
- HMG-CoA** - 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
- ICV** - Intracerebroventricular

IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
LCR - Líquido Cefalorraquidiano
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LRP - Receptores relacionados às lipoproteínas
MCD - Metil-ciclodextrina
MCP - Memória de curto prazo
MLP - Memória de longo prazo
NFT - Emaranhados Neurofibrilares
NO - Óxido Nítrico
No-BFN - Bisfosfonato não nitrogenado
OMS - Organização Mundial de Saúde
RI - Receptor de Insulina
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido dismutase
STZ- Estreptozotocina
SV- Sinvastatina
TGO - Transaminase Oxalacética
TGP - Transaminase Pirúvica
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
vLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEMÊNCIA

A população mundial vem passando por uma transição demográfica, principalmente nas últimas duas décadas, as sociedades estão deixando de serem formadas em sua maioria por populações jovens e maduras, e se tornando sociedades cada vez mais idosas. Atualmente o Brasil possui mais de 28 milhões de pessoas na faixa etária de 60 anos ou mais, o que representa 13% da população do país, com estimativas de que esse percentual irá dobrar nas próximas décadas, chegando a um quarto da população (IBGE, 2018).

O envelhecimento é um processo biológico natural complexo e que envolve a redução progressiva de várias funções morfológicas e bioquímicas. Este processo tem impacto significativo na saúde humana, aumentando a suscetibilidade a diversas doenças, tais como o câncer, distúrbios cardiovasculares, distúrbios metabólicos, como diabetes, e as doenças neurodegenerativas (PAL E TYLER, 2016).

As doenças neurodegenerativas são patologias caracterizadas pela morte irreversível de neurônios, que leva a perda progressiva e incapacitante de determinadas funções do sistema nervoso central (SNC). Algumas dessas doenças são consideradas hoje as maiores causas de demência no mundo (MCMACKIN et al, 2019).

Demência é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma síndrome em que ocorre uma deterioração da função cognitiva além do esperado para indivíduos que estão no processo de envelhecimento, afetando a memória, orientação espacial, compreensão, cálculos, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento. Sendo esta, uma das maiores causas de incapacidade e dependência de pessoas idosas. A OMS estima que as demências atinjam, na atualidade, 47,5 milhões de pessoas, sendo descobertos 7,7 milhões de novos casos a cada ano (“OMS | Demência”, [s.d.]).

Existem vários tipos de demência, estas podem ser primárias, isto é, não é decorrente de nenhuma outra doença; ou secundárias, que ocorre em consequência de determinadas patologias, como a infecção pelo vírus HIV, traumatismo craniano e a Doença de Parkinson (LEVY E CHELUNE, 2007). Dentre os tipos mais incidentes

de demência primária, estão a doença de Alzheimer (DA), a demência vascular e a demência frontotemporal (SHAGAM, 2009). A forma mais prevalente de demência é a DA (NIH, 2011). De acordo com a OMS, a DA é responsável por cerca de 70% dos casos de demência no mundo, cuja prevalência global é estimada em 35,6 milhões de pessoas com mais de 65 anos, podendo chegar a 115,4 milhões até 2050 (OMS, 2019). No Brasil a doença acomete cerca de 1,2 milhões de indivíduos (ABRAZ, 2019).

À medida que ocorre o aumento da expectativa de vida da população, é natural que aumente a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento. Há previsões de um elevado crescimento nos casos de demência entre a população acima dos 60 anos no mundo todo, principalmente a DA. Portanto, a DA já é considerada um grave problema de saúde pública e um enorme custo governamental e a busca por estratégias neuroprotetoras e preventivas tornam-se extremamente relevante e emergencial (OLIVEIRA, 2019).

1.1.1 Doença de Alzheimer

A DA é a principal doença neurodegenerativa relacionada à idade, esta é definida como uma doença progressiva e irreversível, e clinicamente caracterizada por severo prejuízo de memória e cognição, perda de habilidades sociais e das habilidades de linguagem, alterações comportamentais e emocionais (ARMSTRONG, 2013; MUNOZ E FELDMON, 2000). Classifica-se a DA em dois tipos: hereditária (tipo I), que está relacionada exclusivamente a fatores genéticos, como os genes da proteína precursora amiloide (APP) e das presenilinas, e representa 1-2% dos casos, onde os indivíduos são acometidos a partir dos 40 anos de idade; e o tipo esporádica (tipo II – DAe), a qual todos os indivíduos estão sujeitos à medida que envelhecem, sendo essa última a mais prevalente (90-95% dos casos), apresentando sintomas após os 65 anos (CASSERLY E TOPOL, 2004; NAIDU et al., 2002).

As principais características histopatológicas da DA são a formação das placas neuríticas extracelulares (placas senis) compostas por depósitos insolúveis do peptídeo β -amiloide (β A), um fragmento com capacidade de agregação da proteína precursora amiloide (APP) (SCHACHTER E DAVIS, 2000); e emaranhados neurofibrilares (NFT) intracelulares, decorrentes da hiperfosforilação, poliubiquitinação e dobramento anormal da proteína tau, uma proteína envolvida na

formação e estabilização de microtúbulos nas células (GLENNER E WONG, 1984; GRUNDKE-IQBAL et al., 1986).

Acompanhando estas características histológicas, ocorrem vários eventos que levam à disfunção neuronal, sobretudo de neurônios colinérgicos, nas áreas límbicas do lobo temporal, envolvidas na cognição e memória, como no hipocampo e no córtex pré-frontal, juntamente com suas regiões associadas. Cria-se deste modo um quadro de desequilíbrio neuroquímico onde há sinais de neurodegeneração, neuroinflamação, estresse oxidativo, déficit colinérgico, alterações no metabolismo de glutamato, aumento de sinalização pró-apoptótica, alterações na homeostase do cálcio e disfunção mitocondrial, causando prejuízo na transmissão sináptica e alterando o equilíbrio de diversos neurotransmissores (CANDORE, et al., 2010; SELKOE, 2002; MATTSON E CHAN, 2003b; WANG et al., 2009).

Há diversas hipóteses sobre o desenvolvimento da DAe, tais como a oligomérica, metálica, do estresse oxidativo, vascular, do diabetes, da excitotoxicidade glutamatérgica, do colesterol, porém as três principais são a do β A (HARDY e HIGGINS, 1992), a hipótese da hiperfosforilação da proteína tau (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986; PATRICK et al., 1999) e a hipótese colinérgica (ZAMMER et al., 2019).

Além das evidências histopatológicas e das hipóteses formuladas sabe-se que a DAe é uma doença neurodegenerativa relacionada ao envelhecimento metabólico (CUNNANE et al., 2011; JACK et al., 2010; REIMAN et al., 1996; SMALL et al., 1995). Estudos mostraram que prejuízo no metabolismo encefálico de glicose, bem como na sua utilização, contribuem para as alterações na DAe, ainda que não esteja clara a relação da redução do metabolismo de glicose na causa ou consequência da patogênese da DA (BUTTERFIELD, HALLIWELL, 2019; CALSOLARO, EDISON, 2016; DURAN-ANIOTZ, HETZ, 2016).

A susceptibilidade à DAe tem sido associada a uma complexa sequência de fatores etiológicos (BARONE et al., 2014). Os fatores de risco relacionados à DAe compreendem: baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão, diabetes *mellitus* (DM), hipertensão arterial, fumo, hiperinsulinemia, inatividade física, fibrilação atrial, infecções e a hipercolesterolemia (COTMAN E BERCHTOLD, 2002; GORELICK, 2004; LUCHSINGER E MAYEUX, 2004; MATTSON, 2003^a; RITCHIE E LOVESTONE, 2002). No entanto, a etiologia da doença ainda não é conhecida, principalmente as

vias moleculares pelas quais as alterações patológicas originam prejuízos aos domínios cognitivos associados ao aprendizado e à memória.

1.2 METABOLISMO DE GLICOSE E DOENÇA DE ALZHEIMER

Em repouso, o cérebro, coração, fígado e os rins de uma pessoa adulta consomem aproximadamente 60% da energia ingerida. Sendo o cérebro dentre estes, o órgão que apresenta uma maior necessidade energética, consumindo em torno de 25% da energia total do corpo (CUNNANE et al., 2011). Para a geração de energia pode ser utilizados como substratos cetonas, glicogênio, aminoácidos, porém a principal fonte de energia cerebral é a glicose (CAL SOLARO, EDISON, 2016).

Estudos realizados in vitro e in vivo têm demonstrado que a maior parte da glicose consumida pelo cérebro é usada para manutenção dos gradientes iônicos pré e pós-sinápticos, os quais são responsáveis pelas neurotransmissões excitatórias e manutenção do potencial de repouso dos neurônios (ATTWELL, IADECOLA, 2002; SHULMAN et al., 2004).

A regulação do metabolismo de glicose cerebral envolve dois processos: transporte através da BHE e catabolismo intracelular (CAL SOLARO, EDISON, 2016). O transporte da glicose através da BHE ocorre por meio de transportadores de glicose (GLUT) (SHAH et al., 2012). Os GLUTs são responsáveis pela captação de glicose do sistema vascular para o cérebro por um processo de três etapas: transporte através do endotélio componente da BHE pela isoforma GLUT1, transporte para o astrócitos por uma segunda isoforma do GLUT1 e transferência para os neurônios pelo GLUT3 (CUNNANE et al., 2011). A captação da glicose pelo cérebro depende da expressão e atividade dos GLUTs, porém, o mais importante para a regulação dessa captação é a concentração de glicose nos dois lados da BHE (DUELLI E KUSCHINSKY, 2001). O catabolismo intracelular depende da glicólise e via das pentoses fosfato no citoplasma, e do ciclo intracelular de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial (CAL SOLARO, EDISON, 2016).

O metabolismo de glicose cerebral tem sido encontrado diminuído em pacientes com DA (CUNNANE et al., 2011). A redução do metabolismo de glicose nos estágios iniciais da DA ocorre no hipocampo e córtex cingulado posterior, espalhando-se para o córtex temporal e parietal com a progressão da doença com maior extensão

nos córtex frontal e occipital. Juntamente com a diminuição do metabolismo de glicose nesta regiões, é encontrado alterações na densidade e funções sinápticas, sugerindo uma relação direta entre as regiões afetada e o comprometimento cognitivo (CAL SOLARO, EDISON, 2016).

O metabolismo de glicose cerebral é influenciado por insulina, um hormônio produzido pelas células β pancreáticas que é capaz de atravessar a BHE, mas também é sintetizada no tecido cerebral (SESTI, 2006; WOODS et al., 2003). O sistema de transdução de sinal da insulina exerce papel importante na manutenção dos níveis e na regulação do metabolismo neuronal de glicose na geração de energia, e na manutenção dos processos de aprendizagem e memória (GEROZISSIS, 2003; HOYER, 2004; PARK, 2001; SCHULINGKAMP et al., 2000).

A insulina ao se ligar ao seu receptor (IR – do inglês *insulin receptor*) desencadeia a fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1 – do inglês *insulin receptor substrate-1*) resultando na ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e nas respostas celulares a jusante facilitando o crescimento neural, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (BEDSE et al., 2015). Estudos têm demonstrado que alterações no metabolismo de insulina e na sinalização dos seus receptores afetam o metabolismo do peptídeo β A e da proteína tau, favorecendo a formação das placas senis e emaranhados neurofibrilares respectivamente, que são marcadores neuropatológicos da DA (RIVERA et al., 2005) (Figura 1).

Portanto, sugere-se que alterações no metabolismo cerebral de insulina podem ser um fator patológico para doenças neurodegenerativas, como a DA (DE LA MONTE E WANDS, 2008; STEEN et al., 2005). Assim como, a correção dos níveis de insulina levam a uma melhora das funções cognitivas (CRAFT et al, 2000).

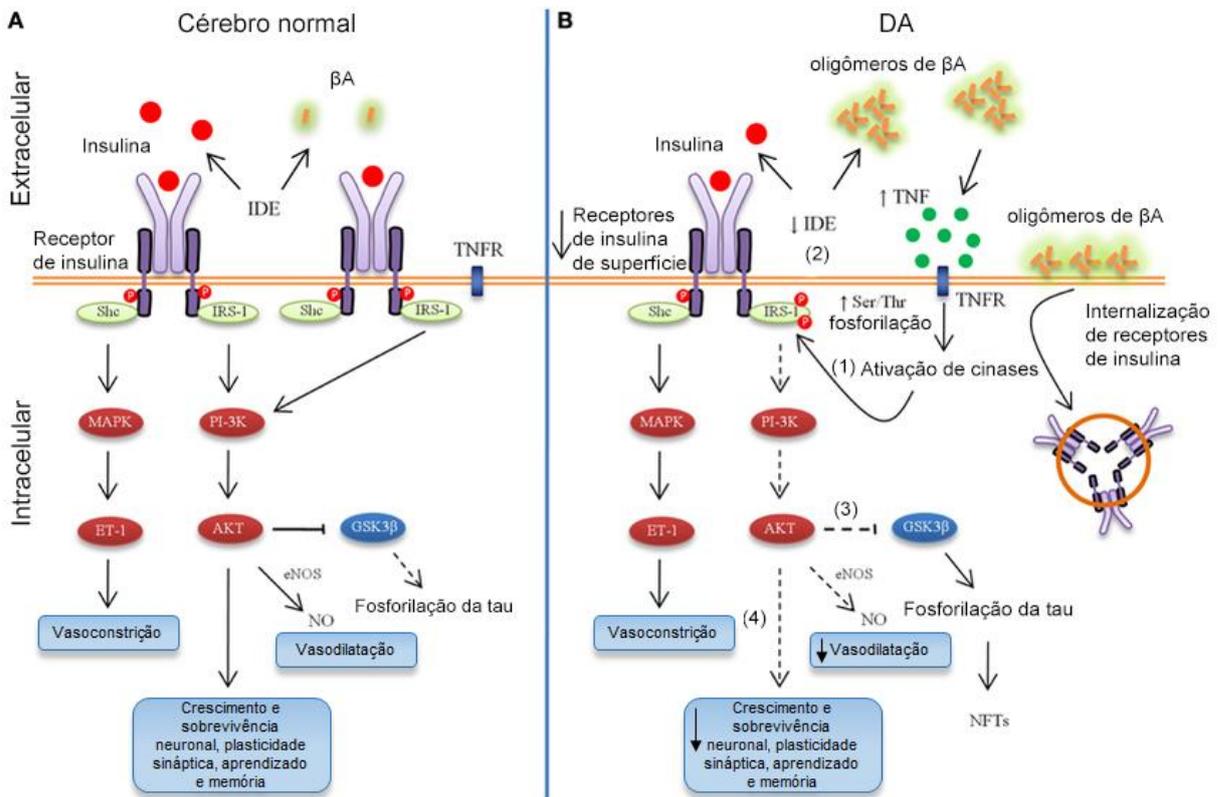


Figura 1. Sinalização de insulina cerebral. Sinalização de insulina no cérebro normal (A) e no cérebro com doença de Alzheimer (DA) (B). Em condições fisiológicas, a insulina ao se ligar em seu receptor (IR) desencadeia a fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), resultando na ativação da fosfatidilinositol 3-cinases (PI3K) e nas respostas celulares a jusantes que facilitam o crescimento e sobrevivência neural, plasticidade sináptica e aprendizado e memória. A resistência à insulina reduz a expressão da enzima degradadora de insulina (IDE), proporcionando diminuição na degradação de peptídeo β -amiloide (β A), e o seu acúmulo leva ao aumento dos níveis de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ativação de cinases de estresse (1). A resistência à insulina reduz a expressão da enzima degradadora de insulina (IDE) o qual também realiza a degradação de β A (2). A sinalização da insulina reduzida aumenta a atividade da glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β), aumentando a fosforilação anormal da tau (3). A sinalização deficiente de insulina leva ao comprometimento do crescimento nervoso, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (4) (Adaptado BEDSE et al., 2015).

Neste contexto, um modelo animal não-genético induzido por administração intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente utilizado para estudar as alterações neuroquímicas e comportamentais prevalentes em indivíduos da DA, uma vez que a STZ-ICV na concentração de 1-3 mg/kg causa uma espécie de dessensibilização dos receptores de insulina (IR – do inglês *insulin receptor*) resultando em alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes às encontradas na DA (DE LA MONTE et al., 2009; HOYER et al., 2000). Tais alterações são resistência à insulina no cérebro, diminuição do metabolismo de glicose, danos colinérgicos, estresse oxidativo, gliose, taupatia e acúmulo do β A, resultando em redução na aprendizagem e provocando déficits de memória (SALKOVIC-PETRISIC

E HOYER, 2007; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2009; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013).

Além das alterações no metabolismo de glicose, estudos têm demonstrado que modificações na homeostase do colesterol também estão associados a um maior risco de desenvolvimento da DAe (GAMBA et al., 2019; SATO, MORISHITA, 2015).

1.3 COLESTEROL E DOENÇA DE ALZHEIMER

O colesterol é uma molécula orgânica membro da família de compostos policíclicos conhecidos como esteróis. Esta molécula é um componente essencial da membrana plasmática de todas as células, determinando propriedades biofísicas das mesmas, devido à diminuição na permeabilidade e regulação da fluidez, e também é precursor biossintético de ácidos biliares, vitamina D, e de hormônios esteroides (por exemplo, progesterona e aldosterona) (MAXFIELD, van MEER, 2010; STEFANI e LIGURI, 2009). Além disso, o colesterol também define propriedades funcionais de proteínas de membranas, como canais iônicos e receptores, devido às interações colesterol-proteínas (BASTIAANSE, 1997; BURGER et al., 2000; YEAGLE, 1985). Desta forma, o suprimento contínuo de colesterol para as células dos principais tecidos do corpo é de extrema importância.

O colesterol pode ser obtido por meio da alimentação ou sintetizado pelo próprio organismo, principalmente no intestino e fígado. Grande parte do colesterol usado pelo corpo humano é endógeno e sintetizado a partir da via do mevalonato (ZIPP et al., 2007). A via do mevalonato, também é chamada de via dos isoprenóides, pois além de sintetizar colesterol, também gera produtos intermediários como os isoprenóides (precursores de moléculas envolvidas na sinalização e resposta inflamatória) e ubiquinona (coenzima Q10, um componente da cadeia transportadora de elétrons envolvida na geração de energia na forma de ATP) (CANEVARI E CLARK, 2007). A via se inicia com a formação do HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA) que será reduzido a mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase (enzima limitante da via), e este através de uma série de reações de ciclização e isomerização será convertido em colesterol (ZIPP et al., 2007).

As moléculas de colesterol são parcialmente insolúveis em meio aquoso, portanto não podem ser transportadas diretamente pela corrente sanguínea ou pela

linfa. A circulação do colesterol em diferentes fluidos do corpo ocorre através de vesículas produzidas pelos hepatócitos e astrócitos denominadas de lipoproteínas, que são complexos vesiculares compostos por um núcleo hidrofóbico que contém triglicerídeos e colesterol esterificados, envolvido por fosfolipídios, colesterol livre e proteínas (apolipoproteínas) (MAXFIELD, VAN MEER, 2010).

As apolipoproteínas (Apo) são classificadas como: Apo A (ApoA-I, ApoA-II e ApoA-IV), Apo B (ApoB-100 e ApoB-48), Apo C (ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III) e ApoE, e variam no tamanho e na composição química (NOVAK; BYDLOWSKI, 1996). Essas podem ser transferidas entre diferentes classes de lipoproteínas e são responsáveis pela regulação da atividade de enzimas responsáveis pelas características dessas lipoproteínas (tamanho, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteínas), bem como, a captura das lipoproteínas através da ligação a receptores de membrana (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

As lipoproteínas diferem-se pela proporção de triacilgliceróis, colesterol esterificado e proteínas, e podem ser classificadas como quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL - do inglês *very low density lipoprotein*) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL - do inglês *low density lipoprotein*) que transportam os triacilgliceróis e colesterol do fígado aos outros tecidos, como por exemplo, o tecido muscular e o tecido adiposo; e as lipoproteínas de alta densidade (HDL - do inglês *high density lipoprotein*), que por meio da interação com as outras lipoproteínas, coletam colesterol dos tecidos e o traz de volta ao fígado para excreção na bile em um processo conhecido como transporte reverso de colesterol (LEDESMA E DOTTI, 2012).

As lipoproteínas carreadoras de colesterol não são capazes de transpassar a barreira hematoencefálica (BHE), portanto não é possível a captação de colesterol da circulação para o cérebro, ou seja, o cérebro sintetiza essencialmente todo o colesterol necessário ao mesmo, não dependendo do colesterol periférico (DIETSCHY E TURLEY, 2001). Apesar do SNC corresponder a apenas 2% de toda a massa corporal, este contém aproximadamente 25% de todo o colesterol livre do corpo (BJÖRKHEM et al., 1998).

O colesterol no SNC é um importante componente da mielina, e das membranas de células gliais e de neurônios (PFRIEGER, 2003b). Em membranas celulares, o colesterol está concentrado em microdomínios de membrana resistentes

à solubilização com detergentes, denominados balsas lípidicas, do inglês “*lipid rafts*” (Figura 2). Estes “*lipid rafts*” determinam propriedades funcionais de fatores neurotróficos, canais iônicos e receptores de neurotransmissores, bem como as suas localizações em sítios específicos nas membranas, criando assim uma plataforma para iniciação, propagação e manutenção de eventos de transdução de sinal (PARATCHA E IBANEZ, 2002).

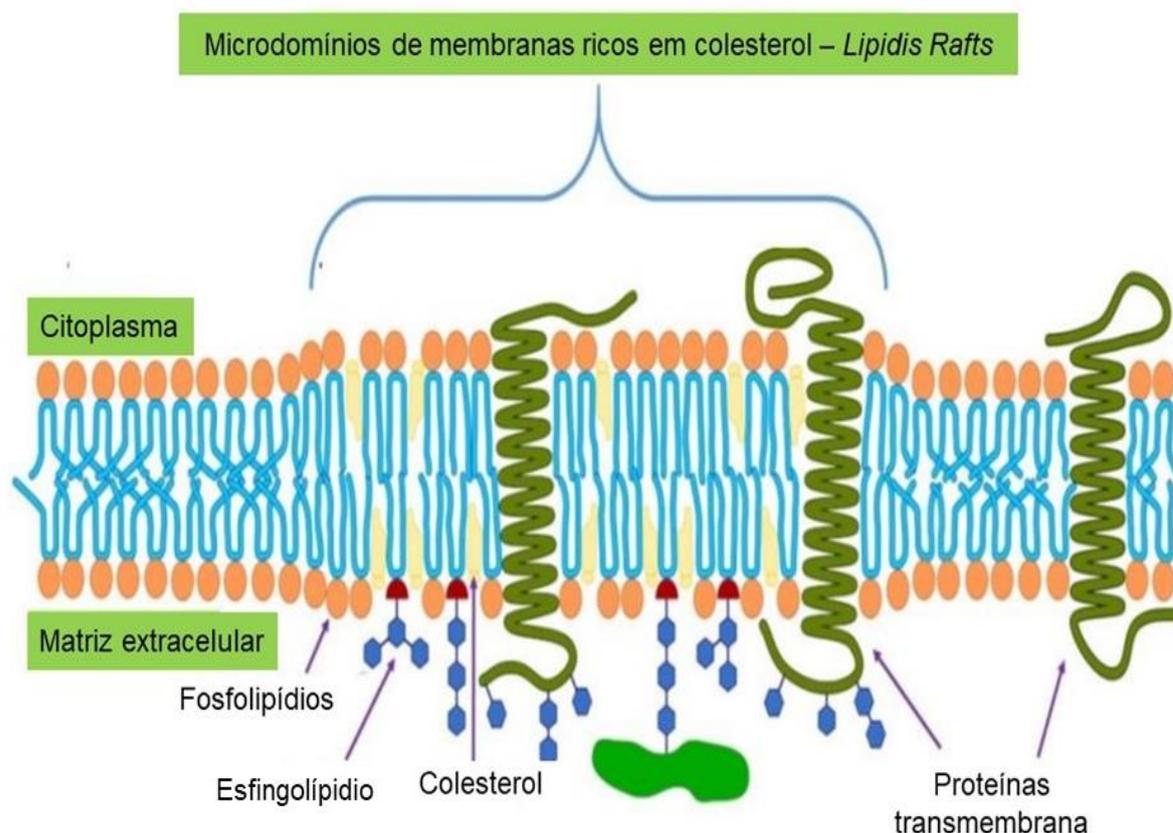


Figura 2. Microdomínios de membrana plasmática - "Lipids Rafts". Microdomínios de membranas são constituídos principalmente de colesterol e esfingolípídios (Adaptado de WAHEED, FREED, 2010).

O colesterol também apresenta um papel importante no crescimento neurítico, na sinaptogênese, na manutenção da integridade das sinapses e na liberação de neurotransmissores. A membrana vesicular sináptica contém altas concentrações de colesterol, quando comparada com outras organelas (THIELE et al., 2000; PFRIEGER, 2003a). Além disso, o envolvimento do colesterol na interação colesterol-proteínas nas membranas e em microdomínios favorece a curvatura da vesícula e a seguinte liberação do conteúdo na fenda sináptica (HUTTNER E ZIMMERBERG, 2001). Estes dados em conjunto sugerem que é necessária grande quantidade de

colesterol para a síntese, transporte e liberação do conteúdo de vesículas pré-sinápticas.

Nos microdomínios também estão localizados canais proteicos permeáveis a água como aquaporinas, e proteínas de junção oclusiva, como a ocludina, que são componentes fundamentais para manutenção da BHE (NUSRAT et al., 2000). Conseqüentemente, alterações na homeostase de colesterol podem levar a um colapso nos microdomínios e culminar em perturbação da BHE, alterando sua permeabilidade (MORGAN et al., 2014; TAKECHI, et al., 2013). Podemos observar que a manutenção da integridade da BHE, bem como a plasticidade sináptica são sensíveis as alterações na concentração de colesterol cerebral, portanto uma perturbação da BHE decorrente de alterações na homeostase de colesterol, poderia resultar em um comprometimento da função sináptica, o que poderia levar a danos cognitivos (DO et al., 2014; ZLOKOVIC, 2005).

Ao longo das últimas duas décadas vem se acumulando evidências que apontam para uma associação dos altos níveis de colesterol no sangue e a DAe (KUO et al., 1998; SOLOMON et al., 2007; SPARKS et al., 1990; SPARKS et al., 1994). A primeira associação do colesterol com o desenvolvimento da DAe foi descrito por Larry Sparks e colaboradores em 1990, ao observarem que cerca de 70% dos indivíduos que faleceram em decorrência de doença arterial coronariana também apresentavam placas amiloides em seus cérebros, uma das características patológica que definem a DA, contudo, indivíduos de mesma idade e que haviam falecido de outras causas eram bem menos susceptíveis a desenvolverem placas amiloides cerebrais (SPARKS et al., 1990).

Posteriormente, os autores mostraram que coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol, por pelo menos, quatro semanas desenvolviam placas amiloides cerebrais e outros sinais patológicos relacionados à DA, esses dados juntamente com o estudo anterior (SPARKS et al., 1994), levaram Sparks a sugerir uma relação entre os altos níveis de colesterol plasmático, fator de risco vascular, e a predisposição ao desenvolvimento de DA. Outros estudos também observaram o acúmulo de colesterol associado a placas neuríticas no cérebro de paciente com DA e em modelos de animais transgênicos da doença (MORI et al., 2001).

A ligação entre o colesterol e a DAe ganhou um novo impulso em decorrência de um novo estudo de ligação genética realizado por Allen Rose e colaboradores em

1993 (ROSES, 2006). Identificou-se neste estudo uma variante particular de um gene que codifica para a apolipoproteína E (ApoE) como um fator de risco para DAe.

Existem em humanos três alelos principais do gene ApoE, decorrentes de duas modificações no DNA, definidos como $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. No SNC, as ApoE são as principais apolipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol, apresentando um importante papel na mobilização e redistribuição do mesmo, e de outros lipídeos cerebrais, assim como, na reparação, crescimento e manutenção das células nervosas (KIVIPELTO et al., 2002).

Depois do fígado, o cérebro é o maior produtor de ApoE (SINGH, P.P., SINGH, M., MASTANA, 2002). De forma interessante, estudos mostraram que indivíduos que possuem o alelo 4 da ApoE (ApoE-4) apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento da DAe (CHEN, H. K. et al., 2011; CORDER et al., 1993; EVANS et al., 2000). O alelo ApoE-4 pode atuar por conferir altos níveis de colesterol, facilitando a secreção de proteína amiloide $\beta A-42$ a partir da APP, aumentando a formação de placas senis (MANN et al., 2004).

Foi demonstrado num estudo em modelo animal de submissão a longo prazo a uma dieta rica em colesterol um aumento da expressão da ApoE decorrente da ativação astrocítica (astroglíose) na região do hipocampo (CHEN et al., 2016). A astroglíose foi demonstrada em estudos realizados em modelo animal de STZ-ICV e em paciente com DA (SANTOS et al., 2018, OSBORN et al., 2016).

1.4 ASTRÓCITOS E NEURODEGENERAÇÃO

Em 1858, observou-se pela primeira vez a existência de uma substância intersticial no SNC pelo patologista Rudolf Virchow, que ele denominou neuroglia (GOMES, TORTELLI, DINIZ, 2003). Atualmente a neuroglia são divididas em dois grupos principais: a microglia, composta por células fagocíticas envolvidas nas respostas inflamatórias; e a macroglia, composta por oligodendrócitos, células que sintetizam mielina e auxiliam na formação da bainha de mielina presente no axônio de neurônios, as células ependimais, que revestem os ventrículos cerebrais e os astrócitos (Figura 3) (PEREA E ARAQUE, 2010).

Por muito tempo as células gliais eram reconhecidas pelo seu papel de suporte no SNC, enquanto os neurônios eram considerados os elementos responsáveis pelo

processamento da informação. No entanto, nas últimas décadas estudos têm demonstrado que as células da glia são componentes ativos em funções cerebrais essenciais e não apenas atuam como elementos de suporte neuronal (PEREA E ARAQUE, 2005; VAN ELDIK E WAINWRIGHT, 2003).

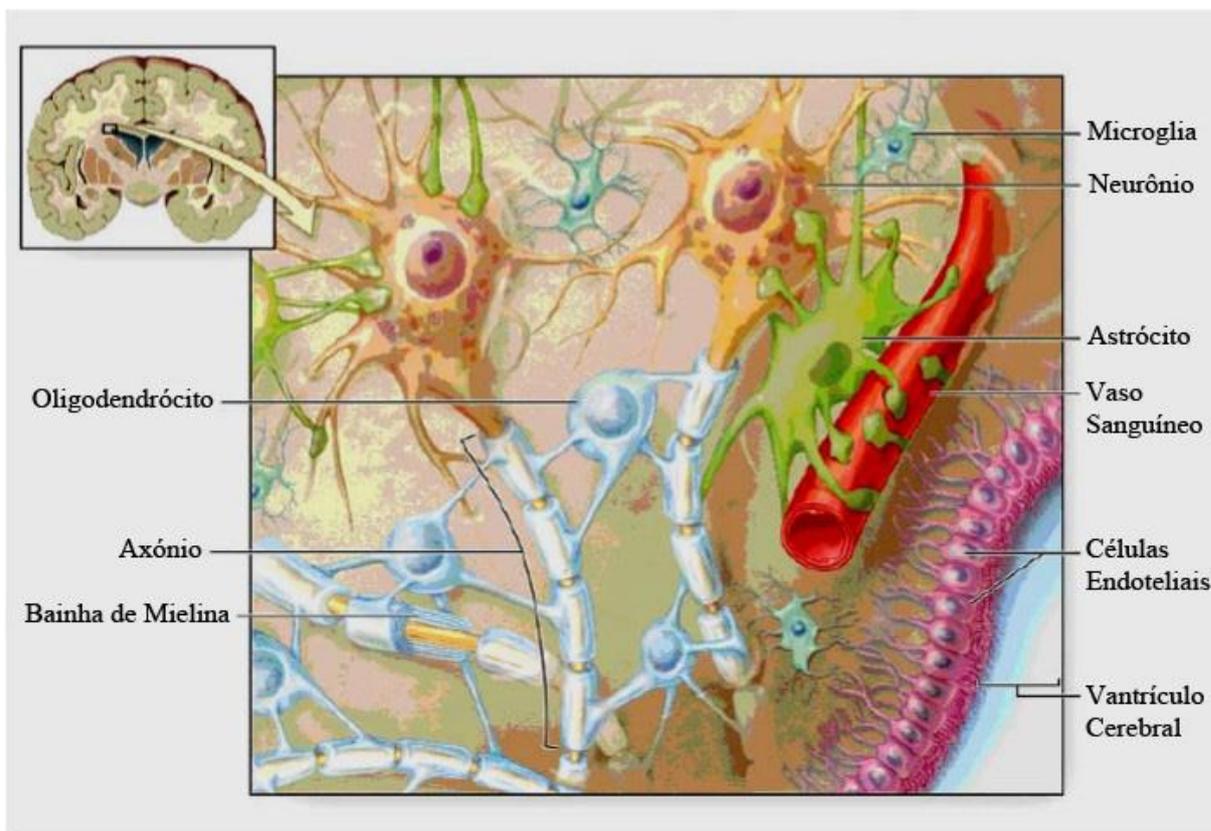


Figura 3. Principais grupos celulares do sistema nervoso central (SNC). As principais células do SNC são os neurônios, as células da microglia, os oligodendrócitos, as células ependimárias e as mais numerosas células do SNC, os astrócitos. Adaptado de www.indiana.edu

A microglia e os astrócitos atuam no processo neuroinflamatório, estas são consideradas células do sistema imune inato do cérebro (TANSEY et al., 2007). A neuroinflamação é uma complexa resposta celular e molecular a diversos tipos de danos causados por patógenos, liberação de *debris* celulares ou proteínas intracelulares devido à exposição a um ambiente nocivo, como hipóxia, baixo suporte energético, neurotoxicidade, estresse oxidativo, entre outros. O objetivo principal da neuroinflamação é auxiliar na prevenção da lesão e na recuperação do tecido danificado (GLASS et al., 2010). No entanto, a resposta inflamatória crônica tem sido cada vez mais associada com desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (ELLWARDT & ZIPP, 2014; FRIEDMAN &

DINGLELINE, 2011; GLASS et al., 2010). A presença de emaranhados neurofibrilares e placas β A na DA são responsáveis pelo aumento de células envolvidas na neuroinflamação, microglia e astrócitos, bem como dos níveis de mediadores anti e pró-inflamatórios em paciente com DA (LEE et al., 2010).

No SNC, os astrócitos são as células gliais mais abundantes, correspondendo a 50% da massa cerebral, e estas tem recebido uma atenção especial, devido à próxima relação com os neurônios e sinapses (PEREA E ARAQUE, 2010). Estas células se comunicam por junções comunicantes (do inglês - *gap*), formando um grande sincício e seus prolongamentos atingem as sinapses neuronais, interagindo com os neurônios e participando da regulação e organização da transmissão sináptica, ou seja, a sinapse não é um evento que inclui apenas os neurônios, atualmente a sinapse é caracterizada por ser tripartite (PEREA; ARAQUE, 2010).

As células astrocíticas possuem um alto grau de plasticidade, cabendo-lhe diversas funções, como por exemplo: direcionar e participar das funções das sinapses durante o desenvolvimento; ser a principal fonte de proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão no SNC; participar da BHE, mediando o transporte de substâncias entre o sangue e o encéfalo; tamponar os níveis de íons, como K^+ e Na^+ e, também, de lactato, preservando a atividade neuronal; possui papel crítico na captação e metabolismo de neurotransmissores, como glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA); participar na resposta imune cerebral; realizar síntese e liberação de glutatona; produzir fatores tróficos, como GDNF (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e estocar glicogênio como fonte de reserva energética (JESSEN, 2004; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2015).

Os astrócitos também respondem rapidamente a um processo de injúria cerebral, em decorrência de moléculas sinalizadoras de lesão, e esta resposta é conhecida como astrogliose. A astrogliose tem sido relacionada com a neurodegeneração (ENG et al., 1992; HOL & PEKNY, 2015; MARAGAKIS, ROTHSTEIN, 2006), pois os astrócitos reativos podem continuar a se proliferar, a liberar citocinas e fatores tróficos, bem como se deslocar para o local inicial da lesão tecidual, formando a cicatriz glial, causando por tanto a uma resposta inflamatória e remodelação tecidual (BUFFO et al., 2010; SOFRONIEW, 2009). Algumas proteínas específicas podem ser usadas como marcadores de astrogliose, especialmente a

proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína ligante de cálcio, a S100B. Podemos também avaliar a função astrocitária pela análise da atividade da glutamina sintetase (GS), bem como os níveis de glutatona reduzida (GSH).

A GFAP (do inglês *glial fibrilar acidic protein*) é o principal filamento intermediário de astrócitos maduros do SNC, esta é considerada um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocítico. A reativação glial, em resposta à injúria, envolve mudanças em seu conteúdo, e o aumento da sua expressão, pode ser interpretado como sinal de astrogliose, o que também é encontrado em pacientes com DA (MRAK E GRIFFIN, 2005; PEKNY; PEKNA, 2014).

A S100B é uma proteína solúvel pertencente à família de proteínas ligantes de cálcio, expressa e secretada principalmente por astrócitos (ROTHERMUNDT et al., 2003), mas sua expressão também já foi identificada em oligodendrócitos em maturação e algumas populações de neurônios (DONATO et al., 2009). A S100B intracelular regula o metabolismo induzindo a diferenciação, mitose e plasticidade do citoesqueleto, e ao ser secretada para o meio extracelular desempenha efeitos parácrinos sobre neurônios e micróglia, e autócrinos sobre os astrócitos (DONATO, 2003). Dentre estas ações, estão a regulação da proliferação, diferenciação e morfologia celular, homeostase do Ca^{2+} , fosforilação e transcrição de proteínas, atividade enzimática e metabolismo (DONATO, et al., 2009; GONÇALVES et al., 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína S100B em níveis micromolares à nanomolares atua como um fator neurotrófico, promovendo o crescimento de neuritos, modulação sináptica e sobrevivência neuronal (VAN ELDIK E WAINWRIGHT, 2003), mas em concentrações mais elevadas, micromolar a molar, esta pode ter efeitos tóxicos levando a ativação da sinalização de injúrias tecidual, resposta inflamatória e apoptose (DONATO, et al., 2009; GONÇALVES et al., 2008). Sua secreção elevada sinaliza dano tecidual e reatividade astrocítica em condições onde ocorre um processo inflamatório (DE SOUZA et al., 2009; GUERRA et al., 2011). O aumento da S100B é frequentemente encontrado em tecido cerebral de pacientes com DA, principalmente associados às placas amiloides, sugerindo que esta proteína pode ser um fator importante na gênese e evolução dessas placas (MRAK E GRIFFIN, 2001; VAN ELDIK E GRIFFIN, 1994).

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima específica de astrócitos e está envolvida no metabolismo glutamatérgico. O glutamato é captado pelos astrócitos e através da ação da enzima GS, é convertido em glutamina, esta então é liberada para o meio extracelular, sendo captada pelos neurônios, onde irá regenerar o glutamato (DALBOLT, 2001). Este mecanismo é de extrema importância para o *turnover* do neurotransmissor no SNC, portanto, a manutenção dos níveis extracelulares de glutamato realizada pelos astrócitos, através da captação do glutamato, é um mecanismo vital para a prevenção da excitotoxicidade (VERKHRATSKY, 2010). Desse modo, uma diminuição do conteúdo e atividade da GS está associada com a excitotoxicidade glutamatérgica e morte neuronal (EID et al., 2004), e esta redução tem sido encontrada em pacientes com DA (BUTTERFIELD, 2002) e em modelo de injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) (DOS SANTOS et al., 2018; TRAMONTINA et al., 2011).

Através da síntese e secreção da glutatona (GSH), os astrócitos também provêm um importante sistema antioxidante ao SNC (DRINGE, 2000). A glutatona é um tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina) que atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos (POPE; MILTON; HEALES, 2008), e é essencial para a remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo sofrer ação enzimática ou não enzimática na conversão do peróxido de hidrogênio em água. Portanto, o comprometimento desse sistema pode influenciar na sobrevivência de neurônios em certas condições patológicas que envolvem danos oxidativos. Há estudos que mostram que ocorre uma diminuição do conteúdo de GSH com o envelhecimento (CUDKOWICZ et al., 1999). Na DA é encontrada uma redução do conteúdo de GSH e de seus precursores (CALABRESE et al., 2006).

Os astrócitos também são conhecidos por estocarem glicogênio, e fornecerem glicose para os neurônios na forma de lactato; estudos demonstraram que em pacientes com DA em estágio inicial, há uma diminuição da captação glial de glicose (FREEMANTLE et al., 2006). Além de atuar no metabolismo de glicose, os astrócitos também atuam na síntese de colesterol, internalização e reciclagem do colesterol liberado de terminais nervosos em degeneração, devolvendo-o aos neurônios (PFRIEGER, 2003b; STEFANI E LIGURI, 2009).

A síntese de colesterol pelos astrócitos é modulada principalmente pela ativação dos receptores X do fígado (do inglês *Liver X receptor* - LXR), os quais são

ativados por moléculas oxidadas de colesterol, os oxiestéroides, como o 24-hidroxicolesterol (24-OH) e o 27 hidroxicolesterol (27-OH). A formação do 24-OH a partir do colesterol ocorre principalmente pelas células neuronais e a após sua produção, esta pode agir diretamente na síntese de componentes proteicos cruciais ao colesterol nos astrócitos, ou transpassar a BHE, e ser metabolizado no fígado (RUSSEL et al., 2009). O 27-OH também pode ser produzido no encéfalo, porém a sua produção ocorre principalmente nos tecidos periféricos em decorrência do aumento dos níveis de colesterol plasmático, e assim como o 24-OH também atravessa a BHE para o SNC, sendo este um dos possíveis mecanismo pelos quais os níveis de colesterol periféricos podem modular o colesterol do SNC (Figura 4) (HEVERIN et al., 2015; ZHANG, M. et al., 2016).

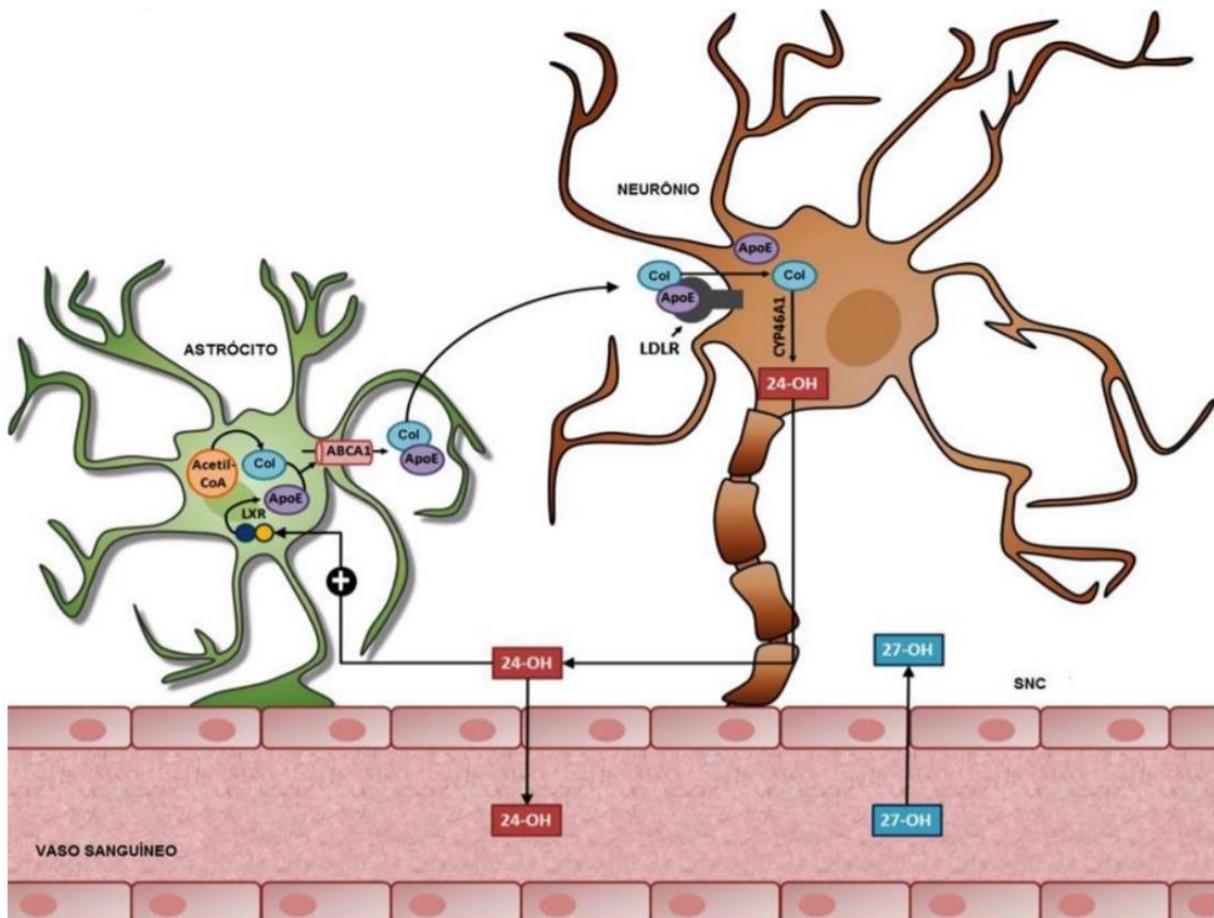


Figura 4. Metabolismo do colesterol no sistema nervoso central (SNC). Os astrócitos sintetizam colesterol e este é transportado para os neurônios através do seu acoplamento a apolipoproteína E (ApoE), processo este controlado por membros da família dos transportadores do cassete de ligação a molécula de adenosina trifosfato (ATP - ABCA1 e ABCG1). O complexo colesterol-ApoE é capturado por neurônios por meio de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). O excesso de colesterol cerebral é eliminado do SNC, na forma de oxiestéroides, como o 24-hidroxicolesterol (24-OH), que ao contrário do colesterol é capaz de transpassar a barreira hematoencefálica (BHE) (MOREIRA, 2015).

1.5 NEUROPROTEÇÃO

Doença de Alzheimer é conhecida por afetar milhões de pessoas em todo o mundo, com projeções de que o número de pessoas afetadas sejam ainda maiores chegando a 115,4 milhões até 2050, e até o momento não existe uma cura nem um tratamento específico. Atualmente os tratamentos utilizados em pacientes com DA são meramente paliativos e não impedem a progressão da mesma (FOLCH et al. 2016).

Portanto, várias estratégias terapêuticas têm sido estudadas para amenizar os danos causados pela doença e para neuroproteção. Algumas dessas substâncias são: aminoguanidina (AG) (RODRIGUES, et al., 2009), a n-acetil-cisteína (NAC) (SULTANA, et al., 2011), as estatinas (TRAMONTINA, A. C. et al., 2011) e os bisfosfonatos (ZAMMER, et al., 2019). Neste trabalho foi dado enfoque em dois desses fármacos, a sinvastatina (estatina) e o alendronato (bisfosfonato).

1.5.1 Estatinas

Estatinas são fármacos inibidores competitivos específicos e reversíveis da enzima HMG-CoA redutase, principal enzima da síntese de colesterol pela via do mevalonato. Esses fármacos atuam promovendo a redução do colesterol plasmático por meio do bloqueio da enzima HMG-CoA redutase, bem como pelo aumento da proporção HDL:LDL e, portanto, têm sido amplamente utilizados como tratamento da hipercolesterolemia, e doenças coronarianas (MCFARLAND et al., 2014).

Terapeuticamente as estatinas são usadas como lactonas (sinvastatina, lovastatina, atorvastatina e cerivastatina) ou ácidos livres (fluvastatina, mevastatina e pravastatina). As lactonas são lipofílicas, e necessitam da transformação hepática para a forma ácida, que representa a forma farmacológica ativa; os ácidos livres são substâncias hidrofílicas (ECKERT, WOOD E MULLER, 2005).

Além da inibição da síntese de colesterol, as estatinas atuam na regulação da função endotelial, diminuição do estresse oxidativo e inflamação, aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas e diminuição da resposta trombogênica. As estatinas também têm efeitos extra-hepáticos benéficos no sistema imune, ósseo e no SNC (GREENWOOD, STEINMAN E ZAMVIL, 2006; LIAO E LAUFS, 2005; YOSHILDA, 2003). Esta variedade de efeitos pleiotrópicos sugerem que esses

compostos possam ser utilizados em inúmeras desordens, desde doenças auto-imunes à demência (MIIDA; TAKAHASHI E IKEUCHI, 2007).

Atualmente, tem-se demonstrado uma baixa prevalência e um menor risco para a DA associada ao uso de estatinas (SCHULTZ, PATTEN, BERLAU, 2018; CHU et al., 2018), porém os estudos são ainda controversos (ANCELIN et al., 2012; BENITO-LEON et al., 2010; ZHOU, TERAMUKAI, FUKUSHIMA, 2007). Chu e colaboradores (2018) sugerem que alguns fatores podem contribuir para a discrepâncias entre os estudos, tais como, estágio da DA; o tempo e a dose utilizada nos tratamentos e o genótipo da ApoE. Wanmasae e colaboradores (2017) ao analisarem a relação dos poliformismos da ApoE com os lipídios séricos em paciente hipercolesterolêmicos tailandeses tratados com sinvastatina, observaram que o tratamento foi mais eficiente nos indivíduos portadores dos alelos 2 e 3 em comparação com os portadores do alelo 4.

Os estudos que têm demonstrado que as estatinas podem ter um possível efeito neuroprotetor, sugerem que estas estariam atuando por diferentes vias, como, por meio da modulação da atividade de biomarcadores como as fosfolipases A₂ (PLA₂); da redução do nível de diferentes frações do peptídeo β A insolúvel e consequente limitação na formação de placas neuríticas; à redução da oxidação mediada via óxido nítrico (NO) e dos processos inflamatórios neuronais (SILVA, GIRARDI, RAPOSO, 2010). As estatinas lipofílicas atravessam eficientemente a BHE podendo esta solubilidade ser relevante para os seus efeitos sobre a DA (ECKERT, WOOD E MULLER, 2005; LENNERNAS E FAGER, 1997).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas tem sido associados à redução dos níveis circulantes de isoprenóides (HÖGLUND E BLENNOW, 2007), pois a via de síntese de colesterol, é também responsável pela produção de isoprenóides, como o farnesil pirofosfato (FPP) e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (VAN DER MOST et al., 2009), compostos esses que atuam na modificação pós traducional de proteínas (LIAO E LAUFS, 2005). Uma das proteínas-alvo da isoprenilação são as GTPases (Ras, Rho Rac), que são cruciais para regular uma variedade de processos e funções celulares, como crescimento celular, proliferação, sinalização intracelular, rearranjo do citoesqueleto, fagocitose e funções dos osteoclastos (Figura 5) (CORDLE et al., 2005, LI, L. et al., 2012).

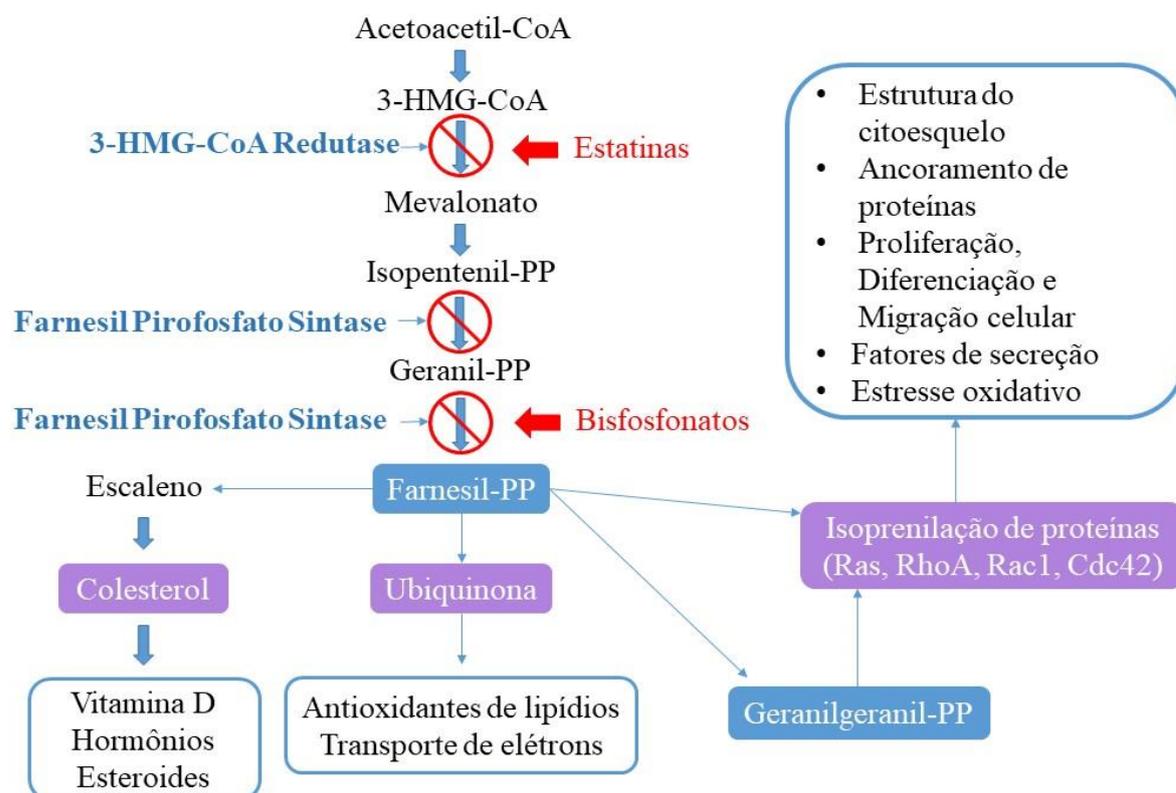


Figura 5. Via de biossíntese de colesterol e isoprenóides (Via do Mevalonato). HMG-CoA redutase (HMGCR) é a enzima limitante na via, que inicia a partir de acetil-CoA e acetoacetil-CoA, que são convertidos em HMG-CoA. Esse substrato é então convertido a mevalonato, que por sua vez é convertido em isopentenil pirofosfato (IPP), que pode ser isomerizado a dimetilalil difosfato (DMAPP). Os dois isômeros atuam na síntese dos isoprenóides geranil pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranilgeranil pirofosfato (GGPP). As estatinas atuam inibindo a enzima HMG-CoA redutase, e os bisfosfonatos agem na enzima FPP, reduzindo os níveis de colesterol e isoprenóides. (Adaptado ZIPP et al.2007).

1.5.2 Bisfosfonatos

Bisfosfonatos (BFs) são análogos estáveis do pirofosfato inorgânico. Estes compostos são potentes inibidores da reabsorção óssea osteoclástica, sendo assim amplamente utilizados no tratamento de distúrbios associados à reabsorção óssea excessiva mediada por osteoclastos, como osteoporose, metástase óssea osteolítica, hipercalcemia e doença de *Paget* (COXON, THOMPSON E ROGER, 2006; WHITAKER et al., 2012).

Esta classe de fármacos é dividida em dois grupos conforme o seu mecanismo de ação e estrutura química, sendo eles os BFs não nitrogenados (no-BFN - etidronato, tiludronato e clodronato) que atuam por incorporação ao ATP; e os BFs

nitrogenados (BFN - pamidronato, ibandronato, riserdronato, zoledronato e alendronato) que agem na via do mevalonato (ARFA, 2013).

Os BFN inibem a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS) responsável pela conversão de isopentenil-5-pirofosfato (IPP) para farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (Figura 5), assim como as estatinas diminui a síntese de colesterol endógeno e a prenilação de proteínas, que estão implicadas na fisiopatologia de doenças como a DA, doença de Huntington (HD), doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, doenças ósseas e alguns tipos de câncer (KARAMUSTAFA E CELEBI, 2006, LI, L. et al., 2012).

Recentemente, um estudo demonstrou que o Alendronato, BFN capaz de atravessar a BHE, pode ter um impacto positivo em doenças neurodegenerativas como a DA. Num modelo animal de DAe induzido por STZ-ICV, o tratamento com alendronato levou a uma melhora dos déficits cognitivo, aprendizagem e memória, atribuída à atenuação da neuroinflamação (interleucinas -IL-6, IL-1 β ; e de TNF- α , do estresse oxidativo (NO, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da deposição do peptídeo β A-42, observadas (ZAMMER et al., 2019).

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 (popularmente chamada de derrame) e, especialmente, a Doença de Alzheimer (DA) (IRVINE et al, 2008).

A DA é uma doença neurodegenerativa e progressiva das células nervosas. O diagnóstico desta doença em vida é uma formulação probabilística que depende da caracterização do quadro clínico e da exclusão de outras causas de demência (DE LA MONTE, WANDS, 2008).

Há um grande interesse social e econômico em desenvolver terapias que auxiliem a prevenção ou reversão dos danos causados pela DA, desse modo, o modelo de doença de Alzheimer do tipo esporádica induzida por infusões cerebrais de estreptozotocina tem-se demonstrado promissor no processo de entendimento dos mecanismos celulares na patogênese da doença de Alzheimer, por induzir um estado encefálico de resistência à insulina e alterações comportamentais e moleculares semelhantes à DA (RODRIGUES et al., 2009). Apesar dos recentes progressos na compreensão do mecanismo de neurodegeneração na DA, ainda não existe nenhuma terapia totalmente eficaz.

Alterações no metabolismo de colesterol têm sido associadas ao desenvolvimento da DA, e as estatinas e os bisfosfonatos, ambas classes de medicamentos que atuam sobre a via biossintética do colesterol, e que são utilizados em tratamentos de hipercolesterolemia e osteoporose respectivamente, podem ser um mecanismo terapêutico para a DA. Há estudos utilizando modelo de DA do tipo esporádica e estatinas que demonstraram resultados promissores relacionados à neuroproteção conferidos por este medicamento (TRAMONTINA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o possível papel neuroprotetor de sinvastatina e alendronato sobre modelo de Doença de Alzheimer do tipo esporádica (DAe) induzido por administração intracerebroventricular de estreptozotocina em ratos *Wistar* adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos animais expostos ao modelo de doença de Alzheimer por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e submetidos ao tratamento com sinvastatina e alendronato, os seguintes parâmetros:

- Déficit cognitivo;
- Metabolismo energético hipocampal (captação de glicose);
- Marcadores de astrócitos (S100B e GFAP);
- Marcadores de atividade astrogliar (GS e GSH);
- Conteúdo de BDNF;
- Estresse oxidativo hipocampal;
- Conteúdo de colesterol sérico e hipocampal.

PARTE II

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos da colônia *Wistar* machos com 90 dias de idade provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob normas de ética para pesquisa em modelos animais (Nº 33940), com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), pelas diretrizes do CONCEA que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Os animais, foram mantidos em padrão sanitário convencional no Biotério de Departamento de Bioquímica. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico em grupos de 3 animais por caixa (dimensões: 410 x 340 x 160 mm; 1110 cm²; 14,5 cm altura), mantidos em temperatura ambiente controlada (22 ± 2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, água e ração comercial *ad libitum*.

4.2 INDUÇÃO DO MODELO

A infusão de STZ foi realizada intracerebroventricular como descrito previamente (RODRIGUES et al. 2009; SHARMA E GUPTA, 2001). No dia da cirurgia os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Após a anestesia os animais foram posicionados num estereotáxico, e realizou-se uma incisão sagital na linha média do couro cabeludo e perfurações, utilizando uma broca, as quais foram feitas no crânio de ambos os lados sobre os ventrículos laterais. Os ventrículos laterais foram acessados usando as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma; sutura lateral a sagital de 1,5 mm; 3,6 mm abaixo da superfície do cérebro (DOS SANTOS et al., 2018). Os animais receberam uma injeção ICV bilateral de estreptozotocina (3 mg/kg) ou veículo (Solução salina balanceada de Hank – HBSS – contendo em mM: 137 NaCl; 0,63

Na₂HPO₄; 4,17 NaHCO₃; 5,36 KCl; 0,44 KH₂PO₄; 1,26 CaCl₂; 0,41 MgSO₄; 0,49 MgCl₂ e 10 glicose, pH 7,4), no volume de 5 µL por hemisfério, utilizando uma seringa Hamilton de 10 µL. Após a cirurgia, os animais permaneceram em gaiolas aquecidas para a manutenção da temperatura corporal a 37,5 ± 0,5 °C até total recuperação da anestesia.

4.3 TRATAMENTO

A Sinvastatina e o Alendronato foram diluídos em etanol 50%, e administrados por via oral (gavagem). Durante o tratamento os animais receberam 0,2 mL, em dias intercalados, de Sinvastatina (5mg/Kg), Alendronato (3mg/Kg) ou veículo (etanol 50%). O tratamento foi iniciado após sete dias do procedimento cirúrgico, e foi realizado em dias intercalados por três semanas (21 dias) (SLIWIŃSKI et al., 2004; TRAMONTINA et al., 2011).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Transcorrido 7 dias da cirurgia e recuperação dos animais, foi iniciado o tratamento com sinvastatina e alendronato. Foram administradas por gavagem doses de sinvastatina na concentração de 5 mg/Kg de peso corporal, no volume de 0,2 mL, ou alendronato na concentração 3 mg/Kg de peso corporal, também no volume de 0,2 mL, em dias intercalados por um período de 21 dias (Figura 5).

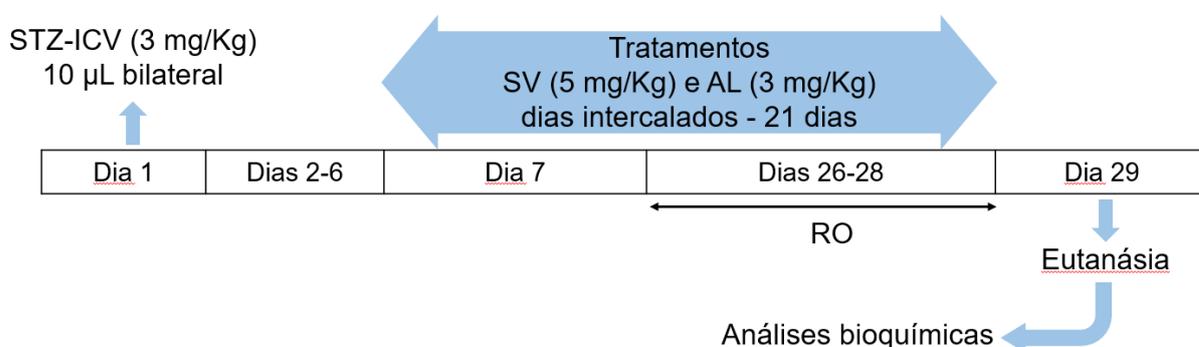


Figura 5. Desenho experimental. A figura mostra o cronograma experimental, incluindo data do procedimento cirúrgico, tratamento medicamentoso e análises comportamentais e bioquímicas. ICV – intracerebrovetricular; STZ – estreptozotocina; SV – sinvastatina; AL – alendronato; RO – teste de reconhecimento de objetos.

Os animais foram divididos de forma randomizada, compondo 4 grupos de acordo com o tratamento recebido, tabela 1:

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Intervenção
I	SHAM + Veículo
II	STZ + Veículo
III	STZ + SV (5mg/Kg)
IV	STZ + AL (3mg/Kg)

Fonte: Autor, 2019. STZ: estreptozotocina; SV: sinvastatina; AL: alendronato

4.5 AVALIAÇÃO COGNITIVA

4.5.1 Teste de reconhecimento de objeto

Após o término do tratamento, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, com o objetivo de avaliar o déficit cognitivo (memória) dos animais, Este paradigma foi realizado como descrito inicialmente (ENNACEUR E DELACOUR, 1988) e adaptado (BIASIBETTI, et al., 2017).

O teste comportamental é dividido em três fases: habituação, treinamento e teste. A habituação teve duração de 10 minutos, o treinamento e teste teve duração de 5 minutos cada e foi realizada num aparelho de campo aberto (caixas pretas com lado de 50 cm).

Na fase de habituação os animais foram colocados no centro do aparelho e permitido explorar livremente a arena de campo aberto na ausência de objetos. Vinte e quatro horas após a fase de habituação, os animais foram submetidos à fase de treinamento: o rato retornou ao aparelho que continha dois objetos de amostra idênticos (A + A). Após 1 hora e 24 horas após a fase de treinamento, os ratos retornaram ao aparelho para testar a memória de curto prazo (MCP) ou de longo prazo (MLP), respectivamente. Na sessão de teste, o rato foi devolvido à arena de campo aberto que continha dois objetos; 1 o objeto era idêntico à sessão de treinamento e o outro era novo (A + B). Para MLP, o objeto 'B' foi substituído por um terceiro e o objeto 'A' foi mantido o mesmo. O tempo gasto pelos ratos em explorar os objetos foi monitorado por um sistema de vídeo. O índice de reconhecimento em cada sessão foi

calculado da seguinte forma: exploração do tempo o novo objeto x 100/tempo explorando os dois objetos. Exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o focinho (distância ≤ 2 cm) e/ou patas dianteiras.

Todos os experimentos comportamentais foram realizados no período noturno, em sala livre de som e com intensidade luz de 12(lx). Entre um animal e outro, o aparato e os objetos foram limpos com solução de etanol 70% e secos com papel toalha.

4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS

Após 12 horas do teste comportamental, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para a coleta de amostras do fluido cerebrospinal, hipocampo e soro. Após anestesiados os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina.

4.6.1 Obtenção do fluido cerebrospinal, amostras de soro e hipocampo

Após serem anestesiados os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico e o líquido cefalorraquidiano (LCR) foi obtido por uma punção na cisterna magna usando uma seringa de insulina (27 gauge x 1/2 polegada). Usando uma seringa de 3 mL, foi realizada uma punção intracardíaca para a retirada de sangue. O sangue então foi transferido para um tubo de coleta de sangue no qual repousou por 30 minutos e em seguida foi centrifugado (3000 rpm, 5 min) para a obtenção do soro. Ambas as amostras foram congeladas a -80°C até posterior análise. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros foram removidos e colocados em uma solução de tampão fosfato de sódio (em mM). 51,33 NaCl; 19,13 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 81,01 Na_2HPO_4 ; pH 7,4. O hipocampo foi dissecado e fatias com 300 μm de espessura foram obtidas através de um equipamento de corte (McIlwain Tissue Chopper®). As amostras foram congeladas a -80°C para posterior análises ou foram utilizadas para técnicas de captação de glicose (VICENTE, et al., 2007; TRAMONTINA, F. et al., 2007).

4.6.2 Captação de glicose

A captação de glicose foi realizada em fatias hipocampais conforme Schuck, 2007. As fatias foram colocadas numa placa de 24 poços (uma fatia por poço), e incubadas a 35°C em 300 µL de solução salina equilibrada de Hanks (HBSS), por 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado 20 µL de 2-H³-Deoxi-D-glicose (0,1 µCi) por poço e após 30 min a incubação foi finalizada pela remoção do meio e lavagem das células três vezes com HBSS gelado. Os valores foram corrigidos pela captação inespecífica de glicose medida pela incubação de 10 µM de citocalasina b (inibidor do transportador de glicose GLUT1), por 5 minutos antes do início da incubação de 2-H³-Deoxi-D-glicose, realizado em gelo. Após 15 minutos das lavagens com HBSS, as fatias foram lisadas com NaOH (0,5 M), posteriormente foi adicionado líquido de cintilação, e a radioatividade foi medida em um contador de cintilação. Os valores foram corrigidos pelo valor de proteínas totais das fatias.

4.6.3 Conteúdo de S100B

A conteúdo da S100B hipocampal e no LCR foi realizada por meio da utilização de um imunoenensaio previamente descrito (LEITE, et al., 2008): 50 µL de amostra (fatias hipocampais previamente lisadas ou licor na diluição de 1:100) e 50 µL de tampão Tris 50 mM foram incubados por 2h numa placa de 96 poços (previamente revestida durante a noite com anticorpo monoclonal anti-S100B). Posteriormente, foi incubado o anticorpo policlonal anti-S100B com peroxidase conjugada por 1h à 37 °C. A reação colorimétrica foi lida à 492 nm com o-fenilenediamina em um espectrofotômetro (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA). Os dados de conteúdo de S100B hipocampal foram corrigidos pelo valor de proteínas totais e expressos em ng/µg de proteína.

4.6.4 Conteúdo de GFAP

O conteúdo de GFAP em fatias de hipocampo foi realizada através de um imunoenensaio previamente descrito (TRAMONTINA, F. et al. 2007): a fatias foram homogeneizadas em 300 µL de solução de lise (PBS, PMFS 100 mM e EGTA 100

mM). Numa placa de 96 poços foram pipetados 100 μL de amostra contendo 70 μg de proteína e incubada durante a noite à 4° C. Posteriormente os poços foram incubados com um anticorpo policlonal anti-GFAP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) de coelho por 2 h, seguido da incubação com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 h, em temperatura ambiente; a curva padrão de GFAP (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) variou de 0,1 a 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A reação colorimétrica foi lida à 492 nm com o-fenilenediamina em um espectrofotômetro (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA). Os dados de conteúdo de GFAP foram corrigidos pelo valor de proteínas totais e os valores foram expressos em $\text{ng}/\mu\text{g}$ de proteína.

4.6.5 Atividade da glutamina sintetase (GS)

O ensaio enzimático para glutamina sintetase (GS) foi realizada em fatias hipocâmpais, como descrito anteriormente por MINET, et al., 1997. As fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 50 mM de tampão imidazol. Os homogenatos foram então incubados com (mM): 50 imidazol, 50 hidroxilamina, 100 L-glutamina, 25 arsenato de sódio dibásico hepático, 0,2 ADP e 2 cloreto de manganês, pH 6,2 por 15 min a 37 ° C. As reações foram encerradas pela adição de 0,2 ml de FeCl_3 0,37 M, ácido tricloroacético 200 mM, e HCl 670 mM. Após a centrifugação, a absorbância do sobrenadante foi medida em um leitor de placas (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA), a 530 nm. O ácido γ -glutamil-hidroxamato padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) variou de 0,1 a 10 mmol/mL. Os dados foram corrigidos pelo valor de proteínas totais e a GS atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$ de proteína.

4.6.6 Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

O conteúdo de glutathiona foi determinado como descrito por ALLEN, S. e colaboradores (2000) em fatias hipocâmpais. As fatias do hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0, contendo 5 mM de EDTA e a proteína foi precipitada com 1,7% de ácido metafosfórico. O o-ftalaldeído (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de metanol) foi adicionado ao sobrenadante à temperatura ambiente por 15 min. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectra Max GEMINI XPS,

Molecular Devices, EUA), usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com soluções GSH padrão em concentrações que variam de 0 a 500 M. Os dados foram corrigidos pelo valor de proteínas totais e as concentrações de GSH foram calculadas como nmol/mg de proteína.

4.6.7 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A análise geral da produção de espécies reativas de oxigênio em fatias hipocâmpais, pode ser realizada usando um composto não fluorescente, 2'-7' diacetato de diclorofluoresceína DCF-DA. O DCF-DA é hidrolisado por esterases intracelulares e depois oxidado por ERO a um composto fluorescente, 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF). Foi adicionado DCF-DA (300 µM) em fatias hipocâmpais homogeneizadas em tampão fosfato-KCl por 30 min a 37 ° C. Após a exposição ao DCF-DA foi adicionado Triton X-100. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm (DE ALMEIDA, et al., 2007). Os dados foram corrigidos pelo valor de proteínas totais.

4.6.8 Conteúdo de BDNF

Para a quantificação do BDNF, fatias hipocâmpais foram homogeneizadas com solução de lise: 100 mM Tris/HCl (pH 7,0), albumina bovina 2% (BSA), 1M NaCl, 4 mM EDTA.Na₂, 2% Triton X-100, 0,1% azida sódica e inibidor de proteases. O homogenato hipocâmpal foi centrifugado a 14000 Xg por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação a quantificação do BDNF do sobrenadante e o líquido cefalorraquidiano (LCR) foram analisados por método de ELISA, utilizando um kit comercial da Millipore e lido a absorvância a 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA). Os dados foram corrigidos pelo valor de proteínas totais.

4.6.9 Dosagem do colesterol hipocampal

Afim de analisarmos no hipocampo o colesterol de membrana plasmática (predominantemente presentes em microdomínios), utilizamos o composto metil-ciclodextrina (MCD). O MCD é um composto que se liga ao colesterol possibilitando a sua remoção das células, a sua ação é estritamente superficial, sendo assim este age seletivamente no colesterol da membrana plasmática, e, portanto, tem sido amplamente utilizado no estudo de depleção de colesterol e desorganização de microdomínios de membrana (BARMAN; NAYAK, 2007). Para análise de colesterol de membrana em fatias hipocampais, adicionou-se 100 µL de MCD (20 µM) à microtubos contendo 2 fatias de hipocampo por 20 minutos em banho-maria a 37 °C. Posteriormente foi coletado 2 µL do sobrenadante e pipetado numa microplaca de 96 poços para realização da dosagem do colesterol removido, presente principalmente em microdomínios de membrana. Posteriormente foi retirada toda a solução de MCD restante, e as fatias foram homogeneizadas em 100 µL de solução de tampão fosfato de sódio (em mM). 51,33 NaCl; 19,13 NaH₂PO₄·H₂O; 81,01 Na₂HPO₄; pH 7,4, então novamente foram coletados 2 µL para a microplaca de 96 poços. A dosagem de colesterol foi realizada por kit colorimétrico da Bioclin do Brasil, de acordo com as instruções do fabricante, e lido à 500 nm em espectrofotômetro (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA).

4.6.10 Dosagens séricas

As dosagens de colesterol total, colesterol HDL (Lipoproteína de Alta Densidade) e das transaminases, TGO (Transaminase Oxalacética) e TGP (Transaminase Pirúvica), foram realizadas através de kits colorimétricos da Bioclin do Brasil, de acordo com as instruções do fabricante.

4.6.11 Determinação de proteína

O conteúdo de proteína foi analisado pelo método de Lowry, modificado por Peterson, usando albumina bovina como padrão (PETERSON, 1977).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 8.0.2. Para a análise do comportamento foi realizado o teste de *t* de *Wilcoxon*, e nos parâmetros bioquímicos foi utilizado análise de variância unidirecional (*ANOVA*), seguida pelo teste de múltipla comparação de *Tukey*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO COGNITIVA

Na avaliação do desempenho cognitivo analisado pela memória declarativa, observou-se uma perda de memória de curto e longo prazo do grupo STZ-veículo, e que tanto o tratamento com sinvastatina, quanto com alendronato foi capaz de reverter esta perda (Figura 6A e B). O grupo Sham não demonstrou nenhuma alteração. Os dados são expressos em porcentagem de exploração do objeto novo pelo animal, sendo considerado que os animais do grupo STZ exploraram igualmente ($\leq 50\%$) os objetos para eles apresentados. Os animais do grupo Sham e os tratados realizaram uma maior exploração do objeto novo ($>50\%$).

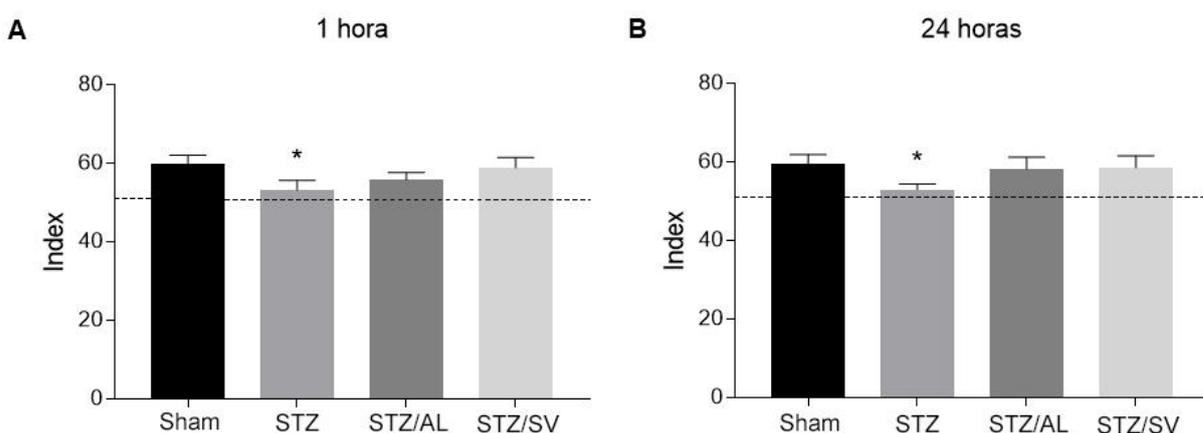


Figura 6. Desempenho cognitivo dos ratos adultos submetidos à injeção ICV de STZ (3 mg/Kg) e tratados com sinvastatina (5 mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg) via oral. Os animais foram avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos quatro semanas após o procedimento cirúrgico e tratamento. A) Índice de reconhecimento dos animais 1 hora após o treino e B) Índice de reconhecimento dos animais 24 horas após treino. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (N=15-16). Teste *t* de Wilcoxon, $p < 0,05$. A linha representa 50%. * Porcentagem de exploração $\leq 50\%$.

5.2 METABOLISMO DE GLICOSE

Para avaliarmos o metabolismo de glicose hipocampal, foi realizado ensaio de captação de glicose em fatias frescas de hipocampo. Fatias hipocampais dos ratos do grupo STZ-veículo demonstraram uma redução na atividade de captação de glicose quando comparado aos grupos Sham e os tratados com sinvastatina ou alendronato ($p < 0,05$). Não existiram diferenças entre os grupos de animais tratados e o grupo

Sham, sugerindo que o tratamento reverteu os efeitos induzidos pela STZ administrada via ICV ($p > 0,05$) (Figura 7).

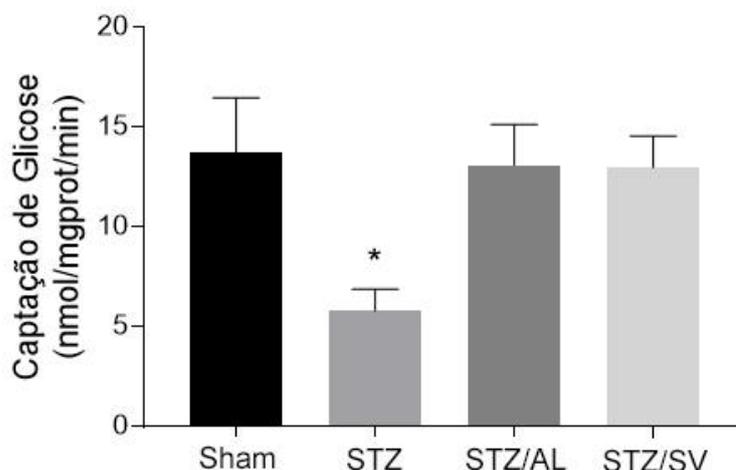


Figura 7. Captação de glicose no hipocampo de ratos submetidos à injeção ICV de STZ (3 mg/Kg) e tratados com sinvastatina (5 mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg) via oral. Quatro semanas após o procedimento cirúrgico e tratamentos, o hipocampo dos animais foi dissecado e realizaram o ensaio de captação de glicose em fatias frescas de hipocampo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre o STZ e todos os outros grupos ($N=8-9$). ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$.

5.3 MARCADORES ASTROCITÁRIOS

A ativação dos astrócitos após à injeção de STZ-ICV foi avaliada pelo conteúdo da proteína S100B e GFAP. Não foram observadas alterações nos níveis de S100B no hipocampo dos animais que receberam infusão ICV-STZ, e que receberam só salina, quando comparados com o grupo Sham ($p = 0,55$), mas os tratamentos com sinvastatina ou alendronato demonstraram uma tendência a redução do seu conteúdo quando comparados com o grupo STZ-ICV ($p = 0,083$ e $p = 0,086$, respectivamente) (Figura 8A).

O conteúdo de GFAP apresentou um aumento nos animais STZ-veículo quando comparado com o grupo Sham e os tratamentos com sinvastatina ou alendronato reverteram este aumento ($p < 0,05$) (Figura 8B).

Foi analisado também a atividade da glutamina sintetase (GS), e pode-se observar uma tendência a redução no grupo STZ-veículo quando comparado com o grupo Sham ($p = 0,051$), e o tratamento com sinvastatina demonstrou um tendência a reverter este efeito ($p=0,061$ e $p=0,098$, respectivamente), porém não o tratamento com alendronato ($p=0,7$) (Figura 8C).

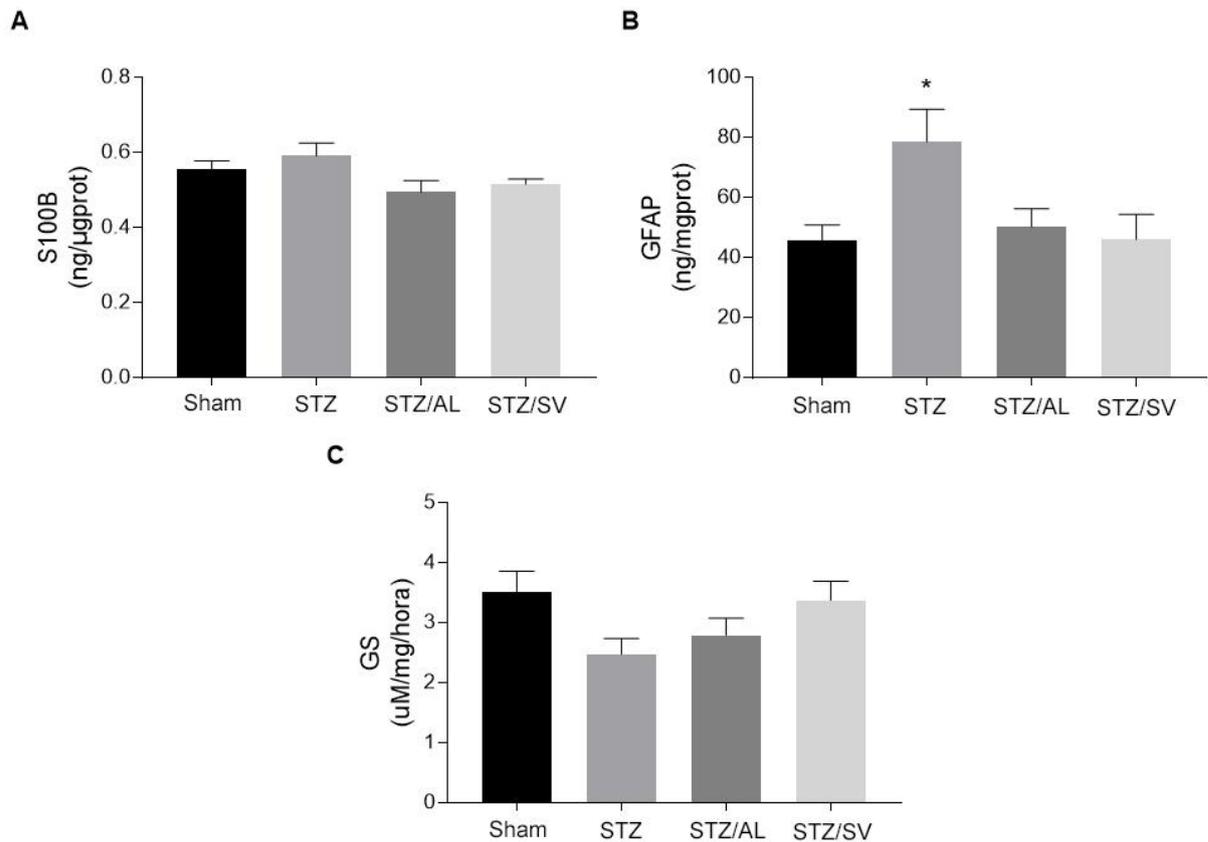


Figura 8. Conteúdo de proteína S100B e GFAP, e a atividade da GS no hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção de STZ (3 mg/Kg) via ICV e tratados por gavagem com sinvastatina (5mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg). Quatro semanas depois do procedimento cirúrgico e tratamento, o hipocampo foi dissecado, posteriormente os níveis de S100B e GFAP e a atividade da GS. A) Conteúdo de S100B no hipocampo, B) Conteúdo de GFAP no hipocampo e C) Atividade da GS. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre o grupo STZ e todos os outros grupos (N=8-11, ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$).

5.4 DISFUNÇÃO ASTROGLIAL

Os astrócitos também atuam no estresse oxidativo, e a sua capacidade antioxidante foi investigada pela análise do conteúdo de GSH e da produção de espécies reativas de oxigênio que foi analisada pelo conteúdo do composto DCF.

A GSH não é um marcador específico de astrócitos, porém sua síntese e reciclagem cerebral dependem da atividade dos astrócitos. O conteúdo de GSH apresentou uma redução no grupo STZ-veículo quando comparado com o grupo Sham ($p < 0,05$), e a administração de sinvastatina ou alendronato proporcionaram a reversão deste efeito ($p < 0,05$).

O conteúdo de DCF apresentou um aumento no grupo de animais que foram submetidos a injeção STZ-ICV e que receberam apenas veículo, quando comparados ao grupo Sham ($p < 0,05$), e a administração oral de sinvastatina e

alendronato reverteram parcialmente o efeito do STZ ($p = 0,16$ e $p = 0,19$) (Figura 9A e 9B).

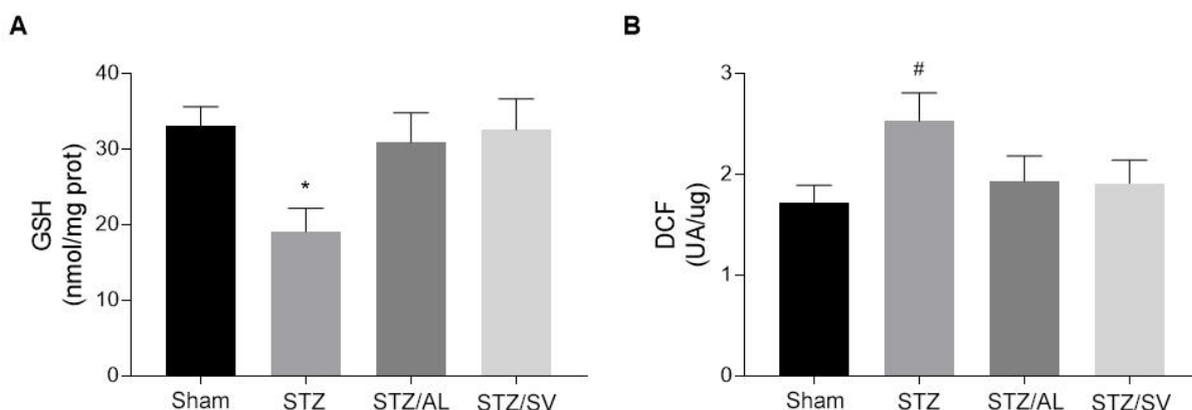


Figura 9. Conteúdo de glutatona e produção de DCF em hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção de STZ (3 mg/Kg) via ICV e tratados por gavagem com sinvastatina (5 mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg). Quatro semanas após o procedimento cirúrgico e tratamento, o hipocampo foi dissecado, posteriormente foi analisado o conteúdo de glutatona e produção de DCF. A) Conteúdo de glutatona no hipocampo e B) Conteúdo de DCF no hipocampo. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre o grupo STZ e todos os outros grupos (N=7-8, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$). # Diferença significativa entre o grupo STZ e Sham (N=8-9, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

5.6 CONTEÚDO BDNF

Nas análises do conteúdo de BDNF no hipocampo, o grupo de animais STZ-veículo quando comparado ao grupo Sham, apresentou redução do conteúdo de BDNF ($p < 0,05$). O grupo de animais tratados com alendronato apresentou aumento significativo do conteúdo de BDNF quando comparado com o grupo STZ-veículo ($P < 0,05$). O tratamento com sinvastatina demonstrou um aumento significativo quando comparado com os grupos Sham e STZ-veículo ($p = 0,006$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 10A).

No LCR o conteúdo de BDNF, não apresentou diferença significativa entre os grupos de animais Sham ($p > 0,05$). Entretanto, os grupos de animais tratados com sinvastatina ou alendronato apresentaram uma tendência ao acréscimo do conteúdo de BDNF em relação aos outros grupos Sham ($p = 0,68$ e $p = 0,89$, respectivamente) e STZ-veículo ($p = 0,65$ e $p = 0,73$, respectivamente) (Figura 10B).

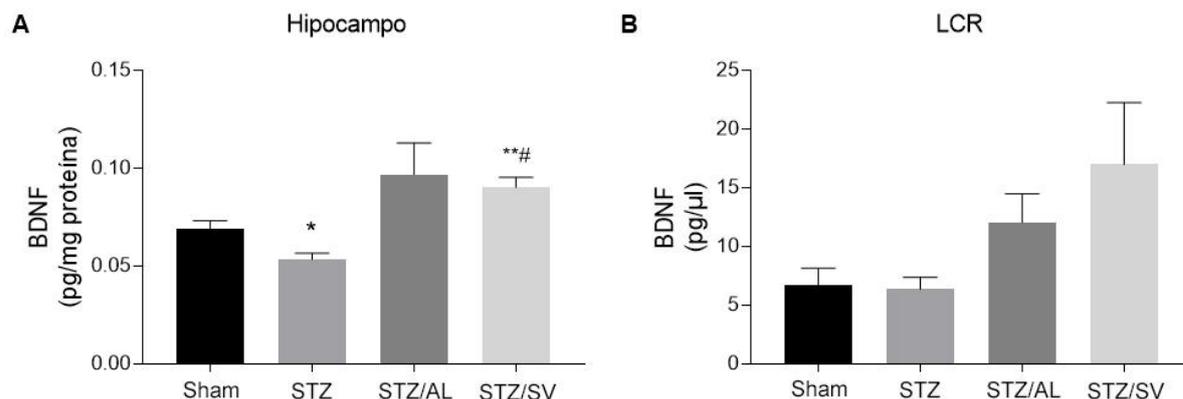


Figura 10. Conteúdo de BDNF no hipocampo e LCR de ratos adultos submetidos à injeção de STZ-ICV (3 mg/Kg) e tratados por gavagem com sinvastatina (5 mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg). Quatro semanas após o procedimento cirúrgico e tratamento, o hipocampo foi dissecado e utilizado para avaliação do conteúdo de BDNF. A) Conteúdo de BDNF no hipocampo. B) Conteúdo de BDNF no líquido cefalorraquidiano. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa entre o grupo STZ e os grupos Sham e STZ/AL (N=6-7, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$) ** Diferença significativa do grupo STZ/SV e o grupo Sham (N=6-7, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,006$). # Diferença significativa do grupo STZ e o grupo STZ/SV (N=6-7, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,0001$).

5.7 DOSAGEM DE COLESTEROL HIPOCAMPAL

Em fatias hipocampais foi avaliado o colesterol de microdomínios de membrana, analisado através da utilização do composto MCD que realiza a depleção do colesterol da membrana plasmática, que se encontra predominantemente em microdomínios de membrana, e foi encontrado um acréscimo significativo no colesterol no grupo STZ-veículo comparado com o grupo Sham ($p < 0,0001$), e os tratamentos com sinvastatina ou alendronato reverteram significativamente este aumento ($p < 0,05$) (Figura 11A).

Foi avaliado também o colesterol que não foi extraído pelo MCD, considerado como colesterol celular, e este não apresentou alteração em nenhum dos grupos (Figura 11B). Porém, a soma dos resultados – extraído com MCD e não extraído – considerado como colesterol total da fatia mostrou assim como o colesterol de microdomínios um aumento no grupo STZ-veículo quando comparado com o grupo Sham ($p < 0,05$), mas os tratamentos não demonstraram o mesmo efeito (Figura 12C).

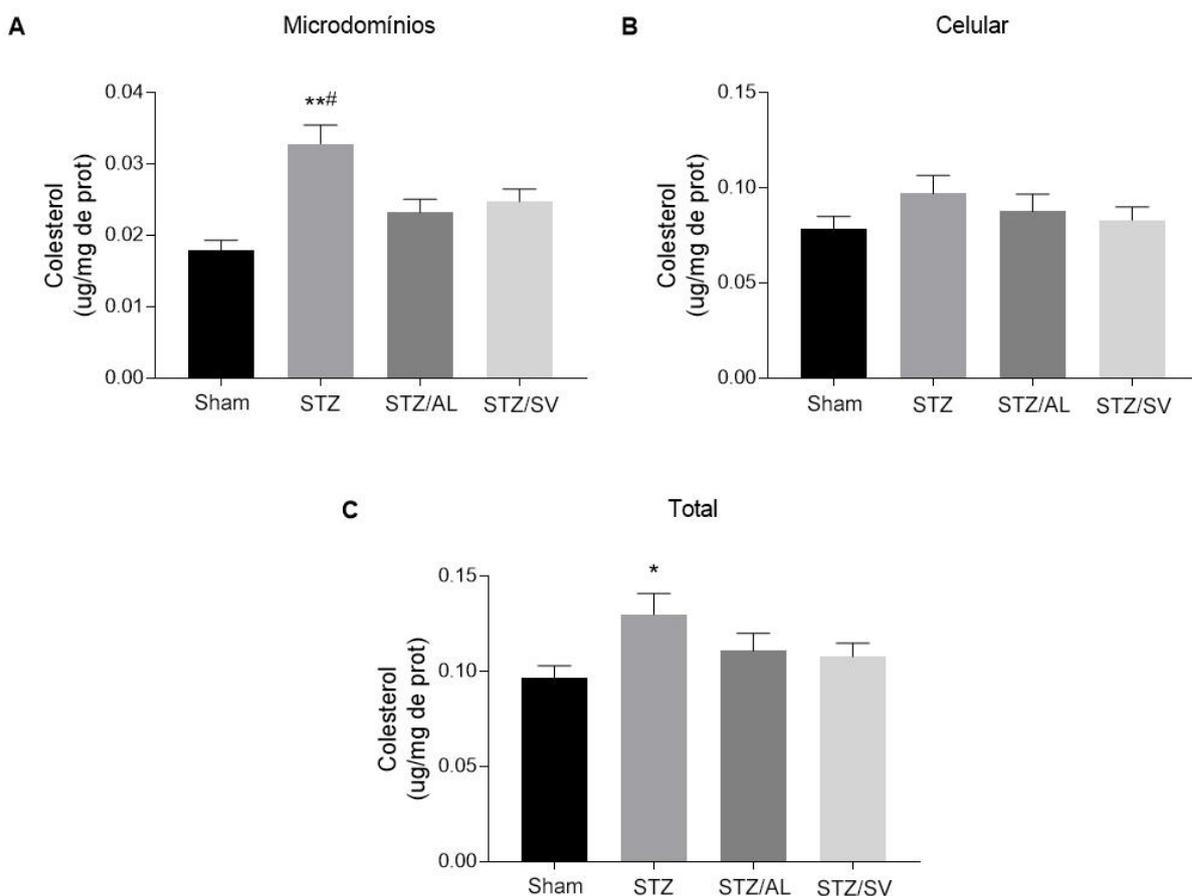


Figura 11. Colesterol presente nos microdomínios, celular e total do hipocampo de ratos adultos submetidos à injeção de STZ-ICV (3 mg/Kg) e tratados por gavagem com sinvastatina (5 mg/Kg) ou alendronato (3 mg/Kg). Quatro semanas após o procedimento cirúrgico e tratamento, o hipocampo foi dissecado e utilizado para avaliação do conteúdo de colesterol por kit comercial. A) Colesterol de microdomínios de membrana, B) Colesterol celular, C) Colesterol Total. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão. * Diferença significativa de entre os grupos Sham e STZ (N=6-9, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$), ** Diferença significativa do grupo STZ e o Sham (N=6-9, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,0001$). # Diferença significativa entre o grupo STZ e os grupos STZ/AL e STZ/SV (N=6-9, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

5.8 DOSAGENS SÉRICAS

Na análise do soro dos animais não foi encontrada alterações no colesterol total séricos em nenhum dos grupos avaliados, porém houve um aumento do conteúdo de colesterol HDL nos grupos de animais tratados tanto com sinvastatina, quanto com alendronato, quando comparado com os grupos Sham e STZ. As enzimas TGO e TGP também não apresentaram alterações (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de soro de ratos quatro semanas após a submissão destes a injeção de STZ-ICV e administração de sinvastatina ou alendronato.

	Sham	STZ	STZ/AL	STZ/SV
Colesterol Total (mg/dl)	49,86±4,47	55,01±5,87	56,96±3,10	56,85±3,89
Colesterol HDL (mg/dl)	26,75±2,34	25,17±1,19	41,34±6,05*#	37,72±4,18*#
TGO (UI)	11,86±0,56	11,78±1,09	12,21±0,82	13,07±1,4
TGP (UI)	51,16±1,41	51,42±0,95	54,01±1,43	53,08±1,60

HDL - lipoproteína de alta densidade, TGO - Transaminase Oxalacética, TGP - Transaminase Pirúvica. Dados expressos como média ± erro padrão. * Diferença do grupo Sham e os grupos STZ/AL e STZ/SV (N = 11-13, ANOVA unidirecional seguida do teste de *Tukey*, p<0,05), # Diferença significativa entre os grupos STZ e os grupos STZ/AL e STZ/SV (N = 11-13, ANOVA unidirecional, seguida do teste de *Tukey*, p<0,05).

PARTE III

6 DISCUSSÃO

A DAe, é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível intimamente associada ao processo de envelhecimento, que leva à deterioração das funções cerebrais. Esta doença afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e apesar do conhecimento de suas características histopatológicas e bioquímicas, a sua causa na maioria dos casos ainda é desconhecida (ARMSTRONG, 2013).

Os pacientes com DA apresentam prejuízo de memória e cognição, alterações comportamentais e emocionais (ARMSTRONG, 2013; MUNOZ E FELDMON, 2000), sintomas estes que ocorrem por um longo período de tempo, resultando na necessidade de desenvolver métodos terapêuticos para retardar e prevenir a progressão da doença. As principais características fisiopatológicas da DA, é a presença de depósitos amiloides e da proteína tau fosforilada, porém também ocorre o desenvolvimento de estresse oxidativo, alterações no metabolismo de glicose, alterações de neurotransmissores e uma extensa perda neuronal (DE LA MONTE E WANDS, 2008).

Nos últimos anos vêm se acumulando evidências clínicas e epidemiológicas sobre uma maior susceptibilidade de indivíduos para desenvolver a DAe, como alterações no metabolismo de lipídios, e também a presença do alelo $\epsilon 4$ para a ApoE (KIVIPERTO et al., 2001). Partindo da possibilidade do colesterol estar envolvido na patogênese da DAe, diversos grupos de pesquisa têm avaliado os efeitos de drogas que atuam no metabolismo de colesterol, tais como as estatinas e os bisfosfonatos, como métodos terapêuticos na redução da incidência da DAe em modelos animais transgênicos e não transgênicos (PIERMARTIRI, et al., 2010; ZAMMER et al., 2019).

As estatinas e os bisfosfonatos atuam inibindo enzimas da via do mevalonato, reduzindo os níveis de colesterol, bem como a produção de isoprenóides intermediários, tais como o FPP (farnesil pirofosfato) e o GGPP (geranylgeranyl pirofosfato), que são essenciais para a modificação pós-traducional lipídica de proteínas, e que tem sido encontrada aumentada em pacientes com DA e em modelos animais da doença (HOFF et al., 2008; LIAO; LAUFS, 2005). A redução da síntese desses isoprenóides afeta diretamente as proteínas da família das GTPases, proteínas estas que possuem inúmeras funções celulares (CORDLE et al., 2005).

Para os estudos de formas terapêuticas da DAe, tem sido amplamente utilizado o modelo animal pela infusão ICV de STZ, um modelo não transgênico, pois este apresenta características semelhantes as encontradas em pacientes com a DAe, tais como, déficit cognitivo, deposição β A, hipometabolismo de glicose, neuroinflamação, e estresse oxidativo (DOS SANTOS, VIZUETE, GONÇALVES, 2019; ZAMMER et al., 2019).

No presente trabalho utilizando o modelo animal não-transgênico da DAe por infusão de STZ-ICV, foram analisadas a memória e alterações bioquímicas do modelo; bem como os efeitos do tratamento por gavagem com sinvastatina e alendronato nestes parâmetros. De acordo com estudos prévios, demonstramos que os animais do grupo STZ-veículo, apresentaram um prejuízo cognitivo (BIASIBETTI et al., 2017; CLARK, ZOLA E SQUIRE, 2000), que foi analisado pela aplicação de um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores (BIASIBETTI et al., 2017). Este teste baseia-se na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo do que o familiar, em um contexto conhecido.

Em nossos resultados, observamos que a administração oral de sinvastatina ou alendronato foi capaz de reverter o déficit cognitivo causado pelo STZ, assim como observados em outros estudos (HU et al., 2018; TRAMONTINA, A. C. et al. 2011; ZAMMER et al., 2019). Contudo, os efeitos das estatinas no desempenho cognitivo em pacientes com DAe ainda são controversos. Alguns autores, por exemplo, demonstraram que as estatinas levam a uma melhora na memória em modelos experimental e reduz a incidência de demência em pacientes, mas outros não encontram tais resultados (KURINAMI et al., 2008; PIERMARTINI et al., 2010; WILLEY E ELKIND, 2010).

Partindo da hipótese que altos níveis colesterol sérico (hipercolesterolemia), estão relacionados ao desenvolvimento da DAe, analisamos o colesterol total plasmático do grupo de animais que receberam à injeção de ICV de STZ, assim como os animais tratados com sinvastatina e alendronato. Nenhum dos grupos apresentaram alterações quando comparados com o grupo Sham, resultados estes também encontrados em estudos prévios (TRAMONTINA, A. C. et al., 2011; ZAMMER et al., 2019).

O transporte de colesterol através dos tecidos é realizado por meio de lipoproteínas, tal como, a lipoproteína HDL, que é um dos principais transportadores

de colesterol, que proporcionam o seu transporte principalmente entre tecidos periféricos e fígado, e o influxo de colesterol nas células (YAO e PAPADOPOULOS, 2002). Estudos epidemiológicos observaram que níveis mais elevados de HDL e da ApoA-I (principal componente proteico da HDL) plasmático atenuam o risco para o desenvolvimento da DAe, uma vez que seus níveis mais baixos foram encontrados em paciente com a doença (BUTTON et al., 2019). Atzmon e colaboradores (2002) demonstraram também uma correlação positiva entre os níveis de HDL plasmático e uma função cognitiva superior em pessoas centenárias.

Portanto, o conteúdo de HDL também foi analisado, e não encontramos diferenças entre o grupo STZ e o grupo Sham, porém os tratamentos com sinvastatina e alendronato apresentaram um acréscimo significativo quando comparados tanto com o grupo STZ, quanto com o Sham. Trabalhos têm demonstrado que a sinvastatina e o alendronato *per se*, aumentam os níveis de HDL no soro (ADAMI et al., 2000; MONTAGNAMI et al., 2003).

Observa-se que muitas proteínas associadas ao HDL estão presentes no parênquima cerebral, no LCR e na íntima cerebrovascular das artérias leptomeníngicas, dentre essas estão a ApoA-I, ApoJ, ApoE, ApoC-III, ApoD e ApoA-IV. E os níveis dessas proteínas no LCR se correlacionam moderadamente com os seus respectivos níveis no plasma, com exceção da ApoE, sugerindo que ocorre o transporte ou difusão da periferia para o cérebro (BUTTON et al., 2019). Estudos demonstraram que a HDL pode ser transportada através de células endoteliais microvasculares do cérebro humano por meio de receptores sequestradores (SR)-BI – do inglês Scavenger receptor type B class I (FUNG et al., 2017).

No entanto, os mecanismos pelos quais os níveis mais elevados de HDL podem estar relacionado com um menor risco de desenvolvimento da DA ainda são desconhecidos, mas sugere-se que a HDL pode estar influenciando indiretamente na saúde do cérebro como um fator circulante atuando principalmente a partir do lúmen cerebrovascular e da íntima (BUTTON et al., 2019).

Os efeitos neuroprotetor da HDL na DA, também tem sido associado a sua capacidade de regular o metabolismo e deposição da β A nos vasos cerebrais conhecidos como angiopatia amiloide cerebral (CAA – do inglês cerebral amyloid angiopathy); suprimir a inflamação vascular induzida por β A ou citocinas pró-

inflamatórias; estimular a produção de NO a partir de células endoteliais do cérebro e atrasar a fibrilação de β A (BUTTON et al., 2019; SINGH-MANOUX et al., 2008).

Goldman e colaboradores (2018) observaram também que níveis elevados de HDL em modelo transgênico de DA proporcionou um efeito protetor a BHE, e que tal ação poderia estar relacionada aos efeitos antioxidantes já apresentado pelo HDL, bem como seu efeito na restauração da função endotelial em condições hiperglicêmicas.

O colesterol periférico não é capaz de atravessar a BHE, portanto, o conteúdo de colesterol no SNC, é independente do conteúdo de colesterol periférico, ou seja, mesmo que o colesterol total periférico não sofra alteração, pode ocorrer alterações no conteúdo de colesterol cerebral, e estas também tem sido estudadas na incidência no desenvolvimento da DAe (MCFARLANE, KĘDZIORA-KORNATOWSKA, 2019). A administração de sinvastatina e alendronato, que são capazes de atravessar a BHE, têm sido associados a alterações na biossíntese de colesterol cerebral (CIBICKOVA et al., 2009).

O colesterol no SNC encontra-se principalmente na mielina e membrana plasmáticas de astrócitos e neurônios, para a manutenção de sua morfologia e transmissão sináptica (ZHANG, J. E LIU, 2015). Na membrana plasmática o colesterol encontra-se predominantemente nas regiões denominadas microdomínios de membranas ou *balsas lipídicas* (do inglês *lipids rafts*), e alterações de colesterol desses domínios têm sido associados a patogênese da DAe, pois uma pequena fração da APP, assim como as enzimas γ e β -secretase (BACE-1) se encontram nestes microdomínios (CHEN, T. Y. et al, 2006), portanto, estes estão envolvidos no processamento de APP e na geração do peptídeo β A.

Sugere-se que a enzima α -secretase, a qual previne a formação de β A, precisa de uma membrana com menos colesterol, como os domínios fosfolipídicos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, os quais são mais fluidos (KOJRO et al., 2001). Desse modo, o aumento do colesterol estaria causando um aumento da clivagem da APP aumentando a produção de β A, enquanto a sua redução cause uma redução da atividade da γ -secretase, reduzindo assim a deposição do peptídeo β A e a formação de placas (DE CHAVES E NARAYANASWAMI, 2008; KIVIPELTO e SOLOMON, 2006; VASTO, et al., 2008). Um trabalho realizado por Kalvodova e colaboradores (2005) demonstrou que o colesterol estimula a atividade proteolítica da

BACE-1. Em um estudo mais recente Zammer e colaboradores (2019) demonstraram em modelo animal de DAe induzido por STZ-ICV também um aumento da BACE-1, e que o tratamento com alendronato reverteu este acréscimo.

Neste contexto, foi analisado em fatias hipocampais o colesterol da membrana plasmática, presente predominantemente em microdomínios de membrana, extraído por MCD, o qual observamos um aumento no conteúdo de colesterol no grupo STZ comparado com o grupo Sham, e este acréscimo foi revertido com o tratamento com sinvastatina e alendronato. Também foi avaliado o conteúdo de colesterol que não foi extraído pelo MCD, o qual admitimos como celular, e este não apresentou alterações, porém quando realizamos a soma do colesterol extraído e não extraído (colesterol total), observamos que ocorre um aumento no grupo STZ quando comparado com o grupo Sham, no entanto, o tratamento com sinvastatina e alendronato não reverteu este efeito. As alterações no conteúdo de colesterol no SNC, principalmente de microdomínios poder estar correlacionada com a melhora do declínio cognitivo, em decorrência da relação do conteúdo de colesterol desses domínios e a síntese de β A, citada anteriormente.

Experimentos realizados em cultura celular primária de hipocampo tratadas com sinvastatina combinado com MCD, por exemplo, demonstraram uma diminuição dos níveis de β A (SIMONS, et al. 1998). Zammer e colaboradores (2019), também demonstraram num modelo de DAe induzido por STZ-ICV, um aumento da síntese de peptídeo β A₁₋₄₂, acompanhada da redução do conteúdo de BACE-1 no córtex e hipocampo dos animais analisados, e o tratamento com alendronato reverteu estes parâmetros.

Microdomínios de membrana também estão envolvidos na regulação da sinalização colinérgica, bem como a interação da acetilcolinesterase (AChE) - enzima responsável pela degradação de acetilcolina, um neurotransmissor importante nos processos de aprendizado e memória - e da síntese de β A. O níveis de colesterol total cerebral demonstrou correlação positiva com a quantidade de β A (REFOLO et al., 2001). E o acúmulo de peptídeo β A tem sido associado a uma redução da transmissão colinérgica, também característico da DAe, pois este demonstrou ter capacidade de aumentar a atividade da AChE in vitro e in vivo (HU et al. 2003; ZAMMER et al., 2019).

Níveis elevados de colesterol plasmático também demonstraram elevar a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo, juntamente com um

comprometimento de memória de curto prazo (MORERIA, et al., 2014). Já a redução dos níveis de colesterol sérico por meio da administração de estatinas levaram a uma redução da atividade da AChE, acompanhado de uma melhora na função de memória (GHODKE, POSTO, DEVI, 2012). Apesar de não estar elucidado como este evento ocorre, especula-se que a atividade da AChE é modulada pela alteração de colesterol e lipídeos de membrana (MORERIA, et al., 2014).

Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o modelo de DA induzido por STZ, também foi observado um aumento da atividade da AChE no hipocampo, o qual foi reduzido significativamente em animais tratados com estatinas (sinvastatina e pravastatina) (TRAMONTINA, A. C. et al., 2011). A administração de alendronato neste mesmo modelo de DAe, também realizou uma redução da atividade da AChE no hipocampo e córtex frontal acompanhado de uma redução na produção de β A (ZAMMER et al., 2019). Além disso, foi demonstrado que administração de sinvastatina e alendronato tem um efeito “*per se*”, reduzindo a atividade da AChE em córtex frontal de ratos (CIBICKOVA et al., 2007). Portanto, a atividade da AChE pode estar diretamente associada a capacidade da sinvastatina e do alendronato na reversão dos danos cognitivos causados pelo STZ.

Na DAe desde os estágios iniciais da doença também ocorrem outras alterações metabólicas, como a redução da utilização de glicose no cérebro e alterações das vias de sinalização da insulina, podendo ocorrer resistência à ação dessa molécula. Alterações estas semelhantes às que ocorrem em pacientes com DM, o que levou grupos de pesquisas a denominar a DA como “Diabetes tipo 3” (KRONER, 2009).

A infusão ICV de STZ tem sido descrita como um modelo que mimetiza bem as alterações encontradas no Diabetes tipo 3, como a alteração nas vias de sinalização da insulina, redução dos receptores de insulina (RI) e de IGF (DOS SANTOS et al, 2018; GRUNBLATT et al., 2007), bem como a redução da atividade de enzimas da via glicolítica (PLASCHKE E HOYER, 1993). A STZ é uma substância seletivamente tóxica para células β pancreáticas, que induz diabetes *mellitus* experimental em ratos após a administração periférica em altas doses (SZKUDELSKI, 2001), e ao ser infundida no SNC em doses subdiabetogênicas esta modifica o metabolismo da glicose sem alterar a glicemia sanguínea e produzir DM (NITSCH E HOYER, 1991).

A manutenção dos níveis de glicose é um fator importante na fisiologia do cérebro e para a estimulação da formação de memória (MESSIER, 2004; PASQUIER et al., 2006). Em nosso trabalho a administração de STZ, causou uma redução da captação de glicose, o que corroborou com trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS et al., 2018; TRAMONTINA, A. C. et al., 2011). DOS SANTOS e colaboradores (2018), também encontraram acompanhando à redução na captação de glicose uma resistência à insulina e déficit cognitivo nos animais que receberam a infusão de STZ-ICV. De particular importância, o tratamento com sinvastatina e alendronato reverteu a redução da captação de glicose induzida pelo STZ. A capacidade da sinvastatina de reverter a redução da utilização de glicose em fatias hipocâmpais já foi demonstrada anteriormente (TRAMONTINA, A. C. et al., 2011), e alguns trabalhos têm demonstrado que as estatinas têm um efeito benéfico em paciente com DM e em modelo animal da doença (OLAFSDOTIR et al., 2011; RIAD et al., 2007). O alendronato também tem sido associado a alterações no metabolismo de glicose e na redução da incidência de DM (CHAN et al., 2015; MAUGERI et al., 2002), porém nenhum trabalho demonstrou o efeito do alendronato sobre a captação de glicose em fatias hipocâmpais.

A glicose é a principal fonte de ATP e acetil-CoA, por meio da via glicolítica, no SNC (GRUNBLATT et al., 2007), e a redução na sua captação resulta na diminuição desses compostos, podendo assim prejudicar a síntese de acetilcolina (DE LA MONTE, 2012). Além disso, o comprometimento do metabolismo energético e o estresse oxidativo estimulam a atividade da AChE (TOTA et al., 2011). O déficit colinérgico na DA já é bem descrito e tem sido extensamente associado ao grau de déficit cognitivo (BOHNEN, et al. 2005), e como mencionado anteriormente a administração de sinvastatina e o alendronato em modelos animais da DA tem demonstrado reduzir a atividade da AChE. Além do decréscimo dos compostos energéticos, as altas concentrações de glicose circulantes podem levar à síntese de produto final de glicação avançada (AGE), que irá agir aumentando ainda mais a síntese de ERO, contribuindo para o estresse oxidativo.

O hipometabolismo de glicose cerebral, caracterizado por uma redução na captação e utilização da glicose, é considerado uma característica típica da DA (VAN DER VELPEN et al., 2019). O hipometabolismo de glicose na DA está associado a redução no consumo de glicose neuronal, alterações na estrutura funcional da BHE e

no fluxo da glicose através dos astrócitos. Uma vez que os astrócitos são as células responsáveis pela utilização da glicose na síntese de substratos metabólicos para o neurônio, como glutamina, GSH, colesterol e fonte energética, portanto os astrócitos desempenha um papel crítico nos processos fisiológicos do SNC, compreendendo a homeostase do glutamato, fluxo sanguíneo cerebral, excitabilidade e suporte metabólico dos neurônios, além do desenvolvimento e plasticidade sináptica (RODRÍGUEZ ARELLANO et al., 2015). No entanto, há contradições na contribuição os astrócitos na progressão de danos no SNC e em doenças neurodegenerativas como a DA (JALBERT et al., 2008). Porém, é encontrado em tecido cerebral de paciente com DA uma extensa gliose reativa, além da deposição de β A e os emaranhados fibrilares.

A reatividade dos astrócitos pode ser analisado pela síntese das proteínas ligante de cálcio S100B e a proteína estrutural GFAP. Já foi descrito a presença de astrócitos reativos na periferia das placas amiloides, e estes apresentaram uma maior expressão da proteína S100B, sugerindo o envolvimento desta proteína no desenvolvimento das placas, colaborando com a visão atual de que alterações astrogliais antecedem as alterações neuronais clássicas (LECLERC E ABULROB, 2013; MRAK E GRIFFIN, 2005; VAN ELDIK E GRIFFIN, 1994).

Com a intenção de analisarmos o envolvimento dos astrócitos nas alterações que ocorrem no modelo de demência por infusão de STZ-ICV, avaliamos o conteúdo das proteínas GFAP e S100B em hipocampus dos animais. O conteúdo da proteína GFAP, apresentou um aumento no hipocampo dos animais que receberam a injeção de STZ-ICV, efeito este já demonstrado em outros trabalhos que utilizaram este modelo de DAe, bem como em pacientes com doença (BIASIBETTI et al., 2017; PRICKAERTS, FAHRIG, BLOKLAND, 1999; RAI et al., 2014; RAO, RAPOPORT, KIM, 2011). Este efeito foi revertido nos animais tratados com sinvastatina e alendronato. O efeito das estatinas sobre o conteúdo de GFAP também foi observado em trabalhos com sinvastatina e atorvastatina, nos modelos de traumatismo craniano e de STZ-ICV (AL-ABBASSI et al., 2015; LI, B. et al., 2009). Acreditamos que esta seja a primeira demonstração do efeito do alendronato no conteúdo de GFAP.

O conteúdo da proteína S100B não demonstrou nenhuma alteração no hipocampo dos animais do grupo STZ, este resultado também foi encontrado por nosso grupo (BIASIBETTI et al., 2017; TRAMONTINA, A. C. et al. 2011), porém alguns

trabalhos tem demonstrado que ocorre um aumento da síntese de S100B em modelo STZ-ICV (DOS SANTOS et al., 2018; RODRIGUES, et al. 2009). Nossos achados reforçam a ideia de heterogeneidade das células gliais e/ou suas respostas frente a diferentes mudanças no ambiente celular. Os tratamentos com sinvastatina e alendronato demonstram uma tendência a redução da proteínas S100B hipocampal quando comparado com o grupo STZ. Estudos tem demonstrado que a administração de sinvastatina e alendronato inibem a produção de mediadores inflamatórios, tais como, ciclo-oxigenase 2 (COX2), interleucina-6 e 1β e TNF- α que são amplamente expressos por astrócitos reativos (MORRIS et al., 2018; ZAMMER et al., 2019).

Além dos marcadores de astrogliose citados anteriormente, foi investigado também a participação de outro marcador cerebral, diretamente dependente dos astrócitos, a glutamina sintetase (GS). A GS é uma enzima expressa no cérebro por astrócitos, e é responsável pela conversão de glutamato, um neurotransmissor, em glutamina, que será usada pelos neurônios para a renovação desse neurotransmissor.

Alguns trabalhos têm demonstrado uma redução da síntese e atividade da GS tanto na gênese da DA, quanto em modelos de STZ-ICV (BUTTERFIELD, 2002; DOS SANTOS et al., 2018; TRAMONTINA, A. C. et al., 2011). No entanto, em nosso trabalho a administração de STZ-ICV demonstrou apenas uma tendência a redução da atividade da GS. No grupo tratado com sinvastatina a atividade da GS demonstrou uma tendência a reversão do efeito da STZ, sugerindo, portanto, que a sinvastatina tem a capacidade de reverter tal efeito, resultado este também demonstrado anteriormente em modelo STZ-ICV por Tramontina e colaboradores (2011). Por outro lado, não encontramos resultados similares no tratamento com alendronato. Nenhum trabalho anterior mostrou os efeitos do alendronato na atividade da GS.

A atividade da GS é diretamente modulada por NO (KOSENKO et al, 2003), e a produção de NO no SNC em resposta à inflamação ocorre em astrócitos, a partir da ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e trabalhos tem demonstrado que o STZ-ICV causa um aumento na produção de NO no hipocampo, e que a sinvastatina foi capaz de prevenir este efeito (TRAMONTINA, A. C. et al., 2011). As estatinas são capazes de reduzir a atividade da iNOS, o que seria decorrente da redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , levando então a uma redução na produção de NO (HSIEH et al., 2008), o que explicaria o efeito das estatinas sobre a atividade da GS, pois efeito semelhante foi demonstrado pelo nosso grupo utilizando

AG, modulando o NO conseqüentemente causando a reversão na redução da GS por STZ (RODRIGUES et al., 2009).

O modelo de DA esporádica induzido por injeção ICV de STZ, além de desenvolver alterações cognitivas, alterações metabólicas, com redução da utilização da glicose e alterações nas vias de sinalização da insulina (GRUNBLATT et al., 2007; SALKIVIC-PETRISIC et al., 2006), também leva ao desenvolvimento de estresse oxidativo (SHARMA E GUPTA, 2001; TAHIROVIC et al., 2007).

O STZ leva a uma redução da capacidade antioxidante das células, tal efeito foi demonstrado por nosso resultado, através da redução do conteúdo de GSH nos hipocampos dos animais do grupo STZ, corroborando com resultados encontrados por nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS, et al., 2018, TRAMONTINA, A. C. et al., 2011), este efeito se deve provavelmente por alterações na síntese, reciclagem astrocitária e no tráfego de GSH entre os astrócitos e os neurônios, aumentando a susceptibilidade das células neuronais a danos e a morte (DRINGEN, 2000; FERNANDEZ et al., 2012). O tratamento dos animais com sinvastatina e alendronato foi capaz de reverter a redução do conteúdo de GSH induzido pela STZ. Resulta semelhante também foi encontrado na administração de sinvastatina por Tramontina e colaboradores (2011).

O efeito das estatinas na síntese de GSH já foi demonstrado em modelo de DA em cachorros, neste caso foi realizado tratamento com atorvastatina, o aumento no conteúdo de GSH foi diretamente correlacionado ao aumento nos níveis da heme oxigenase-1 (OH-1) (BUTTERFIELD et al., 2012), pois a OH-1 e a γ -glutamilcisteína sintetase, enzima chave da produção de GSH, tem sua expressão mediada por Nrf2, e já foram demonstrados que as estatinas estimulam este fator (HSIEH, et al., 2008). Rajasekar e colaboradores (2017), demonstrou que ocorreu uma redução da expressão do Nrf2 induzido por infusão ICV de STZ, associando este fator a um comprometimento da memória.

A ocorrência de estresse oxidativo, além da redução da GSH, também pode ser observado pelo aumento na produção de ERO no hipocampo dos animais STZ-ICV, que foi analisado neste trabalho pela técnica de DCF-DA. A administração oral de sinvastatina e o alendronato reduziram parcialmente o efeito da STZ. Outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, também demonstrou um aumento de ERO no hipocampo no modelo de demência induzido por STZ, e a capacidade da

sinvastatina em reverter totalmente este efeito (TRAMONTINA, A. C. et al, 2011). Aparentemente nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito do alendronato no conteúdo de GSH hipocampal.

Na literatura tem sido demonstrado a ação antioxidante da sinvastatina, por meio do aumento da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK – do inglês AMP-activated protein kinase); regulação positiva enzimática e não enzimática, como a CAT e a SOD, bem como a tioredoxina e GSH e inibição de proteína da família da GTPases (MORRIS et al., 2018). Assim como a sinvastatina o alendronato também demonstrou ter ação antioxidante num modelo animal de STZ-ICV, reduzindo NO e aumentando a atividade das enzimas CAT e SOD no hipocampo (ZAMMER et al., 2019).

O efeito antioxidante do alendronato e da sinvastatina também pode estar ocorrendo pela alteração na ativação da enzima NAPH oxigenase, enzima esta responsável pela síntese de ERO. Um fator importante para esta ativação da NADPH oxigenase é a Rac, uma proteína constituinte da família das GTPases. A isoprenilação da Rac é afetada pela redução na produção de isoprenóides intermediários da via do mevalonato pela ação das estatinas e dos bisfosfonatos, tais como o FPP e o GGPP (CORDLE et al., 2005; HOFF et al., 2008; LIAO; LAUFS, 2005). A redução da isoprenilação desta proteína pode estar diminuindo a sua função e conseqüentemente estar reduzindo a atividade da enzima NADPH oxidase, e levando há uma menor produção de ERO.

Os astrócitos contribuem para à produção de importantes fatores neurotróficos do SNC, dentre estes, destaca-se o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma proteína dimérica, considerada a neurotrofina mais abundante do SNC, amplamente expressa em várias regiões do cérebro, incluindo hipocampo, córtex cerebral, amígdala, e cerebelo de mamíferos (ADACHI et al., 2013). O BDNF desempenha um papel crítico no desenvolvimento, sobrevivência, e manutenção de neurônios no SNC, plasticidade neuronal, e na cognição e memória (ALLEN, S. J. et al., 2013; TONG et al., 2012). Estes efeitos são mediados através de interações com a isoforma catalítica de alta afinidade e comprimento total do receptor da cinase B (TrkB) relacionada à tropomiosina (ALLEN, S. J. et al., 2013).

Os níveis de BDNF podem ser regulados por astrócitos, estes capturam o seu precursor, reciclam-o e os liberam na forma madura na fenda sináptica, contribuindo

para a regulação da plasticidade neuronal (BERGAMI et al., 2008; HAYDON, CAMIGNOTO, 2006). A desregulação de fatores tróficos no SNC, também é uma característica importante da DA (COUNTS et al., 2004). Estudos anteriores mostram uma redução da expressão de BDNF no cérebro, especialmente no hipocampo, tanto em modelo transgênico da DA induzido por βA_{1-42} , quanto no modelo induzido por STZ (ZHANG, L. et al., 2015; AFSHAR et al., 2018). Alguns estudos mostraram que $A\beta$ pode inibir a expressão de BDNF (ZHENG, Z., SABIRZHANOV, KEIFER, 2010), resultando na indução ao acúmulo de oligômeros βA solúveis, e que a redução da sua sinalização leva a plasticidade sináptica defeituosa, resultando em um prejuízo cognitivo e de memória (WITTY et al. 2012).

A expressão de BDNF tanto no hipocampo, quanto no LCR, dos animais que receberam injeção STZ-ICV e foram tratados apenas com veículo, não apresentou alteração, resultados este também encontrados em modelos animais transgênico da DA (NUNES et al., 2015; STUART et al., 2017), no entanto, os tratamentos com sinvastatina ou alendronato, demonstraram uma tendência ao aumento na expressão de BDNF, tanto no hipocampo quanto no LCR. Outros grupos também demonstraram que a sinvastatina aumenta a expressão de BDNF no hipocampo (HAN et al., 2012; WU et al., 2008, WANG et al., 2015). A sinvastatina e o alendronato podem estar realizando uma ação protetora mediada por regulação positiva de BDNF, protegendo os neurônios da neuroinflamação induzida por diferentes mediadores inflamatórios, como o $TNF-\alpha$ e reduzindo o acúmulo de ERO (PRAKASH E KUMAR, 2014).

Um trabalho utilizando um modelo animal de DA, demonstrou que as estatinas também têm exibido um efeito neurotrófico, estimulando a expressão de neurotrofinas, como o BDNF, resultando numa melhora no aprendizado e memória, independente da via do mevalonato e sim pela via $PPAR\alpha$ (receptores alfas ativados por proliferadores de peroxissoma) (ROY et al. 2015). Não foi encontrada trabalhos sobre a ação dos bisfosfonato sobre a síntese de BDNF.

Nesse trabalho observamos experimentalmente que a administração de sinvastatina e alendronato, fármacos que inibem enzimas da via de biossíntese de colesterol, bem como de isoprenóides, proporciona uma melhora cognitiva num modelo animal de DAe, juntamente com a reversão de parâmetros neurobioquímicos e estimulação da proteção neuronal e glial por fatores de crescimento como o BDNF.

Os parâmetros alterados no modelo utilizado no trabalho também tem sido descrito em pacientes com DAe, desse modo, apesar de restritos serem os estudos sobre a ação da sinvastatina e, principalmente do alendronato na fisiopatologia da DAe, acreditamos que estes compostos possuem um papel neuroprotetor, e que o seu uso pode ajudar na terapia dessa doença. Porém, mais estudos fazem-se necessários.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que a administração oral de Alendronato, bem como, de Sinvastatina, apresentam a capacidade de reverterem o prejuízo de aprendizado e memória apresentado pelo modelo de DAe induzido pela infusão ICV-STZ, podendo este efeito ser em decorrência da atenuação das alterações no metabolismo de glicose, neuroinflamação e do estresse oxidativo.

Os níveis de colesterol do SNC encontraram-se alterados no modelo de demência induzido por ICV-STZ, demonstrando o possível envolvimento do mesmo na patogênese da DAe, uma vez que junto ao seu restabelecimento pela administração de sinvastatina e alendronato, foi acompanhado da reversão do déficit cognitivo apresentados pelos animais no modelo.

As descobertas discutidas neste trabalho fornecem uma breve visão do modo de ação do alendronato e da sinvastatina, e apesar da necessidade de uma investigação mais aprofundada para elucidar os mecanismos celulares e moleculares da ação desses fármacos, os mesmos se mostram promissores para prevenir os sintomas e retardar a progressão da DAe.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar os efeitos da sinvastatina e do alendronato em modelo de doença de Alzheimer induzido por estreptozotocina intracerebroventricular nos seguintes parâmetros:

- Atividade da acetilcolinesterase;
- Marcadores de microdomínios e sondas de colesterol;
- Conteúdo de ApoE;
- Farnesilação de proteínas;
- Conteúdo de beta-amiloide;
- Conteúdo de RAGE e AGEs;
- Conteúdo de BACE-1;
- Conteúdo de TNF- α ,
- Analisar os efeitos observados por período maior.

REFERÊNCIAS

ABRAZ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. Disponível em: <<http://abraz.org.br>> Acesso em: 19/05/19.

ADACHI, N. et al. Phencyclidine-induced decrease of synaptic connectivity via inhibition of BDNF secretion in cultured cortical neurons. **Cereb Cortex**, 23, 847–858, 2013.

ADAMI, S. et al. Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. **J Bone Miner Res**, 15: 599-604, 2000.

AFSHAR, S. et al. The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory, hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats. **Psychopharmacology**, 235(10):2809-2822, 2018.

AL-ABBASSI, M. G. et al. Effects of Atorvastatin and Streptozocin on Immunohistochemical Markers in Hippocampus of Male Adult Rats. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, 3(2), 01-09, 2015.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. **Nature**, 457(7230):675-7, 2009.

ALLEN, S.J. et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. **Pharmacol Ther**, 138(2):155-75, 2013.

ALLEN, S., et al. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. **Methods Cell Sci**, 22(4):305-12, 2000.

ANCELIN, M. L. et al. Lipid lowering agents, cognitive decline, and dementia: the three-city study. **J Alzheimers Dis**, 30: 629–637, 2012.

ARFA - Agência de Regulação e Supervisão dos Produtos Farmacêuticos e Alimentares. Bifosfonatos: Relatos de Segurança. **ARFA-DRF**, 11, pp. 1-2, 2013.

ARMSTRONG, R. A. What causes alzheimer's disease?. **Polish Academy of Sciences**, 51(3):169-88, 2013.

ATTWELL, D.; IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. **Trends Neurosci**, 25(12): 621-5, 2002.

ATZMON, G. Plasma HDL Levels Highly Correlate With Cognitive Function in Exceptional Longevity. **J. Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 57(11):M712-M715, 2002.

BARMAN, S.; NAYAK, D. P. Lipid rafts disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MCDCK cells. **Journal of Virology**, 18(22) – 1269-12178, 2007.

- BARONE, E. et al. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: it's time for reconciliation. **Neurobiology of Disease**, 62:144-59, 2014.
- BASTIAANSE, E. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. **Cardiovascular Research**, 33(2):272–283, 1997.
- BEDSE, G.; DOMENICO, F. D.; SERVIDDIO, G.; CASSANO, T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. **Front Neurosci.**, 9(204), 2015.
- BENITO-LEON, J. et al. Statins and cognitive functioning in the elderly: a population-based study. *J Alzheimers Dis* 21, 95–102, 2010.
- BIASIBETTI, R., et al. "Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex." **Behav Brain Res**, 316: 205-214, 2017.
- BOHNEN, N.I. et al. Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, 380:127-132, 2005.
- BRAAK, E. et al. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since **A. Alzheimer?** **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 249(3): 14-22, 1999.
- BUFFO, A., ROLANDO, C., CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain : Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, 79, 77–89, 2010.
- BURGER, K.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of receptor function by cholesterol. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, 57:1577–1592, 2000.
- BUTTERFIELD, D. A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. **Free Radic Res**, 36(12): 1307-13, 2002.
- BUTTERFIELD, D.A. et al. Atorvastatin treatment in a dog preclinical model of Alzheimer's disease leads to up-regulation of haem oxygenase-1 and is associated with reduced oxidative stress in brain. **Int J Neuropsychopharmacol**, 15(7):981-7, 2012.
- BUTTERFIELD, D.A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nat Rev Neurosci.**; 20(3):148-160, 2016.
- BUTTON, E. B. et al. HDL from an Alzheimer's disease perspective. *Curr Opin Lipidol*, 30(3):224-234, 2019.
- CALABRESE, V. et al. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, 8(11-12):1975-86, 2006.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, 10(1), 31–39, 2016.

CANEVARI, L.; CLARK, J.B. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. **Neurochem Res**, 32:739-750, 2007.

CANDORE, G. et al. Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: therapeutic implications. **Rejuvenation Res**, 13:301-313, 2010.

CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **Lancet**, 363(9415):1139–46, 2004.

CHAN, D.C. et al. The Use of Alendronate Is Associated with a Decreased Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus—A Population-Based Cohort Study in Taiwan. **PLoS ONE**, 0(4):e0123279, 2015.

CHEN, H.K. et al. Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for Alzheimer disease. **The Journal of biological chemistry**, 286(7):5215–21, 2011.

CHEN, T.Y. et al. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. **Biochem Biophys Res Commun**, 342:266-272. 30, 2006.

CHEN, Y. L. et al. Changes in astrocyte functional markers and β -amyloid metabolism-related proteins in the early stages of hypercholesterolemia. **Neuroscience** 316, 178–191, 2016.

CHU, C. et al. Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 8, 5804, 2018.

CIBICKOVA, L, et al. The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. **Steroids**, 74:13-19, 2009.

CIBICKOVA, L, et al. Differential Effects of Statins and Alendronate on Cholinesterases in Serum and Brain of Rats. **Physiol. Res.** 56:765-770, 2007.

CORDER, E. H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, 261(5123):921–923, 1993.

CORDLE, A. et al. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. **J Biol Chem**, 280:34202-34209, 2005.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, 25:295–301, 2002.

COUNTS, S. E. et al. Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. **Annals of neurology**. 56(4):520-31, 2004.

COXON, F. P.; THOMPSON, K.; ROGERS, M.J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. **Curr Opin Pharmacol**, 6:307–312, 2006.

CRAFT, S. et al. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. **Ann N Y Acad Sci**, 903:222-228, 2000.

CUDKOWICZ, M. E. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of Procysteine in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, 52(7):1492– 1494, 1999.

CUNNANE, S. et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition**, 27(1):3–20, 2011.

DE ALMEIDA, L. M. et al. Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. **Cell Mol Neurobiol**, 27:661-668, 2007.

DE CHAVES, E. P.; NARAYANASWAMI, V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. **Future Lipidol**, 3:505-530, 2008.

DE LA MONTE, S. M.; NEUSNER, A.; CHU, J.; LAWTON, M. Epidemiological trends strongly suggest exposures as etiologic agents in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease, diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. **J Alzheimers Dis**, 17:519-529, 2009.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, 2(6):1101-13, 2008.

DE LA MONTE, S.M. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res.**, 9:35-66, 2012.

DE SOUZA, D.F et al. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. **J Neuroimmunol**, 206:52-7, 2009.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current Opinion in Lipidology**, 12(2):105–112, 2001.

DO, T. M. et al. Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, 81:311–317, 2014.

DOMINICZAK, M. H.; CASLAKE, M. J. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. **Ann Clin Biochem.**; 48(Pt 6):498-515, 2011.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microsc Res Tech**, 60:540-551, 2003.

DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochim Biophys Acta**, 1793:1008-1022, 2009.

DOS SANTOS, J. P.A.; VIZUETE, A.F.; GONÇALVES, C. A. Calcineurin-Mediated Hippocampal Inflammatory Alterations in Streptozotocin-Induced Model of Dementia. **Mol Neurobiol.**, 2019.

DOS SANTOS, J.P.A. et al. Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 61(1):237-249, 2018.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, 62(6):649-71, Dec 2000.

DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. **News Physiol Sci**, 16:71-6, 2001.

DURAN-ANIOTZ, C.; HETZ, C. Glucose Metabolism: A Sweet Relief of Alzheimer's Disease. **Curr Biol.**; 26(17):R806-9, 2016.

ECKERT, G.P.; WOOD, W.G.; MULLER, W.E. Statins: drugs for Alzheimer's disease? **J Neural Transm**, 112:1057-1071, 2005.

EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113(11), 1709–1715, 2006.

EID, T. et al. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus : possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. **Lancet**, 363, 28–37, 2004.

ELLWARDT, E., ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Exp Neurol**. 262, 8–17, 2014.

ENG, L.F., YU, A.C.H., LEE, Y.L. Astrocytic response to injury. **Brain Res**, 94, 353–365, 1992.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1 Behavioral data. **Behavioral Brain Research**, 31:47-59, 1988.

EVANS, R. M. et al. Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease: A populationbased study of African Americans. **Neurology**, 54 9(1):240–242, 2000.

FERNANDEZ, A. M. et al. Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. **Mol Psychiatry**, 17(7):705-18, Jul 2012.

FOLCH, J. et al. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. **Neural Plasticity**, v. 2016, 8501693, 2016.

FREEMANTLE, E. et al. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, 75(3): 213–220, 2006.

FRIEDMAN, A., DINGLEDINE, R. Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. **Epilepsia** 52, 33–39, 2011.

FYNG, K. Y. et al. SR-BI Mediated Transcytosis of HDL in Brain Microvascular Endothelial Cells Is Independent of Caveolin, Clathrin, and PDZK1. **Front Physiol**, 8:841, 2017.

GAMBA, P. et al. A Crosstalk Between Brain Cholesterol Oxidation and Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, 13:556, 2019.

GEROZISSIS, K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. **Cell Mol Neurobiol**, 23(1):1-25, 2003.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell** 140, 918–934, 2010.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun**, 120(3):885-90, May 16 1984.

GOLDMAN, S. E. et al. High-fat diet protects the blood–brain barrier in an Alzheimer's disease mouse model. **Aging Cell.**, 17(5):e12818, 2018.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V.P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.**, São Paulo, 27(77)-61-84, 2013.

GONÇALVES, C.A.; LEITE, M.C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clin Biochem**, 41:755-763, 2008.

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

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S.S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nat Rev Immunol**, 6:358-370, 2006.

GRUNBLATT, E. et al. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem**, 101:757-770, 2007.

GRUNDKE-IQBAL, I. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83(13): 4913-7, Jul 1986.

GUERRA, M.C. et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocytes cultures from rats. **J Neuinflammation**, 8:128, 2011.

HAN, X. et al. Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat. **Neurosci. Lett**, 521, 136–141, 2012.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 1992.

HEVERIN, M. et al. 27-hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. **Behav Brain Res**, 278, 356-9, 2015.

HOFF, G.P. et al. Isoprenoid quantitation in human brain tissue: a validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl-(FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). **Anal Bioanal Chem**; 392(4):673–80, 2008.

HOL, E.M., PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 121–130, 2015.

HOYER, S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **Eur J Pharmacol**, 490(1-3):115-25, 2004.

HOYER, S.; LEE, S.K.; LOFFLER, T.; SCHLIEBS, R. Inhibition of the neuronal insulin receptor. An in vivo model for sporadic Alzheimer disease? **Ann N Y Acad Sci**, 920, 256-258, 2000.

HSIEH, C. H. et al. Simvastatin-induced heme oxygenase-1 increases apoptosis of Neuro 2A cells in response to glucose deprivation. **Toxicol Sci**, 101:112-121, 2008.

HU, X. et al. Simvastatin inhibits hippocampal cell apoptosis in Alzheimer's disease. **Experimental and therapeutic medicine**, 15: 1795-1802, 2018

HUTTNER, W. B.; ZIMMERBERG, J. Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission: Commentary. **Current Opinion in Cell Biology**, 13(4):478-84, 2001.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 19/05/2019.

IRVINE, G. B. et al. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Molecular Medicine*, Nova York, v. 14, no. 7-8, p. 451-464, 2008.

JACK, C. R. et al. Update on the magnetic resonance imaging core of the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, 6(3):212–220, 2010.

JALBERT, J. J.; DAIELLO, L. A.; LAPANE, K. L. Dementia of the Alzheimer type. **Epidemiol Rev**, 30: 15-34, 2008.

JESSEN, K. R. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36(10): 1861–1867, 2004.

KARAMUSTAFA, F.; CELEBI, N. Bisphosphonates and alendronate. **J Pharm Sci**, 31:31-42, 2006.

KIVIPELTO, M.; SOLOMON, A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. **Acta Neurol Scand Suppl**, 185:50-57, 2006.

KIVIPELTO, M. et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life **Alzheimer disease**. *Ann Intern Med*, 137(3): 149-55, 2002.

KIVIPELTO, M. et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. **BMJ**, 322(7300): 1447-51, Jun 16 2001.

KOJRO, E. et al. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98:5815-5820. 31, 2001.

KOSENKO, E, et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. **Neurochem Int**, 43:493-499, 2003.

KRONER, Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? **Altern Med Rev**, 14:373-379, 2009.

KUO, Y. M. et al. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. **Biochem Biophys Res Commun**, 252 (3): 711-5, Nov 27 1998.

KURINAMI, H. 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**, 21:531-537, 2008.

LECLERC, B.; ABULROB, A. Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in Alzheimer's disease. **ScientificWorldJournal**, p. 589308, 2013.

LEDESMA, M.D.; DOTTI, C.G. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. **Frontiers in Bioscience**, 181-194, 2012.

LEE, Y. J. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res**, 33 (10):1539-56, 2010.

LENNERNAS, H.; FAGER, G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. **Clinical Pharmacokinetics**, 32: 403-425, 1997.

LEITE, M.C.; et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of Neuroscience Methods* 169:93–99, 2008.

LEVY, J. A.; CHELUNE, G. J. Cognitive-behavioral profiles of neurodegenerative dementias: beyond Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 20, 227-238, 2007.

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

LI, L. et al. Isoprenoids and Related Pharmacological Interventions: Potential Application in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46(1):64–77, 2012.

LI, B. et al. Simvastatin attenuates microglia, astrocyte activation and decreases IL-1 β Level following traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 65(1): 179–186, 2009.

LOPES, J.B., et al. Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 21:964–966, 2015.

LUCHSINGER, J.A.; MAYEUX, R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 6:261-266, 2004.

MANN, KM, et al. Independent effects of APOE on cholesterol metabolism and brain A β levels in an Alzheimer disease mouse model. *Hum. Mol. Genet*, 13(7):1959-1968, 2004.

MARAGAKIS, N.J., ROTHSTEIN, J.D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2(12), 679–689, 2006.

MATTSON, M.P. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med*, 139:441–444, 2003a.

MATTSON, M.P.; CHAN, S.L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 34:385-397, 2003b.

MAUGERI, D. et al. Alendronate reduces the daily consumption of insulin (DCI) in patients with senile type I diabetes and osteoporosis. *Arch Gerontol Geriatr*, 34(2):117–22, 2002.

MAXFIELD, F. R.; VAN MEER, G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, 22(4):422-9, 2010.

MCFARLAND, A. J. et al. Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Statins in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, 15(11):20607-37, 2014.

MCFARLANE, O.; KĘDZIORA-KORNATOWSKA, K. Cholesterol and Dementia: A Long and Complicated Relationship. *Current Aging Science*, 2019.

MCMACKIN, R. et al. Measuring network disruption in neurodegenerative diseases: New approaches using signal analysis *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*; **90**:1011-1020, 2019.

MINET, R., et al. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin Chim Acta*, 268:121-132, 1997.

MONTAGNAMI, A. et al. Changes in serum HDL and LDL cholesterol in patients with Paget's bone disease treated with pamidronate. *Bone*, 32(1):15-9, 2003.

MOREIRA, E. L. G. et al. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: Up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *Journal of Neural Transmission*, 121(4):415– 426, 2014.

MOREIRA, E. L. G. et al. Cholesterol Levels and Cognitive Impairments. *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*, 743–751, 2015.

MORGAN, D. H. et al. Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 307(12):E1125-30, 2014.

MORI, T. et al. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60:778-785, 2001.

MORRIS, G. et al. Leaky brain in neurological and psychiatric disorders: Drivers and consequences. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 52 (10), 924–948, 2018.

MRAK, R.E.; GRIFFINBC, W.S. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 22:915-922, 2001.

MRAK, R.E.; GRIFFIN, W.S. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 26:349-354, 2005.

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

MUNOZ, D. G.; FELDMAN, H. Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ*, 162(1):65-72 , 2000.

NAIDU, A.; XU, Q.; CATALANO, R.; CORDELL, B. Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res*. 958(1):100-11, 2002.

NAMPOOTHIRI, M. et al. Modulatory role of simvastatin against aluminium chloride-induced behavioural and biochemical changes in rats. **Behavioural neurology**, 2015:1-9, 2015.

NIH Publication. Alzheimer's Disease – Fact Sheet. **Alzheimer's Disease Education and Referral (ADEAR) Center**. No. 11-6423 8, 2012.

NOVAK, E. M.; BYDLOWSKI, S. P. Biologia molecular das dislipidemias: variacao genetica das apolipoproteinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 67(6), 411-7, 1996.

NUNES, M.A. et al. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PloS one**, 10(11):e0142267, 2015.

NUSRAT, A. et al. Tight junctions are membrane microdomains. **Journal of cell science**, 113(1):1771–1781, 2000.

OLIVEIRA, M.T.J.S. **Estudo mostra Brasil como segundo país em prevalência de demência**. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/estudo-mostra-brasil-como-segundo-pais-em-prevalencia-de-demencia/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE | Demencia, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em 19/05/2019.

OSBORN, L. M., et al. Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, 144, 121–141, 2016.

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Sci Adv**, 2(7):e1600584, 2016.

PARATCHA, G.; IBANEZ, C. F. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 5, p. 542-9, 2002.

PARK, C. R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. **Neurosci Biobehav Rev**, 25(4): 311-23, 2001.

PATRICK, G. N. et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 615–622, 9 dez. 1999.
PAXINOS. The Rat Nervous System. Academic Press, 1997.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, 38:375-382, 2005.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glia modulates synaptic transmission. **Brain Research Reviews**, 63(1-2):93–102, 2010.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, 83:346-356.

PFRIEGER, F. Role of cholesterol in synapse formation and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1610(2):271–280, 2003a.

PFRIEGER, F.W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cell Mol Life Sci**, 60:1158-1171, 2003b.

PIERMARTIRI, T.C., et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Exp Neurol**, 226:274-284, 2010.

PLASCHKE, K.; HOYER, S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. **Int J Dev Neurosci**, 11:477-483, 1993.

PRAKASH, A.; KUMAR, A. Implicating the role of lycopene in restoration of mitochondrial enzymes and BDNF levels in β -amyloid induced Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, 741, 104–111, 2014.

PRICKAERTS, J.; FAHRIG, T.; BLOKLAND, A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. **Behavioural Brain Research**, 102(1-2):73–88, 1999.

RAI, S. et al. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 117:104–117, 2014.

RAI, S. et al. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. **J. Neuroimmunol.** 254 (1–2), 1–9, 2013.

RAJASEKAR, N.; NATH, C.; HANIF, K.; SHUKLA, R. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. **Life Sci**, 15; 173:1-10, 2017.

RAO, J. S.; RAPOPORT, S. I.; KIM, H-W. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. **Transl Psychiatry**, 1(8), e31, 2011.

REFOLO, L.M. et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol. Dis.** 8:890–899, 2001.

REIMAN, E. M. et al. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. **The New England Journal of Medicine**, 334(12):752–758, 1996.

RIAD, A. et al. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol**, 569:204-211, 2007.

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

RIVERA, E.J., et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. **J Alzheimers Dis**, 8: 247-268, 2005.

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J.; PARPURA, V.; ZOREC, R.; VERKHRATSKY, A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 323:170-82, 2016.

RODRIGUES, L, et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. **J Alzheimers Dis**, 17:193-202, 2009.

ROSES, A. D. On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and common late-onset Alzheimer disease. **J Alzheimers Dis**. 9(3 Suppl):361-6, 2006.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy Research and Technique**, 60(6):614–632, 2003.

ROY, A et al. HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPAR α to Upregulate Neurotrophin Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. **Cell Metabolism**, 22, 253–265, 2015.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl**, 72:217- 33, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **J Neural Transm**, 120(1):233-52, 2013.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. **J Alzheimers Dis**, 18(4):729-50, 2009.

SATO, N.; MORISHITA, R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of β -amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front. Aging Neurosci*. 7:199, 2015.

SCHACHTER, A. S.; DAVIS, K. L. Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, 2(2):91-100, Jun 2000.

SCHUCK, P. et al. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. **Neurosci Res**, 57(2):277–88, 2007.

SCHULTZ, B. G.; PATTEN, D. K.; BERLAU, D. J. The role of statins in both cognitive impairment and protection against dementia: a tale of two mechanisms. **Transl Neurodegener**; 7: 5, 2018.

SELKOE, D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, 298:789-791, 2002.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 20(4):665-79, 2006.

SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neurosci Biobehav Rev**, 24(8):855-72, 2000.

SHAGAM, J. Y. The many faces of dementia. **Radiol Technol**, 81:153-168, 2009.

SHARMA, M.; GUPTA, Y.K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, 68:1021-1029, 2001.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends Neurosci**, 27(8):489-95, 2004.

SINGH-MANOUX, A. et al. Low HDL cholesterol is a risk factor for deficit and decline in memory in midlife: the Whitehall II study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 28:1556–1562, 2008.

SIMONS, M. et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of B-amyloid in hippocampal neurons. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 95:6460-6464, 1998.

SINGH, P.P.; SINGH, M.; MASTANA, S.S. Genetic variation of apolipoproteins in North Indians. **Hum. Biol**, 74 (5): 673–82, 2002.

SLIWIŃSKI, L. et al. Effect of administration of alendronate sodium and retinol on the mechanical properties of the femur in ovariectomized rats. **Pol J Pharmacol.**, 56(6):817-24, 2004.

SMALL, G. W. et al. Predictors of cognitive change in middle-aged and older adults with memory loss. **The American Journal of Psychiatry**, 152(12): 1757–1764, 1995.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**. 32, 638–647, 2009.

SOLOMON, A. et al. Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. **Neurology**, v. 68, n. 10, p. 751-6, 2007.

SPARKS, D. L. et al. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 11(6):601–607, 1990.

SPARKS, D. L. et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. **Experimental neurology**, 126(1):88–94, 1994.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis**, 7(1):63-80, 2005.

STEFANI, M.; LIGURI, G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. **Curr Alzheimer Res**, 6:15-29, 2009.

STUART, K.E. et al. Mid-life environmental enrichment increases synaptic density in CA1 in a mouse model of Aβ-associated pathology and positively influences synaptic and cognitive health in healthy ageing. **The Journal of comparative neurology**, 525(8):1797-810, 2017.

SULTANA, R. et al. Proteomic identification of specifically carbonylated brain proteins in APP(NLh)/APP(NLh)xPS-1(P264L)/PS-1(P264L) human double mutant knock-in mice model of Alzheimer disease as a function of age. **J Proteomics**, 74:2430-2440, 2011.

TAKECHI, R. et al. Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wildtype mice induced by saturated fat or cholesterol feeding. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 40(1): 45–52, 2013.

TAHIROVIC, I. et al. Reduced brain antioxidant capacity in rat models of betacytotoxic-induced experimental sporadic Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Neurochem Res**, 32:1709-1717, 2007.

TANSEY, M. G.; MCCOY, M. K.; FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**, 208 (1): 1-25, 2007.

THIELE, C.; HANNAH, M. J.; FAHRENHOLZ, F.; HUTTNER, W. B. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nature cell biology**, 2(1): 42–49, 2000.

TONG, L. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Synaptic Plasticity Is Suppressed by Interleukin-1β via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **J Neurosci**, 32(49): 17714–17724, 2012.

TRAMONTINA, A.C. et al. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological**, 32(6): 1580-3, 2008.

TRAMONTINA, A.C. et al. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. **J Neural Transm (Vienna)**, 118(11):1641-9, 2011.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, 162:282-286, 2007.

TRAMONTINA, F. et al. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. **Cell Mol Neurobiol**, 22:373- 378, 2002.

VAN ELDIK, L.J.; WAINWRIGHT, M.S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restor Neurol Neurosci**, 21:97-108, 2003.

VAN ELDIK, L.J.; GRIFFIN, W.S. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. **Biochim Biophys Acta**, 1223:398-403, 1994.

VAN DER MOST, P.J. et al. Statins: mechanisms of neuroprotection. **Prog Neurobiol**, 88:64-75, 2009.

VAN DER VELPEN, V. et al. Systemic and central nervous system metabolic alterations in Alzheimer's disease. **Alz Res Therapy** 11, 93, 2019.

VASTO, S. et al. Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. **Brain Res Rev**, 58:96-105, 2008.

VERKHRATSKY, A. et al. Astrocytes in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, 7:399-412, 2010.

VICENTE, E.; et al. S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 34:1126–1130, 2007.

VICENTE, E. et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Brain Res**, 1251: 204-12, 2009.

WAHEED, A. A.; FREED, E. O. The role of lipids in retrovirus replication. **Viruses**, 2(5): 1146–1180, 2010.

WANG, X. et al. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 109 Suppl 1:153-159, 2009.

WANG, C. et al., Simvastatin prevents β -amyloid_{25–35}-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through α 7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. **Neuropharmacology**, 97:122-132, 2015.

WANMASAE, S.; SIRINTRONSOPON, W.; PORNTADAVITY, S.; JEENDUANG, N. The effect of APOE, CETP, and PCSK9 polymorphisms on simvastatin response in Thai hypercholesterolemic patients. **Cardiovasc Ther.**, 35(6), 2017.

WHITAKER, M.; GUO, J.; KEHOE, T.; BENSON, G. Bisphosphonates for osteoporosis- where do we go from here? **N Engl J Med**, 366(22):2048–51, 2012.

WILLEY, J. Z.; ELKIND, M. S. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of central nervous system diseases. **Arch Neurol**, 67:1062-1067, 2010.

WITTY, C.F.; GARDELLA, L.P.; PEREZ, M.C.; DANIEL, J.M. Short-term estradiol administration in aging ovariectomized rats provides lasting benefits for memory and the hippocampus: a role for insulin-like growthfactor-I. **Endocrinology**, 154:842–852, 2012.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and the blood-brain barrier. **Curr Pharm Des**, 9(10):795-800, 2003.

WU, H. et al. Simvastatin-Mediated Upregulation of VEGF and BDNF, Activation of the PI3K/Akt Pathway, and Increase of Neurogenesis Are Associated with Therapeutic Improvement after Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, 25(2), 130–139, 2008.

YAO, Z.X.; PAPADOPOULOS, V. Function of β -amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. **The FASEB Journal**, 16(12), 1677–1679, 2002.

YEAGLE, P. L. Cholesterol and the cell membrane. **BBA - Reviews on Biomembranes**, 822(3–4):267–287, 1985.

ZAMMER, S., et al. Ameliorative effect of alendronate against intracerebroventricular streptozotocin induced alteration in neurobehavioral, neuroinflammation and biochemical parameters with emphasis on AB and BACE-1. **Neurotoxicology**, 70:122-134, 2019.

ZHANG, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor ameliorates learning deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by A β 1-42. **PLoS One**, 10:e0122415, 2015.

ZHANG, J.; LIU, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein Cell**, 6(4):254–264, 2015.

ZHANG, M. et al. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. **Nutr Res**, 36(3): 271-9, 2016.

ZHENG, Z.; SABIRZHANOV, B.; KEIFER, J. Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. **J Biol Chem**, 285:34708–34717, 2010.

ZHENG, X. et al. The Antineuroinflammatory Effect of Simvastatin on Lipopolysaccharide Activated Microglial Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2018: 1-9, 2018.

ZHOU, B., Teramukai, S. & Fukushima, M. Prevention and treatment of dementia or Alzheimer's disease by statins: a meta-analysis. **Dement Geriatr Cogn Disord** 23, 194–201, 2007.

ZIPP, F. et al. Impact of HMG-CoA reductase inhibition on brain pathology. **Trends Pharmacol Sci**, 28:342-349, 2007.

ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. **Trends in Neurosciences**, 28(4):202-8, 2005.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Sinalização de insulina cerebral	11
Figura 2. Microdomínios de membrana plasmática - "Lipids Rafts"	14
Figura 3. Principais grupos celulares do sistema nervoso central (SNC)	17
Figura 4. Metabolismo do colesterol no sistema nervoso central (SNC)	21
Figura 5. Desenho experimental.....	30
Figura 6. Desempenho cognitivo	38
Figura 7. Captação de glicose	39
Figura 8. Conteúdo de proteína S100B e GFAP, e a atividade da GS	40
Figura 9. Conteúdo de glutathiona e produção de DCF	41
Figura 10. Conteúdo de BDNF	42
Figura 11. Colesterol presente nos microdomínios, celular e total do hipocampo....	43
Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais.....	31
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de soro.....	44