

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DA VD₃ SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE O
SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM UM
MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO
ALZHEIMER EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marília Valvassori Rodrigues

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITOS DA VD₃ SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE O SISTEMA
PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM UM MODELO DE
DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER EM RATOS**

Marília Valvassori Rodrigues

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica
Toxicológica.**

Orientador: Prof.^a Margarete Dulce Bagatini

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Valvassori, Marília

EFEITOS DA VD3 SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE O SISTEMA
PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM UM MODELO DE DEMÊNCIA
ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER EM RATOS / Marília
Valvassori.-2014.

91 p.; 30cm

Orientador: Margarete Dulce Bagatini

Coorientadores: Vera Maria Morsch, Jessié Martins
Gutierrez

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. Demência 2. Vitamina D3 3. Ratos 4. Memória 5.
Enzimas I. Dulce Bagatini, Margarete II. Morsch, Vera
Maria III. Martins Gutierrez, Jessié IV. Título.

Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica
Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado.

EFEITOS DA VD₃ SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE O SISTEMA
PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM UM MODELO DE DEMÊNCIA
ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER EM RATOS

elaborada por:
Marília Valvassori Rodrigues

Como requisito parcial para a obtenção de grau de:
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Margarete Dulce Bagatini
(Presidente/ Orientadora)

Rosélia Maria Spanevello (Universidade Federal de Pelotas)

Mauro Oliveira (Universidade Federal de Santa Maria)

Santa Maria, 13 de junho de 2014

*O sol e a lua brilham porque acreditam em si mesmos!!!
A convicção é fonte de uma brilhante glória
Se desejar mudar algo é preciso ter determinação,
vontade e coragem para agir,
assim cria-se a oportunidade na vida!!*

(Daisaku Ikeda)

*D*edico este trabalho.

... à minha família, pelo apoio que me foi dado ao longo destes anos e por incentivarem os meus sonhos. Ao meu namorado e grande amigo Marcos, que esteve ao meu lado me apoiando e me fazendo acreditar nos meus sonhos. Muito obrigada por comemorarem comigo cada vitória alcançada e me darem suporte nos momentos de dificuldade.

I. Agradecimentos

Desafio tão grande quanto escrever esta Dissertação, foi utilizar pouco mais de duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte da minha trajetória de 5 anos pela Bioquímica. Por isso, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a construir algo de valor em minha vida.

Início estes agradecimentos por meus pais, que sempre primaram por minha educação. Obrigada Angela Valvassori e Hélio Rodrigues por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, este trabalho é fruto de um esforço sobre-humano de vocês. Obrigada mãe por seres essa mulher incansável e guerreira que és, sem ti eu jamais teria chegado aonde cheguei, tu és com toda certeza o meu exemplo!!!! Amo demais vocês do fundo do meu coração!!!!

À minha irmã Letícia Valvassori por estar sempre ao meu lado torcendo por mim e me incentivando a alcançar meus objetivos, muitas vezes abrindo mão dos próprios sonhos em prol dos meus. Eu te amo muito Leka!!!

Ao meu namorado Marcos Vissotto pelo apoio incondicional e incentivo durante esses quase 8 anos de namoro e por todo o apoio durante essa caminhada aqui em Santa Maria. A tua presença foi essencial para essa conquista meu amor!!! Eu te amo e espero que essa seja mais uma de muitas conquistas ao teu lado!!

Aos meus avós, Jurema e Vervaldo Valvassori, Maria e Salvador Rodrigues (*in memorian*) por terem me dado uma estrutura familiar maravilhosa e os melhores pais que eu poderia ter!!!!

Aos meus tios Arno, Roselei e Roseli Valvassori pelo carinho e incentivo durante todos estes anos, e principalmente ao “Tio Ito” por ser como um pai pra mim, aconselhando e ajudando sempre nas dificuldades. Amo muito vocês!!!

À minha “Tia Neivinha” (*in memorian*) que dedicou alguns anos de sua vida cuidando de mim com todo o amor que uma mãe pode dar a um filho!!!! Te amo e sinto muitas saudades suas, essa conquista também tem um pedacinho seu!!!

Aos meus primos que tanto amo: João Vitor, Gustavo, Gabriel e Cristian.

À Nilza, pelos conselhos e apoio durante a minha jornada acadêmica, além dos cuidados com a minha mãe querida enquanto estou ausente!!

À minha futura sogra Rosangela e ao meu futuro sogro Marcos por terem me acolhido como se fosse membro da família desde sempre, por cuidarem de mim muitas vezes que adoeci e também pelos inúmeros conselhos que me deram.

À minha cunhada Dricca pelos momentos de descontração em meio ao “estresse” da pós-graduação e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao meu cunhado Leandrinho por ser como um irmão pra mim e pelo apoio durante esse período.

À minha orientadora Professora Dr.^a Margarete Dulce Bagatini, pela dedicação durante esses quase dois anos. Obrigada, Marga, pelo auxílio incondicional na realização deste trabalho, pela disponibilidade de me ensinar, pelo apoio e incentivo em todos os momentos, pelas horas disponibilizadas para me atender, pela paciência nos meus momentos de ansiedade, pelos muitos e-mails cheios de dúvidas que foram sempre respondidos e principalmente pela sua amizade.

À minha orientadora durante todo o período de Iniciação Científica e co-orientadora durante o mestrado Professora Dr.^a Vera Maria Morsch, por me dar os inúmeros votos de confiança que tive durante esses 5 anos de Laboratório, pela paciência nos meus momentos de dúvida e tristeza, pela amizade, pelo carinho e principalmente pela oportunidade de poder trabalhar com uma pesquisadora como a senhora!!

À professora Dr.^a Maria Rosa Schetinger por dar-me oportunidade de conhecer o mundo científico, quando ainda estava na graduação. Acredito sinceramente que tenha sido uma maravilhosa coincidência do destino ter tido a honra de ser sua Prof. de Hidroginástica e assim poder fazer parte do Enzitox.

Em especial, ao meu co-orientador Jessié Martins Gutierrez. Obrigado por compartilhar comigo tua amizade sincera e verdadeira, pelos inúmeros conselhos durante todo esse período no laboratório, pelo companheirismo e pela ajuda nos momentos difíceis. Foi graças a ti que optei por trabalhar com esse tema e graças a tua ajuda incansável que cheguei até aqui. Obrigada também por ter me ensinado tudo que sei na bioquímica e ter sido realmente um pai pra mim durante a minha Iniciação Científica!! Tenho certeza que se não fosse pela tua ajuda eu jamais teria conseguido!!!

À Professora Dr.^a Maria Amélia Roth, pelo seu incentivo, amizade e principalmente por aquelas “ajudinhas” sempre fora de hora para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora Professores Rosélia Maria Spanevello e Mauro Oliveira, por terem contribuído com o meu trabalho.

Aos meus queridos amigos Ju, Fabiano, Fátima e Jucy. Obrigado pelo carinho e dedicação nos experimentos, pelo bom humor e também pela amizade de vocês.

A todos os colegas de laboratório e da UFSM, pela amizade, apoio, ajuda e carinho, tenho um profundo sentimento de amizade e respeito por todos! Lu, Javed, Gustavo, Carol, Nay, Dani, Eduardo, Pauline, Fábio, Jéssica, Carla, Lizi, Cinthia, Rosélia, Luana, Diéssica, Karine, Déia, Beta.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade e aos professores do programa.

À CAPES pela bolsa concedida e ao Governo Federal.

A todos os amigos e pessoas que de alguma forma me ajudaram, meus sinceros agradecimentos a todos.

II. Lista de abreviaturas

1,25(OH)₂D₃- calcitriol

1 α Hase- 1 α - Hidroxilase

A β - beta- amilóide

ACh- acetilcolina

AChE- acetilcolinesterase

ADP- adenosina difosfato

ADI- Associação Internacional da Doença de Alzheimer

ADA- adenosina desaminase

ADO- adenosina

AMP- adenosina monofosfato

ANOVA- análise de variância

APP- proteína precursora amilóide

APOE- apolipoproteína E

ATP- adenosina trifosfato

Ca²⁺- cálcio

ChAT- colina acetiltransferase

ChT1- transportador de colina de alta afinidade

DA- Doença de Alzheimer

DAF- Doença de Alzheimer Familiar

DAS- Doença de Alzheimer Esporádica

DETA- Demência Esporádica do Tipo Alzheimer

DMTII- Diabetes Mellitus Tipo II

DTNB- 5-5'- dithio-bis-2-nitrobenzoic acid

E-5'-Nucleotidase- Ecto-5'- Nucleotidase

E-NPPs- Ecto- Nucleosídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase

E-NTPDase- Ecto- Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

et al.- do latin "et alii" ou "et aliae", significado e outros

G- forma globular da acetilcolina

GPI- glicofosfatidil inositol

icv- intracerebroventricular

IGF- insulin- like grow factor

LDH- Lactate dehydrogenase
LTD- long- term depression
LTP- long- term potentiation
OPCs- células progenitoras de oligodendrócitos
PAD- proteína de ligação da Vitamina D no sangue
RI- receptor cerebral de insulina
SBNeC- Brazilian Society for Neuroscience
SNC- sistema nervoso central
SNP- sistema nervoso periférico
STZ- estreptozotocina
TACHV- transportador de acetilcolina vesicular
TCh- transportador de colina
VC- varying coefficient
VD- vitamina D
VD₂- ergocalciferol
VD₃- colecalciferol
VDRs- receptores de vitamina D
VDREs- elementos de resposta a vitamina D

III. Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Mecanismo de ação da estreptozotocina intracerebroventricular administrado em ratos.....	25
Figura 2 - Sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (vAChT).....	27
Figura 3 - Isoformas da acetilcolinesterase.....	28
Figura 4 - Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	30
Figura 5 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, assim como seus receptores purinérgicos.....	31
Figura 6 - Membros da família da E-NTPDase.....	32
Figura 7 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI.....	33
Figura 8 - Estrutura da Vitamina D ₂ (A) e estrutura da Vitamina D ₃ (B),.....	35
Figura 9 - Ação nuclear da Vitamina D.....	35
Figura 10 - Absorção da Vitamina D ₃ , adaptada.....	37
Figura 11 - Fontes de Vitamina D.....	38

IV. Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Localização dos receptores da Vitamina D ₃	37
---	----

Sessão Manuscrito

- Esquema 1 - Estrutura química da Vitamina D₃ [25- Hydroxyvitamin D₃ ou (C₂₇H₄₄O₂)] (A); Estrutura da Estreptozotocina [N-(methylnitrosocarbamoyl)-α-D-glucosamine ou (C₈H₁₅N₃O₇)] (B); Esquema de representação em dias do desenho experimental (C). O dia 0 indica o dia da cirurgia (icv-STZ infusão)..... 71
- Tabela 1 - Níveis de Vitamina D₃ (VD) em soro dos ratos tratados nas doses de 12.5; 42 e 125 µg/kg e submetidos a injeção icv-STZ (3mg/kg). *Significa diferença significativa para o Veículo, 12.5VD, SDAT e SDAT+VD12,5. Os dados são representados como media ± S.E.M. com ± 7 ratos por grupo, utilizando ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman Keuls..... 71
- Figure 1 - Teste de Reconhecimento de objetos em ratos com DATE e tratados com Vitamina D₃ (VD) em diferentes doses (µg/Kg). *Indica diferenla significativa para o Veículo (P<0.05), #Indica diferenla significativa para SDAT (P<0.05). Os dados são representados como media ± S.E.M. com ± 7 ratos por grupo, utilizando ANOVA de duas vias seguido de teste de Newman Keuls..... 72
- Figura 2 – Atividade da AChE em sinaptossomas de hipocampo synaptossomes de ratos com Demência Esporadica do Tipo Alzheimer (DATE) e tratados com Vitamina D₃ (VD) em diferentes doses (µg/ kg). *indica diferenla significativa para o Veículo (P<0.05). #iindica diferença significativa para o SDAT (p<0.05). Cada coluna representa média ± SEM (n=7). Os resultados foram expressos como µmol AcSCh/mg de proteína (ANOVA de

duas vias seguido de teste de Bonferroni)..... 72

Figura 3 - Hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em ratos com Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (DATE) e tratados com Vitamina D₃ (VD) em diferentes doses (µg/Kg). *indica diferença significativa para o Veículo (P<0.05). #indica diferença significativa para o SDAT (P<0.05). Each coluna representa média ± SEM (n=7). Os resultados foram expressos como nmol Pi/min/mg de proteína (ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni)..... 73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
3. MANUSCRITO.....	42
3.1 Abstract.....	45
3.2 Introduction.....	46
3.2 Marterials and Methods.....	48
3.3 Statistical Analysis.....	53
3.4 Results.....	54
3.5 Discussion.....	56
4. CONCLUSÕES.....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

V. RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DA VD₃ SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM UM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER EM RATOS

AUTORA: Marília Valvassori Rodrigues
ORIENTADORA: Margarete Dulce Bagatini
CO- ORIENTADOR: Vera Maria Morsch e Jessié Martins Gutierrez
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de junho de 2014.

A Doença de Alzheimer (DA) é considerada a principal causa de demência em idosos no mundo. Essa doença afeta o Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente o córtex cerebral e o hipocampo, que são áreas responsáveis pelos processos de aprendizagem e memória, por isso a busca por novas terapias para o tratamento dessa patologia é constante. Estudos indicam que a Vitamina D₃ (VD₃) pode estar envolvida nas funções de neurotransmissão, neuroproteção, neuroimunomodulação e diversos processos cerebrais, além de estar envolvida na homeostase do cálcio (Ca²⁺). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da VD₃ sobre a memória e na atividade das enzimas AChE, NTPDase e 5'Nucleotidase em hipocampo de ratos submetidos a um modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (DETA) em ratos. Para isso, foram utilizados um total de 40 ratos machos Wistar, pesando entre 350- 400g, divididos em 8 grupos: controle, Vitamina D₃ 12,5 µg/kg, Vitamina D₃ 42 µg/kg, Vitamina D₃ 125 µg/kg, estreptozotocina (STZ), estreptozotocina + Vitamina D₃ 12,5 µg/kg, estreptozotocina + Vitamina D₃ 42 µg/kg, estreptozotocina + Vitamina D₃ 125 µg/kg. Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (0.5 mg/kg) e receberam uma injeção bilateral de estreptozotocina (3mg/kg) intracerebroventricular (icv). Após o procedimento cirúrgico os animais passaram por um período de recuperação de 72 horas. Em seguida os animais foram tratados com VD₃, via oral, durante 21 dias. Os testes comportamentais de campo aberto e reconhecimento de objetos foram realizados do 21º ao 24º dia após a cirurgia. Logo após o 24º dia os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados. Em relação os níveis de VD₃ em soro, foi observado um aumento significativo (P<0.05) nos grupos que receberam as maiores doses. Um déficit de memória foi encontrado no grupo STZ, no entanto, o tratamento com VD₃ mostrou-se eficiente em prevenir esta perda de memória (P<0,05). Quanto à atividade da AChE, foi encontrado um aumento em hipocampo no grupo STZ, sendo que esse aumento foi atenuado pela administração de VD₃ (P<0,05). Os animais do grupo com Demência também apresentaram uma redução na hidrólise de ATP e a VD₃ foi capaz de prevenir este efeito (P<0,05). Além disso, a VD₃ foi capaz de reverter o aumento na hidrólise de ADP e a diminuição da hidrólise de AMP causada pela injeção icv-STZ. Desta forma, este estudo mostrou que a administração de VD₃ é capaz de manter a neurotransmissão colinérgica, a homeostase do sistema purinérgico, bem como melhorar a memória em animais com DETA.

Palavras- chave: Demência; memória; Vitamina D₃; acetilcolinesterase; E-NTPDase; E-5'-nucleotidase.

VI. ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF VD₃ ON MEMORY AND ON PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEM IN A MODEL OF SPORADIC DEMENTIA OF ALZHEIMER'S TYPE IN RATS

Author: Marília Valvassori Rodrigues
Advisor: Margarete Dulce Bagatini
Co-advisor: Vera Maria Morsch and Jessié Martins Gutierrez
Place and Date: Santa Maria, June 13, 2014.

Alzheimer's disease (AD) is considered the main cause of dementia in elderly people worldwide. This disease affects the central nervous system (CNS), especially the cerebral cortex and hippocampus, areas that are responsible for the processes of learning and memory, for this the search for new therapies to treat this condition is constant. Studies indicate that Vitamin D₃ (VD₃) may be involved in the functions of neurotransmission, neuroprotection and neuroimmunomodulation in different brain processes, in addition to being involved in the homeostasis of calcium (Ca²⁺). Thus, the aim of this study was to investigate the effects of VD₃ on memory and in the activity of enzymes AChE, NTPDase and 5'-Nucleotidase in the hippocampus of rats submitted to a model of sporadic dementia of the Alzheimer type (DETA) in rats. For this, a total of 40 male Wistar rats were used, weighing between 350-400g were divided into 8 groups: control, Vitamin D₃ 12.5 µg/kg, Vitamin D₃ 42 µg/kg, Vitamin D₃ 125 µg/kg streptozotocin (STZ), streptozotocin + Vitamin D₃ 12.5 µg/kg streptozotocin + Vitamin D₃ 42 µg/kg streptozotocin + Vitamin D₃ 125 µg/kg. The animals were anesthetized with ketamine and xylazine (0.5 mg/kg) and received a bilateral injection of streptozotocin (3mg/kg) intracerebroventricular (icv). After surgery the animals was submitted a recovery period for 72 hours. Then the animals were treated with VD₃ orally for 21 days. Behavioral tests of open field and object recognition were realized from 21st to 24th day after surgery. After the 24th day the animals were anesthetized with isoflurane and euthanized. In relation to VD₃ levels in serum, a significant increase (P<0.05) was observed in the groups that received the highest doses. A memory deficits in STZ group has been found, however, the treatment with VD₃ shown to be effective in the preventing of loss of memory (P<0.05). Regarding the AChE activity was found increased in the hippocampus in STZ group, and this increase was attenuated by administration of VD₃ (P<0.05). Animals of group with Dementia also showed a reduction in ATP hydrolysis and VD₃ was able to prevent this effect (P<0.05). Furthermore, VD₃ was able to reverse the increase in the hydrolysis to ADP and the decrease in AMP hydrolysis by STZ-icv. Thus, this study showed that administration of VD₃ is capable of maintaining cholinergic neurotransmission, the homeostasis of the purinergic system as well as improve memory in animals with SDAT.

Keywords: Dementia; memory; vitamin D₃; acetylcholinesterase; E-NTPDase; E-5'-nucleotidase.

VII. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: Life Science.

1. Introdução

Introdução

O primeiro caso de demência Senil foi descoberto em 1906 por Alois Alzheimer, no entanto, já havia relatos de demência mesmo antes desta data, remontando aos antigos médicos e filósofos gregos e romanos (BERCHTOLD e COTAMAN, 1998). Com o passar dos anos, o conceito de demência senil evoluiu a partir da noção de que o declínio cognitivo ocorre na velhice. Atualmente o conceito de demência é definido por um conjunto de características clínicas e patológicas.

A descoberta da doença de Alzheimer (DA) no início do século 20 foi decisiva para a compreensão da demência senil, e os achados histológicos apresentados pelos primeiros pesquisadores da doença, continuam a ser relevantes até hoje (BERCHTOLD e COTMAN, 1998).

Segundo a Associação Internacional da Doença de Alzheimer (ADI) aproximadamente 35,6 milhões de pessoas em 2010 convivem com o Alzheimer e a estimativa é de que este número praticamente dobre a cada 20 anos (WORTMANN, 2012). Além disso, a DA é considerada a desordem neurológica com maior perspectiva de crescimento (STIX, 2010). Atualmente, não existe uma descrição precisa para essa desordem, já que sua fisiopatologia é complexa e envolve múltiplas vias de danos neuronais (STIX, 2010).

Essa doença apresenta inúmeras alterações no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo que a principal delas é o acúmulo extracelular de placas beta-amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares causados pela hiperfosforilação da proteína tau (STIX, 2010), devido a esse fato, a maioria das pesquisas realizadas atualmente são focadas na descoberta de medicamentos para reduzir os níveis dessa hiperfosforilação no cérebro (BARREDA e ÁVILA, 2011).

O acúmulo extracelular de placas beta-amilóide ($A\beta$) causa um processo inflamatório que é iniciado pelos elevados níveis de citocinas e quimiocinas no cérebro de pacientes com DA (AKIYAMA, *et al.*, 2000; MOORE e O' BANION, 2002). Esse processo inflamatório é caracterizado por astrogliose, microgliose e alterações nos níveis de proteínas de fase aguda (WALSH e SELKOE, 2004). Por isso, a DA também pode ser considerada uma doença inflamatória cerebral caracterizada por astrogliose e microgliose (NATHAN, *et al.*, 2005; WALSH e SELKOE, 2004).

Estudos têm demonstrado que a Diabetes Mellitus tipo II, é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cognitivas como a DA (LIU *et al.*, 2011). Recentemente, estudos realizados em cérebros humanos, *post-mortem*, associaram como característica molecular e patológica da DA à redução da expressão de insulina e genes do IGF (*insulin-like growth factor*) e seus receptores correspondentes (LIU *et al.*, 2011).

É amplamente conhecido que o envelhecimento pode resultar em déficits de memória afetando assim a realização das atividades diárias da população idosa (SALTHOUSE, 2003). É possível que esse declínio cognitivo, seja resultado do processo de envelhecimento associado a doenças neurodegenerativas (KRUEGER e SALTHOUSE, 2011), colaborando para o declínio na velocidade de processamento de informações e também em demência (SOUBELET e SALTHOUSE, 2011). Nesse sentido, Mu e Gage (2011) relataram que os neurônios do hipocampo estão especialmente vulneráveis à neurodegeneração causada pela DA. Esses neurônios possuem um importante papel na aprendizagem e na memória.

A demência é uma desordem cerebral caracterizada pelo declínio em várias funções mentais superiores, tais como: memória, inteligência e personalidade, causando prejuízos no funcionamento cerebral e nas atividades diárias (CSHA, 1994). A prevalência da demência aumenta com a idade, dobrando a cada cinco anos entre as idades de 60 e 90 anos (CORRADA *et al.*, 2008). Essa demência é reconhecida nos países desenvolvidos como um grande problema social, médico e econômico (GAO *et al.*, 1998). Recentemente, a demência também está se tornando um grande problema nos países em desenvolvimento, onde até poucos anos atrás ela ainda praticamente não existia (ZILKENS *et al.*, 2013).

Mais de 50 milhões de pessoas no mundo têm demência, e a causa mais comum desta demência é a DA (ADLARD *et al.*, 2009). A DA é dividida em duas formas principais, nomeadas familiares (DAF) e esporádicas (DAS) caracterizadas por déficits cognitivos e perda neuronal no SNC (MICHON, 2009; REED *et al.*, 2009).

A DAF (que é considerada a forma de início precoce), ocorre principalmente em adultos jovens, ela tem forte correlação entre a genética e traços

da patogênese da DA, assim como mutações na proteína precursora de amilóide (APP) (BERNARDI *et al.*, 2009). No entanto, a DAS é uma doença multifatorial, onde estão envolvidos fatores genéticos e epigenéticos (ZAWIA *et al.*, 2009), suas mutações genéticas são no gene da apolipoproteína E (APOE) mais especificamente no alelo 4 (WHARTON *et al.*, 2009) e no gene PS-2 promotor de polimorfismo (LIU *et al.*, 2008). Além disso, muitos estudos indicam que os distúrbios de vários aspectos do metabolismo celular parecem ter importância patológica na DAS.

Alguns dos aspectos patológicos da DAS em seres humanos podem ser mimetizados pela administração intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ) em ratos, o que levaria a Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (DETA) (TOTA *et al.*, 2010; SHARMA & GUPTA, 2001). Mais importante ainda, é que doses subdiabetogênicas de icv-STZ podem induzir alterações no receptor cerebral de insulina (RI), mudanças na sinalização da insulina e, conseqüentemente, alterações comportamentais, neuroquímicas, bioquímicas, morfológicas e histológicas semelhantes ao envelhecimento cerebral, além de alterar o sistema colinérgico (AGRAWAL, 2009; AWASTHI *et al.*, 2010, SALKOVIC- PETRISIC, 2008).

No cérebro dos animais, uma redução nos níveis de glicose e do metabolismo energético, principalmente no hipocampo, têm sido descrita a partir da primeira semana após a administração de icv-STZ (PATHAN *et al.*, 2006) o que conseqüentemente, gera uma disfunção mitocondrial (**Figura 1**) (AGRAWAL, *et al.*, 2009). Além disso, através da utilização de um fármaco bloqueador do canal de cálcio (lercanidipina) (SONKUSARE *et al.*, 2005), observou-se que a administração icv-STZ reduz a disponibilidade de energia ao mesmo tempo em que causa um aumento no cálcio citoplasmático (Ca^{2+}) (MULLER *et al.*, 1998). Já foi relatado que as funções cerebrais dependentes de ATP são afetadas por falhas no estado energético cerebral. Essas alterações neuroquímicas e estruturais foram observadas logo após duas semanas de administração icv-STZ e podem persistir por mais 12 semanas após a indução da DETA, acompanhadas de déficits progressivos na aprendizagem e memória (HOYER *et al.*, 1999), desempenhando assim um papel importante na patogênese da DAS.

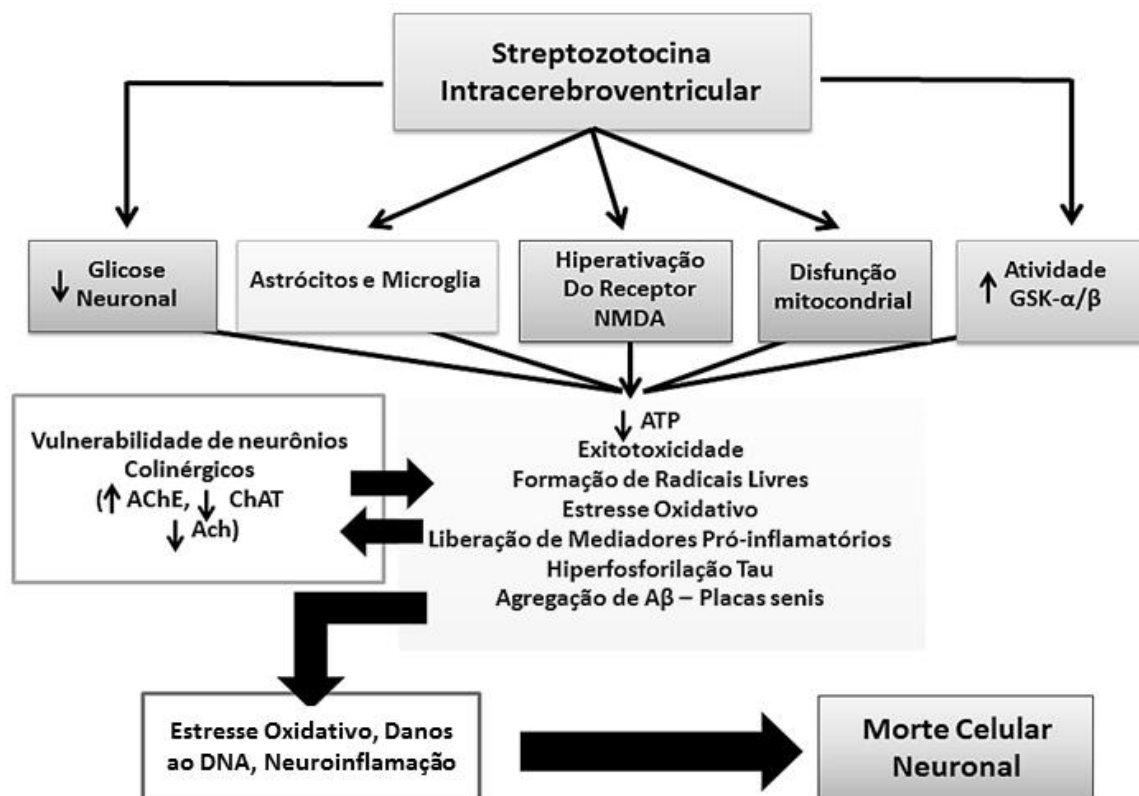


Figura. 1. Mecanismo de ação da estreptozotocina intracerebroventricular administrado em ratos Gutierrez *et al.*, 2009.

Vários estudos apontam a perda de marcadores colinérgicos colina-acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE), no tecido *post-mortem* de pacientes com a doença como um dos princípios centrais da DA, o que também foi encontrado em animais com DETA induzida por icv-STZ (MEHAN *et al.*, 2012). A AChE é uma enzima amplamente pesquisada devido a sua grande importância fisiológica e envolvimento em patologias neurodegenerativas. Inibidores da sua atividade têm sido estudados com a finalidade de diminuir os efeitos hipocolinérgicos causados pelo aumento da atividade da AChE na DA (DAS *et al.*, 2001).

O sistema colinérgico possui um dos mais importantes papéis modulatórios no SNC, já que desempenha papel fundamental na regulação de inúmeras funções vitais relacionadas ao comportamento, assim como o aprendizado e a memória, além de controlar o fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 1999). Os principais componentes do sistema colinérgico são: a acetilcolina (ACh), a colina-acetiltransferase (ChAT), o transportador de colina (TCH), o transportador de acetilcolina vesicular (TACHV), os receptores de acetilcolina

muscarínicos (AChRm) e os nicotínicos (AChRn) e a acetilcolinesterase (AChE) (KAWASHIMA e FUJII, 2000; SARTER e PARIKH, 2005).

Desde o início da história da evolução e antes mesmo do surgimento do sistema nervoso nos animais, a acetilcolina (ACh) é considerada uma importante molécula sinalizadora. Nessa época, ela era encontrada em bactérias, protozoários, algas e plantas (GOTTI e CLEMENTI, 2004; KAWASHIMA e FUGI, 2003). A neurotransmissão química foi investigada por Otto e Loewi (1921) e a ACh foi então identificada como uma substância cardioativa liberada pelo nervo vago (VAN DER ZEE e LUITEN, 1999). Dessa forma, a ACh foi o primeiro composto identificado como neurotransmissor e passou então a ser estudado nas sinapses do SNC e do Sistema Nervoso Periférico (SNP) (DESCARRIES *et al.*, 1997). A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU e AKAABOUNE, 2006).

A síntese de ACh ocorre a partir da transferência de um grupo acetil de uma molécula de acetil coenzima A (acetil CoA), vinda da metabolização celular da glicose, para uma molécula de colina. Esta reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), presente principalmente no citoplasma da célula colinérgica (**Figura 2**). A ACh recém sintetizada é, logo em seguida armazenada em vesículas, através da atividade do transportador vesicular de acetilcolina (VChT), que utiliza o gradiente eletroquímico da bomba H⁺-ATPase e realiza a troca de dois prótons H⁺ presentes no lúmen vesicular por uma molécula de ACh do citoplasma (NGUYEN *et al.*, 1998). Na fenda sináptica, a enzima acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa a ACh, a colina liberada é então reciclada após captação pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1) do neurônio colinérgico (RAND, 2007).

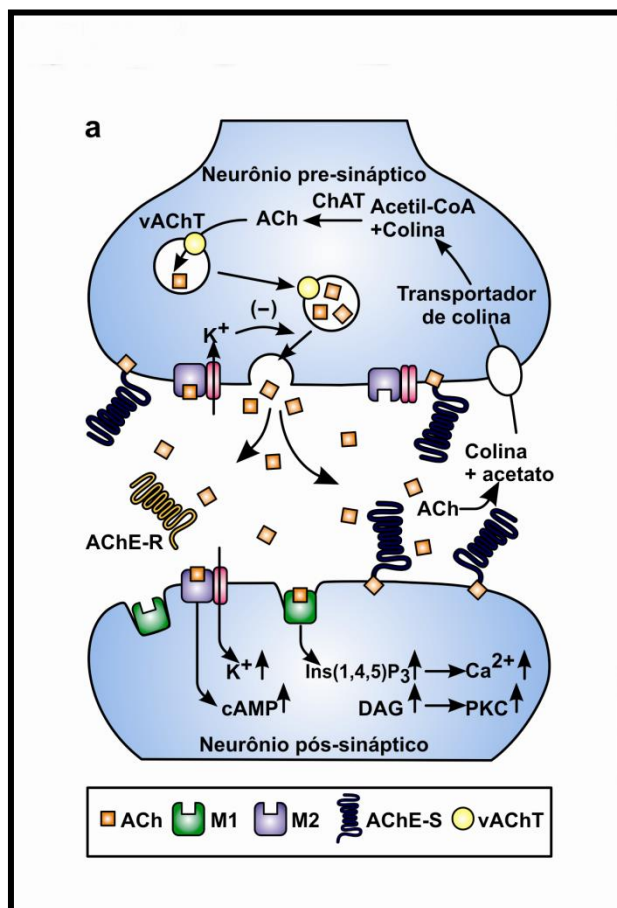


Figura 2: Esquema de uma sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (TACHV). Adaptado de Soreq & Seidman, (2001).

A AChE possui diversas formas moleculares no organismo, a globular e a assimétrica dependendo da sua conformação espacial (**Figura 3**). A forma globular apresenta-se como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas que aparecem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros originando, respectivamente, as seguintes formas globulares (G): G1, G2 e G4, sendo cada uma delas predominante em alguns tecidos. Outra classe de AChE é a forma assimétrica que apresenta-se como uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde a ligação através de pontes dissulfeto de uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois, ou três tetrâmeros catalíticos resultam nas formas estruturais assimétricas A4, A8 ou A12, respectivamente (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

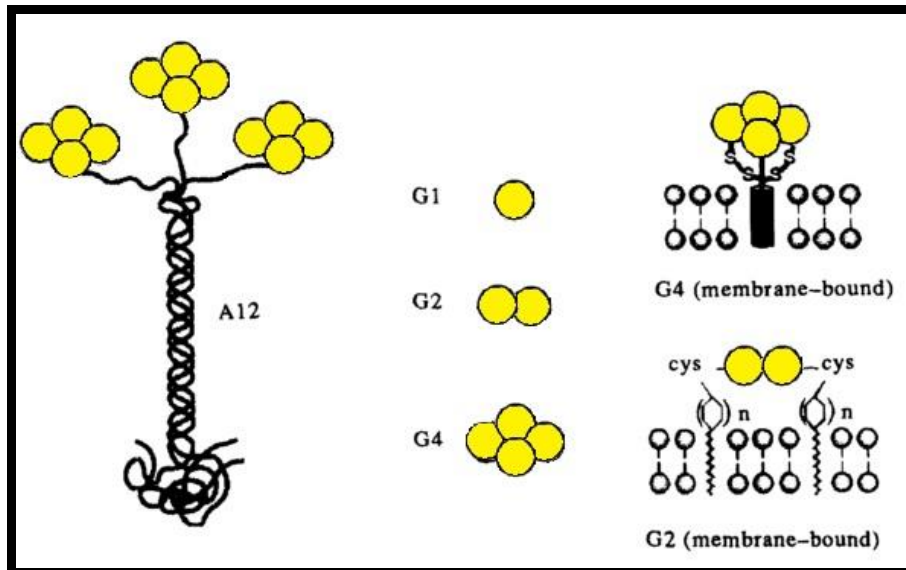


Figura 3: Isoformas da acetilcolinesterase. Adaptada de (SMALL, 1996).

Vários estudos têm relatado a importância da participação do sistema colinérgico em processos cognitivos. Um estudo realizado por Hunsaker *et al.*, (2007), mostrou que a ACh em hipocampo possui grande importância para a formação da memória espacial e também para o condicionamento contextual ao medo (ROGERS e KESNER, 2004). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório utilizando icv- STZ demonstraram um significativo aumento na AChE em hipocampo e córtex de animais com DETA (GUTIERRES *et al.*, 2014).

Estudos clínicos em pacientes com DA indicam uma disfunção importante na regulação da ACh nas funções cognitivas (BLOKLAND, 1995). Entretanto o papel biológico da AChE não está limitado apenas à transmissão colinérgica, essa enzima tem sido implicada em várias ações não colinérgicas incluindo proliferação celular (APPLEYARD, 1992), crescimento neurítico (CHACON *et al.*, 2003) e respostas a vários insultos como estresse e formação amilóide (GRISARU *et al.*, 1999).

Estratégias clínicas para combater os transtornos cognitivos característicos da DA estão sendo desenvolvidos com a expectativa de melhorar a disponibilidade de ACh no SNC. Os agonistas de receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos), potencializam o nível endógeno de ACh (promotores e inibidores da síntese de enzimas metabolizadoras). Dentre as várias abordagens testadas, a inibição da AChE é a abordagem considerada mais eficaz até o momento (GIACOBINI, 1996).

Outro sistema que constitui um importante alvo de estudos devido ao seu papel em modular o SNC é o sistema purinérgico. Esse sistema está envolvido em vários processos fisiológicos, como a neurotransmissão, a neuromodulação, o desenvolvimento do encéfalo e o reparo neuronal (CUNHA e RIBEIRO, 2000; NORTH, 2002; SCHETINGER *et al.*, 2007). Vários subtipos de receptores desse sistema estão distribuídos por todo o SNC (BURNSTOCK, 2007a).

O sistema purinérgico caracteriza-se pelo envolvimento de três principais componentes: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os receptores através dos quais estes nucleotídeos exercem seus efeitos e as ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (BURNSTOCK, 2006).

As ações desse sistema são mediadas principalmente pelos nucleotídeos extracelulares de adenina (**Figura 4**). Os nucleotídeos trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP) bem como o nucleosídeo adenosina (ADO) são importantes moléculas sinalizadoras (ILLES e RIBEIRO, 2004; SCHETINGER *et al.*, 2007; YEGUTIN, 2008). O ATP é um neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas, podendo ser co-liberado juntamente com outros neurotransmissores como a ACh e a noradrenalina através de vesículas pré-sinápticas dependentes de cálcio.

Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos subdivididos em dois grandes grupos: P1 e P2. Os purinoreceptores do tipo 1 são mais eficientemente ativados por adenosina, enquanto os receptores P2 são ativados principalmente por ATP (BURNSTOCK, 2007b). Desta forma, o ATP modula a liberação de ACh através de seu metabólito adenosina e também pela presença de receptores P2X e P2Y na sinapse neuromuscular (DE LORENZO *et al.*, 2006). Na sinapse neuronal o ATP é degradado até adenosina pela ação das ectonucleotidases (BURNSTOCK, 2006; LING, *et al.*, 2005), enquanto que a adenosina age na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores (DUNWIDDIE e MASINO, 2001). Porém, na DA essa liberação de ATP pode ser afetada por anormalidades para as respostas do Ca² na micróglia (MC LARNON *et al.*, 2005).

Além disso, os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina também são reconhecidos por estarem envolvidos na formação e na regulação da

sinaptogênese, plasticidade neuronal, proliferação de células gliais, e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (AGRESTI *et al.*, 2005; STEVENS *et al.*, 2002; WINK *et al.*, 2003).

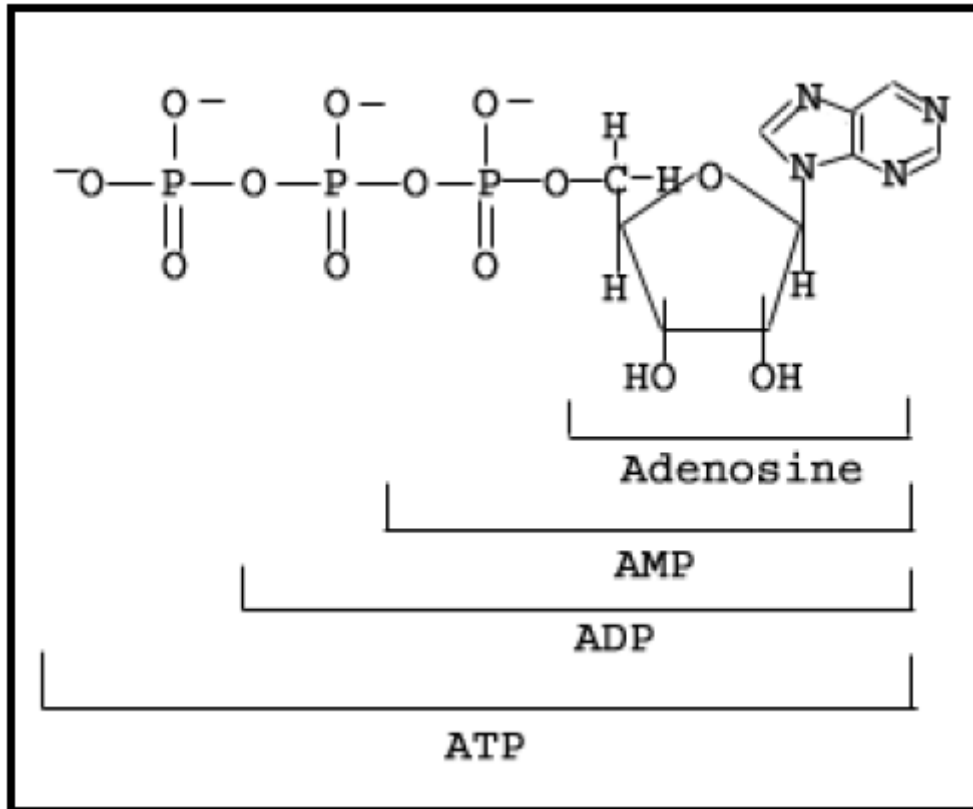


Figura 4: Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. (<http://textbookofbacteriology.net/metabolismo.html>). Acessado 05/05/2014.

Além disso, estruturas resseladas chamadas de sinaptossomas contêm componentes sinápticos obtidos a partir de frações homogêneas de vesículas sinápticas (BAI & WITZMANN, 2007). Essas estruturas possuem uma grande quantidade de mitocôndrias, e o ATP pode ser liberado dessas estruturas sob estímulo, uma vez que esse nucleotídeo possui grande importância na comunicação celular e transdução de sinais. Dessa forma, qualquer fator que afete negativamente a capacidade das mitocôndrias de gerar ATP (como é o caso da DA) é provável que tenha consequências negativas para o desenvolvimento e função cerebral (MILLAR *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas, os nucleotídeos estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações (DI VIRGILIO, 2001) e suas concentrações são reguladas por enzimas localizadas na superfície celular ou solúveis no meio

intersticial, denominadas ectonucleotidasas (ZIMMERMANN *et al.*, 2007). Essas concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina são influenciadas por inúmeros fatores, tais como: secreção e/ou lise celulares, efeito da diluição no espaço extracelular e pela ação catalítica das ectonucleotidasas (MALMSJO *et al.*, 2000).

A família das ectonucleotidasas inclui a família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase), a família das E-NPPs (ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), as fosfatases alcalinas, a E-5'-nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA) (ROBSON *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008). Em nosso estudo daremos destaque as E-NTPDases e a E-5'-nucleotidase, que podem controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP a seus receptores específicos. Essas enzimas atuam em conjunto e formam uma cadeia que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, essas catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP (ZIMMERMANN *et al.*, 2007). A enzima E-5'-nucleotidase hidrolisa AMP formando a adenosina (**Figura 5**) (YEGUTKIN, 2008).

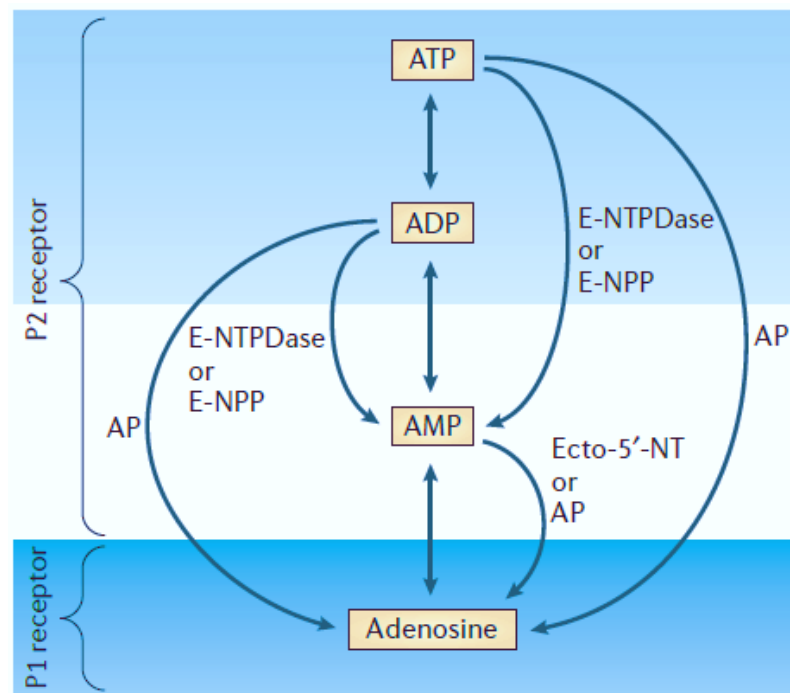


Figura 5- Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, assim como seus receptores purinérgicos. Adaptado de (FIELDS e BURNSTOCK, 2006).

E- NTPDase é o termo utilizado para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatos (ZIMMERMANN, et al. 2012). Já foram identificados oito membros dessa família, sendo que eles diferem

quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (**Figura 6**) (BIOGONNESE, 2004; SHI *et al.*, 2001; ZIMMERMANN, et al., 2012).

A NTPDase1 (ecto/CD39) foi a primeira enzima da família da E-NTPDase a ser estudada, e está ancorada a membrana plasmática via domínios hidrofóbicos através de duas regiões transmembranas próximo ao grupamento amino e carboxiterminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001). Essa enzima hidrolisa o ATP e o ADP formando AMP na presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ROBSON *et al.*, 2006). A NTPDase-1 é bem caracterizada no SNC e em outros tecidos, como em plaquetas e em linfócitos (SCHETINGER *et al.*, 2001; LUNKES *et al.*, 2003). As NTPDases 2, 3 e 8 também estão localizadas na membrana celular com um sítio catalítico voltado para a face extracelular, enquanto que as NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas na membrana intracelular (ROBSON *et al.*, 2006).

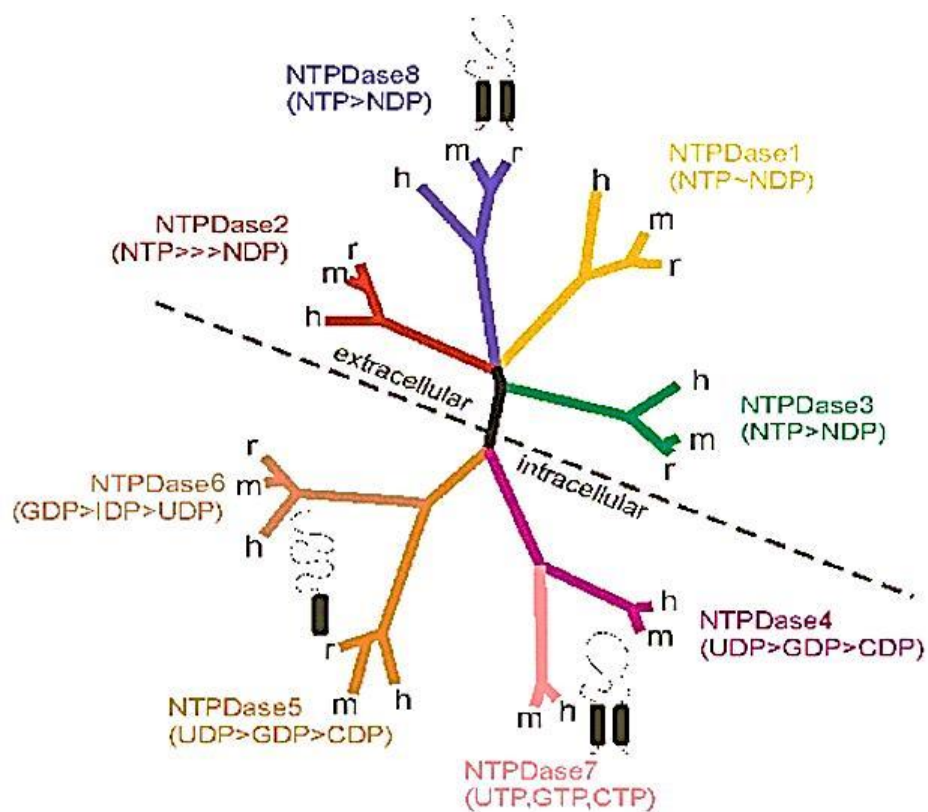


Figura 6: Membros da Família das NTPDases, adaptado de Robson e colaboradores (2006).

A E-5'-Nucleotidase é uma enzima que pode ser encontrada solúvel ou ancorada a membrana plasmática via uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI)

com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (**Figura 7**) (BIANCHI e SPYCHALA, 2003). Ela pode estar presente na maioria dos tecidos, sendo expressa na superfície de células nervosas, e nas sinapses durante o seu desenvolvimento e remodelação (ZIMMERMANN *et al.*, 1998). Essa enzima catalisa a fosforilação de vários nucleotídeos 5'- monofosfatados, tais como: CMP, IMP, UMP, GMP e AMP à seus respectivos nucleosídeos (CUNHA, 2001). Entretanto, foi demonstrado que a E-5'-Nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo dessa forma considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (CUNHA, 2001; ZIMMERMANN, 2001). Sua atividade catalítica é inteiramente ativada por cátions divalentes e inibida por ADP, ATP e 5'- α,β -metileno-difosfato. Sete subtipos de E-5'-nucleotidasas foram clonados, sendo que seis delas de localização intracelular e uma na membrana plasmática (BIANCHI e SPYCHALA, 2003).

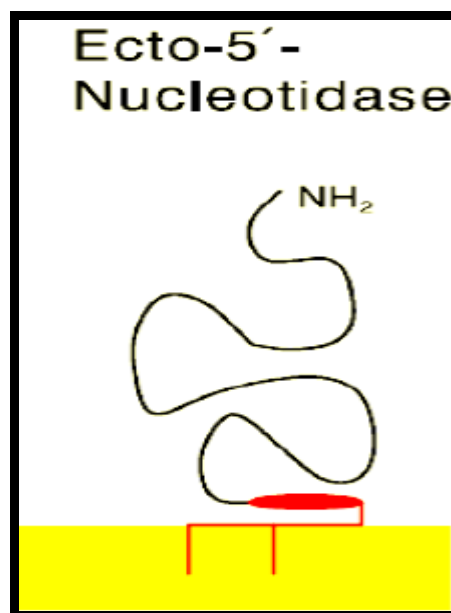


Figura 7: Estrutura da E- 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

Considerando que a DA afeta o SNC, principalmente córtex cerebral e hipocampo, em nosso estudo investigamos a atividade da enzima AChE e também das ectonucleotidasas, visto que essas enzimas estão presentes no SNC e são de grande importância para os processos de neurotransmissão, neuromodulação, sinalização celular, aprendizado e memória (CUNHA E RIBEIRO, 2000;

KAWASHIMA e FUGI, 2003; SCHETINGER *et al.*, 2007). Além disso, já tem sido demonstrado que essas enzimas podem ser moduladas por compostos naturais em vários modelos experimentais realizados em nosso laboratório (GUTIERRES *et al.*, 2013; SCHMATZ *et al.*, 2011; STEFANELLO *et al.*, 2014).

Vários estudos mostram uma redução significativa nos níveis de vitamina D (VD) em diversas doenças neurodegenerativas (ANNWEILER *et al.*, 2010; SOILU-HÄNNIENEN, 2013). Por isso, tornou-se relevante o estudo dos efeitos da VD na DA.

A VD foi descoberta pela primeira vez durante a revolução industrial, quando a Inglaterra foi atingida por uma epidemia de raquitismo. Em 1918, Sir Edward Mellanby propôs que essa doença tenha sido causada por uma deficiência nutricional e como tratamento sugeriu que fosse utilizado o óleo de bacalhau. Em 1922 o composto ativo (1,25-di-hidroxivitamina D), foi isolado pela primeira vez, por McCollum e a partir desse momento ele ficou conhecido como VD. Dois anos depois, pesquisadores de três universidades descobriram que a luz solar é indispensável para a síntese de VD (HESS, 1924; HUME e SMITH, 1924; STEEMBOCK, 1924). No início dos anos de 1930, o governo dos EUA criou uma agência para fornecer recomendações para os pais sobre o efeito benéfico da exposição à luz solar na prevenção do raquitismo (HOLICK, 2006).

VD é um nome genérico dado a um grupo de esteróides lipossolúveis cujas duas principais formas são a Vitamina D₂ (ergocalciferol) e a Vitamina D₃ (colecalfiferol) (**Figura 8**), coletivamente chamadas de calciferol. A Vitamina D₂ (VD₂) é produzida por invertebrados, fungos e plantas na presença de radiação ultravioleta (UV). A vitamina D₃ (VD₃), por outro lado, é produzida fotoquimicamente na pele da maioria dos vertebrados, a partir de 7-deidrocolesterol pela radiação ultravioleta B (BOUILLON *et al.*, 1998), porém ela também pode ser obtida através da dieta (MEERZA *et al.*, 2010).

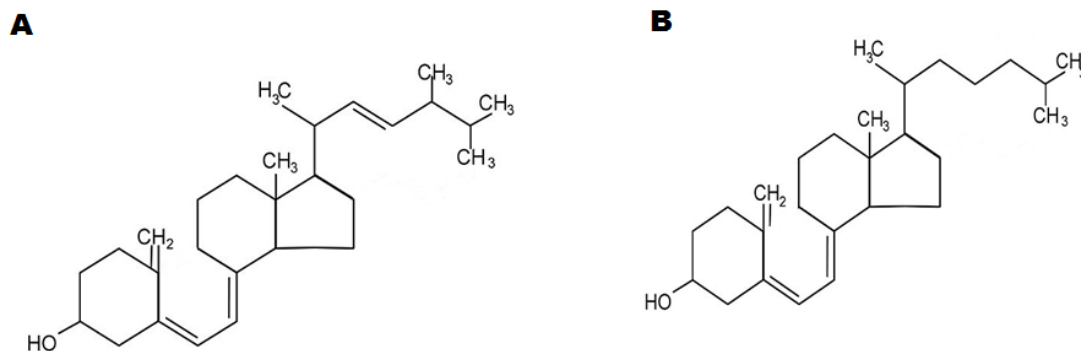


Figura 8: Estrutura da Vitamina D₂ (A) e estrutura da Vitamina D₃ (B), adaptada por SACARAMENTO & SILVA (2006).

Ambas as vitaminas exercem seus efeitos biológicos através da transformação à forma hormonal da vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol), via ação da enzima 1 α -hidroxilase. O calcitriol interage com os receptores de VD (VDRs - Vitamin D receptors) e regula a expressão de genes específicos, chamados de Elementos de Resposta a VD (VDREs) (**Figura 9**) (LIU *et al.*, 2009). Genes que codificam a enzima 1 α -hidroxilase são expressos no encéfalo (EYLES *et al.*, 2005). A VD deve ser convertida para a sua forma biologicamente ativa para iniciar seus efeitos. Ela é transportada no sangue pela proteína de ligação da VD (PAD) até o fígado. No fígado então, ela é hidroxilada no carbono 25 (C- 25), resultando na formação de 25-hidroxitamina D₃ (Vitamina D₃). A VD₃ é transportada para o rim onde novamente é hidroxilada pela enzima 1 α -hidroxilase (1 α OHase), resultando na forma hormonalmente ativa da Vitamina D, (**Figura 10**) (CHRISTAKOS, 2010).

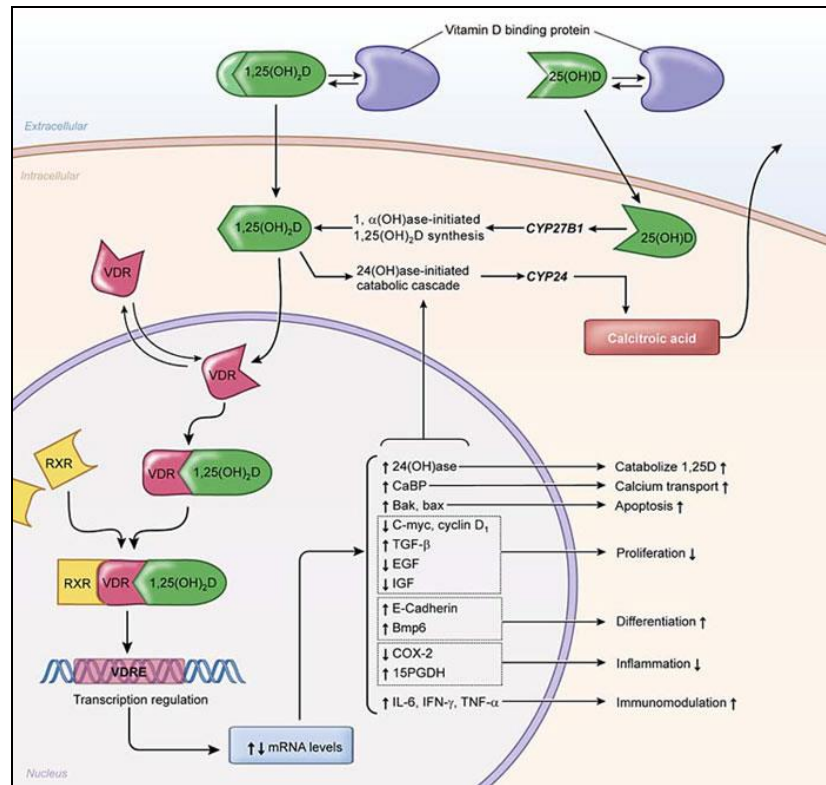


Figura 9: Ação nuclear da Vitamina D, adaptada por Pedrosa e Castro (2005).

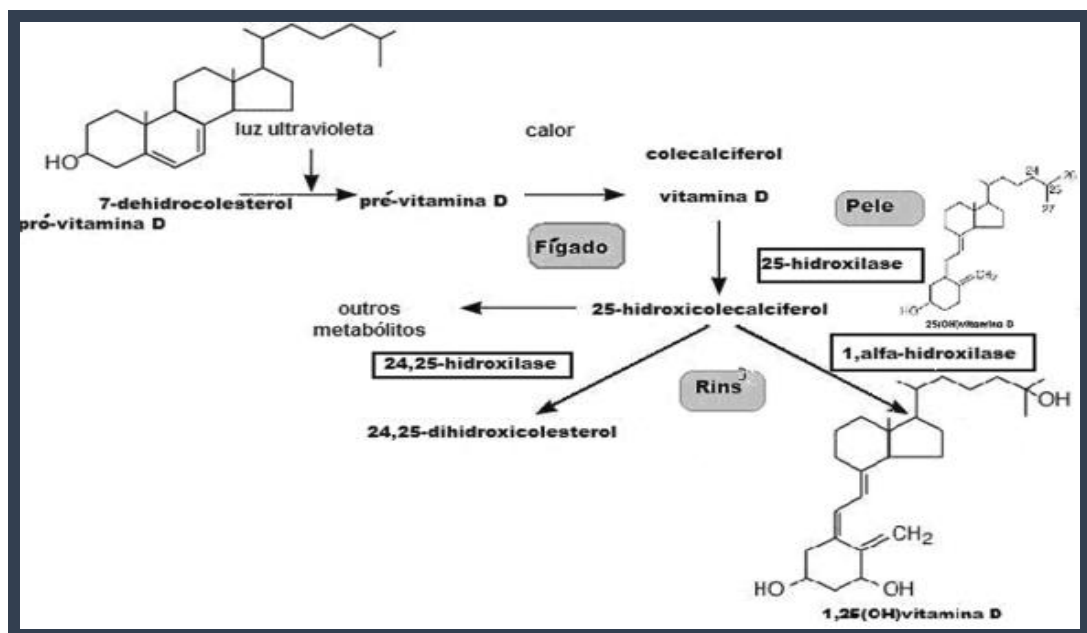


Figura 10: Absorção da Vitamina D₃, adaptada por Bouillon et al., (1998).

Os receptores de Vitamina D (VDR) estão localizados em córtex cerebral e hipocampo de seres humanos (como mostrado na Tabela 1), significando estruturas importantes para os processos cognitivos e de processamento de

informação, sendo a sua deficiência associada com o aumento do tamanho dos ventrículos, alteração no aprendizado e outros parâmetros comportamentais, bem como doenças neurodegenerativas e demência (ANNWEILER et al., 2009). Além disso, as enzimas que realizam a bioativação da VD₃ estão expressas em grande quantidade em quase todas as regiões do SNC, principalmente nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo (EYLES, 2005), que são áreas frequentemente afetadas por doenças neurodegenerativas, como a DA (CECKIC, 2009; FERNANDES DE ACREU, 2009).

Localização dos receptores para a Vitamina D ₃	
Tecido	Tipo específico de célula
Ossos	Osteoblastos
Medula Óssea	Monócitos e Linfócitos T
Cérebro	Hipocampo e Neurônios selecionados
Coração	Eptélio
Células Cancerosas	Melanoma, Carcinoma, leucemia, osteossarcoma, carcinoma de cólon, carcinoma de tórax medular, adenocarcinoma pancreático, carcinoma cervical, adenoma pituitário, carcinoma vesicular, fibrossarcoma
Cartilagens	Condrócitos
Cólon	Eptélio
Intestino	Eptélio
Rim	Eptélio (proximal e distal)
Músculo Cardíaco	Células do músculo cardíaco
Embrião	Mioblasto
Músculo Liso	Células do músculo liso
Pâncreas	Células β
Pituitárias	Somatotróficas
Pele	Epiderme
Testículos	Túbulos Seminíferos
Timo	Linfócitos T

Tabela 1: Localização dos receptores da Vitamina D₃, adaptado por MINGHETTI & NORMAN (1988).

A principal fonte de VD para a maioria dos seres humanos é a exposição a luz solar (HOLICK, 2003). Poucos alimentos contêm naturalmente a VD, incluindo os peixes oleosos como salmão, cavala, e arenque e óleos de peixe, incluindo o óleo de fígado de bacalhau (**Figura 11**). Nos Estados Unidos, o leite, alguns produtos de sumo, alguns pães, iogurtes, e queijos são fortificados com VD. Multivitaminas contendo 400 UI de VD e suplementos contendo VD estão disponíveis em várias

quantidades incluindo 400, 1000, 2000, 4000, 5000 e 50.000 UI de VD₃. A forma farmacêutica de VD nos Estados Unidos é VD₂ e está disponível como 50.000 UI de VD₂ em cápsula ou 8000 UI VD₂/ mL (HOLICK, 2006; 2007). No Canadá, Europa, Japão e Índia, a VD₃ está disponível como um produto farmacêutico (HOLICK e CHEN, 2008).



Figura 11: Fontes de Vitamina D. (<http://longidade.blogspot.com.br/2013/04/alimentos-ricos-em-vitamina-d.html>. Acessado em: 16.04.2014)

A deficiência da VD₃ pode ocorrer através da diminuição da penetração da radiação UVB na pele o que irá afetar sua síntese cutânea (CHEN, 2007). Ela pode ser relacionada com inúmeras doenças neurológicas, tais como: Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla (ANNWEILER *et al.*, 2010; SOILU-HÄNNIENEN, 2013; WILKINS *et al.*, 2006), além de também poder ser associada ao comprometimento cognitivo em pacientes com a DA (ANNWEILER *et al.*, 2010; PRZYBELSKI e BINKLEY, 2007; OUDSHORN *et al.*, 2008; WILKINS *et al.*, 2006). Um estudo realizado com mais de 1.000 homens idosos demonstrou um baixo nível sérico de VD. Esses homens receberam acompanhamento onde foi observado um declínio cognitivo ocorrendo de 4 a 6 anos após a realização dos exames (SLININ *et al.*, 2010). Outro estudo realizado em indivíduos com insuficiência de VD (VD₃ ≤ 20 ng/ml) relatou que esses indivíduos possuíam o dobro do risco de desenvolver a

DA quando comparados com pacientes com estado suficiente de VD (BUELL *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a VD₃, além de seu papel na regulação da homeostase do cálcio e fosfato e da formação óssea, também possa estar envolvida na função de neuroproteção (GARCION *et al.*, 2002). Em seres humanos e em animais, a VD₃ é considerada um hormônio neuroesteróide que pode regular a neurotransmissão, neuroproteção, neuroimunomodulação e diversos processos cerebrais (BUELL e DAWSON, 2008; KALUEFF e TUOHIMAA, 2007). Essa vitamina pode também estimular o crescimento neurítico em células de neuroblastoma humanos e promover o aumento da densidade hipocampal de linhas celulares progenitoras em ratos (MCCANN e AMES, 2008).

Além disso, estudos mostram o envolvimento da VD na plasticidade sináptica (Eyles *et al.*, 2007) e no aumento significativo da atividade da colina acetiltransferase (ChAT) cuja função é a de sintetizar a ACh (SONNENBERG *et al.*, 1986). Dessa forma, a VD₃ pode regular fatores neurotróficos e os níveis de neurotransmissores.

Um estudo realizado por Dursun *et al.*, (2011) mostrou o tratamento de neurônios com VD₃ revelou que este neuroesteróide pode proteger os neurônios contra a toxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide. A suplementação de VD pode proteger esses neurônios, uma vez que regula a síntese de neurotrofinas, estabelece homeostase do cálcio através de canais de cálcio e previne o estresse oxidativo via controle de algumas etapas de desintoxicação (CEKIC, 2009; BREWER, 2006; GARCION, 2002; GEZEN- AK, 2007, ALMERAS, 2007).

Na DA, assim como em outras doenças neurodegenerativas a VD₃ atua no SNC, através de seus receptores (VDRs), realizando a homeostase do cálcio e de fósforo, regulando assim a neurotransmissão, (DURSUN *et al.*, 2010, 2013; GEZEN- AK *et al.*, 2007, 2012; WANG *et al.*, 2012).

Considerando que a DA é uma das principais causas de demência em idosos em todo o mundo, e que novas terapias para a prevenção dessa doença possuem um importante papel social, mostrou-se relevante investigar os efeitos da VD₃ sobre as alterações comportamentais e bioquímicas encontradas em um modelo de DETA em ratos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da vitamina D₃ sobre as alterações comportamentais e o envolvimento das enzimas AChE, E-NTPDase e 5'-Nucleotidase de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos da administração da VD₃ sobre a memória no modelo em estudo;
- Determinar alterações na atividade da AChE em sinaptossomas do hipocampo em um Modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer;
- Verificar alterações na atividade das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase em sinaptossomas do hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer, tratados com VD₃.

3. Manuscrito

**Vitamin D₃ restores memory, acetylcholinesterase activity and
ectonucleotidase activities in a model of sporadic alzheimer's dementia
in rats**

Marilia Valvassori Rodrigues^a, Jessié Martins Gutierrez^a, Juliano Marchi Vieira^a, Fabiano Barbosa Carvalho^a, Fátima Husein Abdalla^a, Jucimara Baldissareli^a, Carlos Fernando de Mello^b, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Margarete Dulce Bagatini^{c*}, Vera Maria Morsch^{a*}.

^a Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

^bPrograma de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

^c Colegiado do Curso de Enfermagem, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó/SC, Brasil.

*Corresponding authors:

Margarete Dulce Bagatini: Colegiado do Curso de Enfermagem, Campus Chapecó, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó/SC, Brasil. Tel./fax: +55-49 99194832.

E-mail address: margaretebagatini@yahoo.com.br

Vera Maria Morsch: Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: + 55-55 3220 9557.

E-mail address: veramorsch@gmail.com

Highlights

Benefits of VD₃ in memory, in learning and in cholinergic and purinergic systems in a Model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type/

VD₃ prevent impairments in memory and learning induced by icv- STZ/

VD₃ prevents loss in Acetylcholinesterase activity caused by dementia/

VD₃ regulates ectonucleotidase alterations induced by a Model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of VD₃ treatment in behavioral parameters and in the AChE, NTPDase, 5'-Nucleotidase activities in hippocampus of rats to experimental model Sporadic Dementia of Alzheimer's Type (SDAT) induced by Streptozotocin (STZ). For this, male Wistar rats were used and divided into 8 groups: Vehicle, Vitamin D₃ 12.5 µg/kg (12.5VD), Vitamin D₃ 42 µg/kg (42VD), Vitamin D₃ 125 µg/kg (125VD), Streptozotocin (SDAT), Streptozotocin plus Vitamin D₃ 12.5 µg/kg (SDAT+VD12.5), Streptozotocin plus Vitamin D₃ 42 µg/kg (SDAT+VD42) and Streptozotocin plus Vitamin D₃ 125 µg/kg (SDAT+VD125). The VD₃ treatment was done orally for 21 days and began after the recovery period. Behavioral parameters of Open Field and Object Recognition were performed for 3 days after VD₃ treatment. On the 24th day, animals were anesthetized and euthanized. A memory deficit in STZ group has been found, however, the treatment with VD₃ shown to be effective in the preventing of loss of memory (P<0.05). Regarding the AChE activity was found increased in the hippocampus in STZ group, and this increase was attenuated by administration of VD₃ (P<0.05). Animals of group with Dementia also showed a reduction in ATP hydrolysis and VD₃ was able to prevent this effect (P<0.05). Furthermore, VD₃ was able to reverse the increase in the hydrolysis to ADP and the decrease in AMP hydrolysis by STZ-icv. Thus, this study showed that administration of VD₃ is capable of maintaining cholinergic neurotransmission, the homeostasis of the purinergic system as well as improve memory in animals with SDAT.

Key words: Dementia, Vitamin D₃, Acetylcholinesterase, ectonucleotidases, memory, learning, rats.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia in elderly (Emilien et al. 2004). Typically, this disease leads to progressive cognitive loss and memory (Gutierrez et al. 2014). Intracerebroventricular injection of Streptozotocin (icv-STZ) in rats has been used as a model of Sporadic Dementia of Alzheimer's type (SDAT) (Tota et al. 2010), since it replicates many pathological processes in AD, such as impaired brain glucose and energy, leading to deficits in learning and memory (Awasthi et al. 2010).

Studies shown that deficiency in cholinergic function is concerning in AD, especially in hippocampus, since this is an essential area to process learning and memory (Anand and Singh 2013). Furthermore, the hippocampus displays a loss of cholinergic markers, especially in choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) activity, and in postmortem tissue from AD patients (Bowen et al. 1982). AChE is an important regulatory enzyme found mainly in muscles, erythrocytes and cholinergic neurons (Paleari et al. 2008).

Another import system that modulates the central nervous system (CNS) is the purinergic system. Others crucial enzymes for CNS are the NTPDase and 5'-Nucleotidase, many studies have reported that may be involved in several physiological processes such as neurotransmission, neuromodulation and brain development (Burnstock 2006a; Abbracchio et al. 2008). The purinergic system's behavior measured mainly by extracellular nucleotide adenine. The nucleotide adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and nucleoside

adenosine (ADO) are important signaling molecules (Schetinger et al. 2007). ATP is an excitatory neurotransmitter at the purinergic synapses and it may also be co-released with other neurotransmitters, such as acetylcholine (Ach) and norepinephrine (Burnstock 2006a), while adenosine acts on neuromodulation, regulating the release of various neurotransmitters such as glutamate and Ach that be essential for synaptic transmission (Mazzanti et al. 2009). The enzymes E-NTPDase (Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase) and E-5'-Nucleotidase perform control of extracellular nucleotide adenine levels (Yegutkin 2008). E-NTPDase promotes the hydrolysis of ATP and ADP in AMP (Zimmermann et al. 2007) and E-5'-Nucleotidase promotes hydrolysis of AMP in adenosine (Yegutkin, 2008).

Recent studies have shown that Vitamin D₃ (VD₃) has numerous functions in the CNS and is also known as a “neurosteroid” (Gezen-Ak et al. 2013). Its deficiency may be present in individuals that suffer from mood disorders, Parkinson’s Disease (PD), AD, and cognitive decline (Oudshoorn et al. 2008; Wilkins et al. 2006). VD₃, which is a steroid hormone, exerts its effects through its nuclear hormone receptor, also known as the vitamin D receptor (VDR). Recently, it has been shown that VDR and the enzymes which perform the bioactivation of vitamin D are abundantly expressed in CNS, especially in areas affected by neurodegenerative disorders such as the cortex and hippocampus (Fernandes de Abreu et al. 2009).

Based on the abovementioned, this study was performed in order to contribute to the understanding of the involvement of VD₃ in reversing the damage caused by icv-STZ in synaptosomes of hippocampus of rats. It’s important to note that the

current study is the first one evaluating the role of VD₃ in memory and in ectonucleotidases, as well as AChE activities in a model of SDAT induced by icv-STZ in rats.

Material and Methods

Chemicals

Acetylthiocholine iodide, Percoll, HEPES, 5,5'- dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris-(hydroxymethyl)-aminomethane GR, coomassie brilliant blue G, nucleotides, streptozotocin and 25 hydroxyvitamin D₃ were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

Animals

A sample of 56 male Wistar rats (3 months year old) weighing 350–400 g were used. They were kept in the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria in colony cages at a room temperature of 25±2 °C and relative humidity 45–55% with 12 h light/dark cycles. They had free access to standard rodent pelleted diet and water *ad libitum*. All procedures were carried out according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. This task was approved by the ethical committee of the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 102/2013).

Induction of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type

Animals were anesthetized with ketamine and xylazine (0.5 mg/kg) intraperitoneally. The head was placed in position in the stereotaxic apparatus and a midline sagittal incision was made in the scalp. The stereotaxic coordinates for the lateral ventricle (Paxinos and Watson 1986) were measured accurately as antero-posterior-0.8 mm, lateral 1.5 mm and dorso-ventral, -4.0 mm relative to bregma and ventral from dura with the tooth bar set at 0 mm. Through a skull hole, a 28-gauge Hamilton® syringe of 10 μ L attached to a stereotaxic apparatus and piston of the syringe was lowered manually into each lateral ventricle. The SDAT groups received bilateral icv injection of streptozotocin (3 mg/kg, body weight) which was dissolved in citrate buffer (pH 4.4) (Tiwari et al. 2009). The concentration of STZ in citrate buffer was adjusted so as to deliver 5 μ L/injection site of the solution. Rats in the control group received icv injections of the same volume of citrate buffer as in the STZ treated. After surgery, the animals took approximately 1-2 h to recover from the anesthesia. The rats were kept in cages inside a well-ventilated room at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and all animals had access to food and water ad libitum. Food and water was placed inside the cage for 3 days so that the animals could easily access them without any physical trauma due to operation. For 3 days after the surgery, the animals received dipyrone 25 mg/kg, from 8 to 8 h.

Treatment with Vitamin D₃

Animals were randomly divided into eight groups of 7 animals each: Vehicle, Vitamin D₃ 12.5 μ g/kg (12.5VD), Vitamin D₃ 42 μ g/kg (42VD), Vitamin D₃ 125 μ g/kg (125VD), Streptozotocin (SDAT), Streptozotocin plus Vitamin D₃ 12.5 μ g/kg (SDAT+VD 12.5), Streptozotocin plus Vitamin D₃ 42 μ g/kg (SDAT+VD 42), Streptozotocin plus vitamin D₃ 125 μ g/kg (SDAT+VD 125). Three days after the

procedure the animals received the compound by gavage diluted in corn oil at different doses (12.5, 42 and 125 µg/kg body weight) with VD₃ (1 ml/kg) daily for 21 days (around 10 am). The doses of Vitamin D₃ were chosen based on studies indicating neuroprotection (Borges et. al 2002; Santos and Vianna 2005). Control groups received only corn oil as vehicle (Scheme 1).

Behavioral testing

Open field

The Open Field test was conducted to habituate the animals to the test space. In the twenty-first day of treatment, the animals were transferred to a box of 56 × 40 × 30 cm, with the floor divided into 12 squares measuring 12x12 cm each for the evaluation of the open field task as described previously (Rubin et al. 2000). The open field session lasted five minutes and during this time, an observer, who had no knowledge of pharmacological treatments, recorded the number of crossings and the number of rearing responses.

Object recognition memory task

The Object Recognition paradigm was used to assess declarative memory in rats as described by Ennaceur and Delacour (1988). Following the twenty-first day and after the surgery, the animals underwent their first exercise, where they were individually placed in the open field containing two different objects (A and B) and allowed to explore them freely for 10 min. The animals were then removed and 24 h after the training session was done, we performed the retention test. In these 5 min test sessions, rats were individually reintroduced into the open field where one of the objects presented during training was randomly replaced by a new one (A and

C). The time spent exploring each object was measured by an observer who did not have any knowledge of pharmacological treatments and results are expressed as percentage of the total time of exploration.

Brain tissue preparation

After behavioral tests, animals were anesthetized with halothane and submitted to euthanasia for decapitation. Was removed 2 ml of blood for analysis of VD₃. The cranium was opened and the cerebral hippocampus was removed and placed in a solution of Medium I at pH 7.5, under ice. The brain hippocampus was homogenized in a Potter glass.

Synaptosomes were prepared as described by Dunkley et al. (1986). The hippocampus was homogenized in Medium I (0.25 mM sucrose and 10 mM HEPES - pH 7.4) and the homogenate was centrifuged for 3 min at 2000 x g at 4°C. The supernatant was centrifuged again at 9500 x g for 13 min. Then, the pellets were resuspended in 2 ml of sucrose 0.25 M and 10 mM of HEPES (pH 7.4) and placed on 3 ml of Percoll gradient containing 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol and 3, 10, or 23% Percoll, pH 7.4. The gradients were centrifuged at 25000 x g for 11 min at 4°C. The synaptosomes were collected between bands 10 and 23% and diluted with 15 ml of HEPES (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4). After centrifugation 22000 x g for 11 min at 4°C, the pellet was removed and resuspended in an isosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.8 mg/ml using the coomassie blue method utilizing bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard (Bradford 1976). Synaptosomes were prepared

fresh daily, maintained at 4°C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

Lactate dehydrogenase

The integrity of the synaptosome preparations was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity, which was obtained after synaptosome and platelet lysis with 0.1 % Triton X-100 and comparing it with an intact preparation, using the Labtest kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

AChE activity in synaptosomes from hippocampus

The AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al (1961), as previously described by Rocha et al (1993). The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1mM 5,5'dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by absorbance at 412nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme (40-50µg of protein) was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8mM acetylthiocholine iodide. All samples were run in duplicate or triplicate and the enzyme activity was expressed in µmol AcSCh/h/mg of protein.

E-NTPDase and E-5'-Nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus

E-NTPDase activity was determined according to Schetinger et al (2000), whereas the E-5'-nucleotidase activity was determined according to Heymann et al. (1984). The E-NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a

reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 0.1mM EDTA, 10mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris - HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl as described in a previous study from our laboratory. The E-5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100mM Tris - HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µl. Synaptosomes 20 µL of enzyme preparation (8-12 mg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by addition 20 µl ATP or ADP (10 mM) or AMP (20 mM) and the incubation time was 20 min. In all cases, the reaction was stopped with 200 µl of 10% trichloroacetic acid and the release of inorganic phosphate was measured by the method of Chan et al. (1986). The NTPDase and 5'-Nucleotidase were expressed as nmol Pi/min/mg of protein.

Serum levels of Vitamin D₃ (VD₃)

The serum levels of 1,25(OH)₂D (VD₃) were evaluated by radioimmunoassay kit (DiaSorin, Stillwater, MN); with varying coefficient (VC) intraassay of 8.6% the 12.5% e VC interassay of 8.2% the 11.0%.

Statistical analysis

The statistical analysis used in behavioral tasks was test of Newman Keuls (one-way ANOVA) non- parametric data. Parametric data was analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test and considered $p < 0.05$ or $p < 0.001$ as statistically significant in all experiments.

Results

Serum levels of Vitamin D₃ (VD₃)

Table 1 shows the serum levels of Vitamin D₃ (VD) in rats with SDAT. It was found a significant increase in serum levels of VD₃ in 42VD and 125VD group when compared with vehicle and 12.5VD groups. Similar results were observed in SDAT+VD42, and SDAT+VD125 when compared with SDAT and SDAT+VD12.5.

Vitamin D₃ prevents the impairment of memory induced by STZ

As it can be observed in Figure 1, rats with Sporadic Dementia of Alzheimer Type (SDAT) and treated with Vitamin D₃ (VD), showed significant SDAT versus VD₃ interaction [$F(1,35) = 11.54$; $P < 0.05$] for object recognition. The groups SDAT, SDAT+VD12.5 and SDAT+VD42 presented a significant decrease in memory when compared with vehicle (Fig. 1, $P < 0.05$). However, the SDAT+VD125 group reversed the decrease in memory when compared with SDAT.

Vitamin D₃ prevents the increase in AChE activity induced by STZ

Figure 2 shows AChE activity in synaptosomes from cerebral hippocampus. Statistical analysis showed a significant interaction between SDAT and VD₃ [$F(2,50) = 18.92$; $P < 0.05$]. Post *hoc* comparisons revealed that AChE activity was significantly increased in cerebral hippocampus synaptosomes of SDAT (153% activation) when compared with the vehicle ($P < 0.05$). However, AChE activity in groups SDAT+VD12.5, SDAT+VD42 and SDAT+VD125 was significantly decreased (34, 52 and 54%, respectively) ($P < 0.05$) when compared with SDAT.

Vitamin D₃ regulates E-NTPDase and E-5'-nucleotidase alteration induced by STZ

The results of the present study demonstrate that the cascade of ecto-enzymes was altered in SDAT treated with VD₃. Figure 3 shows the results obtained for E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities. Statistical analysis showed a significant SDAT versus VD₃ interaction [$F(2,42) = 8.55$; $P < 0.05$] for ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus. Post *hoc* comparisons revealed that E-NTPDase (hydrolyzing ATP) activity in SDAT group was significantly lower when compared with the vehicle group (59%) ($P < 0.05$) (Fig. 3a). On the other hand, hydrolyses of ATP in animals SDAT+VD125 increased significantly when compared with the SDAT group (155%).

In relation to ADP hydrolysis, two-way ANOVA showed a significant SDAT versus VD₃ interaction [$F(2, 42) = 8.55$; $P < 0.05$]. Post *hoc* comparisons revealed a significant increase (129 %) in ADP hydrolysis in SDAT when compared with vehicle (Fig. 3b). On the other hand, the groups of 12.5VD, 42VD and 125VD reversed the increase in the ADP hydrolysis (58, 61, and 78%, respectively) when compared with the SDAT group ($P < 0.05$). Moreover, the group SDAT+VD125 presented a significantly decrease (50 %) in ADP hydrolysis when compared with vehicle.

Figure 3C shows the results obtained for the E-5'-nucleotidase activity. Statistical analysis revealed a significant SDAT versus VD₃ interaction [$F(2, 41) = 2.56$; $P < 0.05$] for AMP hydrolysis. Post *hoc* comparisons revealed that AMP hydrolysis was decreased (59%) in the SDAT when compared to the vehicle. In groups SDAT+VD42 and SDAT+VD125 this compound reversed the increase in AMP hydrolysis (92, 140, and 173 %, respectively) when compared with the SDAT

group. However, in group 125VD an increase was found when compared with vehicle and SDAT.

Discussion

Studies have reported higher prevalence of VD₃ deficiency in Alzheimer Disease (AD) patients, and individuals with VD₃ insufficiency (25-dihydroxyvitamin D₃ ≤ 20 ng/mL) had double the risk of having AD comparing to individuals with sufficient VD₃ status (Buell et al. 2010). Furthermore, VD₃ deficiency has been found to be associated with cognitive impairment in AD patients and general population (Annweiler et al. 2010; Oudshoorn et al. 2008; Przybelski and Binkley 2007; Wilkins et al. 2006). Moreover, low levels of VD₃ plasma were suggested to be associated with mood disorders, dementia, mild cognitive impairment, AD, or cognitive decline (Annweiler et al. 2010, 2012). In this sense, we found a significant increase in the levels of VD₃ in plasma (Table 1) in the groups that received the higher doses (VD42, VD125 and SDAT+42, SDAT+125) when compared with vehicle and the groups that received doses of VD 12.5 µg/kg.

According to other studies, patients with AD have impairment in memory, learning, behavior and emotional responses (Anand and Singh 2013; Tota et al. 2010). A subdiabetogenic dose of STZ (3mg/kg) to rodents caused progressive memory impairment, loss and synaptic dysfunction (Pinton et al. 2010). Our results also indicated that icv-STZ impaired memory in rats trained in the object recognition task. Interestingly enough, we found out that VD₃ at 125 µg/kg for 21 days did not affect *per se* the memory of rats, but prevented the memory deficits induced by icv-STZ (Figure. 1), as shown by the object recognition task.

Associated to damage in memory, icv-STZ injection (SDAT group) was able to increase significantly the AChE activity in synaptosomes of hippocampus in all tested groups (Figure 2). This finding is in conformity with the previous studies showing that increase in AChE activity is related to icv-STZ administration (Awasthi et al. 2010; Tota et al. 2009, 2010; Gutierres et al. 2014). However, we also observed that VD₃ was able to prevent the AChE upregulation in synaptosomes from hippocampus of SDAT animals, without affecting *per se* the AChE activity. This effect most likely may occur due to abnormalities of nicotinic acetylcholine receptor function in the hippocampus caused by icv- STZ that may lead to cognitive and memory impairments (Pinton et al. 2013).

Similarly to the alterations observed in the AChE activity, another important aspect to be discussed here is the effect of VD₃ in the hydrolyses of adenine nucleotides in synaptosomes of the hippocampus in SDAT. The icv-STZ injection impairs energy metabolism and reduces ATP levels in the hippocampus and cerebral cortex of rats (Gutierres et al. 2014). It is known that the worsening of mitochondrial function and reduction of ATP levels are pathological conditions found in neurodegenerative diseases such as AD, which are closely linked to the decline of cognitive processes (Ferrer 2009; Hauptmann et al. 2009).

In the Central Nervous System (CNS), the E-NTPDase is an important enzyme involved in the purinergic neurotransmission (Zimmermann et al. 2007). Our results revealed a decrease in the ATP hydrolysis and increase in ADP hydrolysis by E-NTPDase activity in synaptosomes of hippocampus in the SDAT group, this suggests that an increase of extracellular ATP in the synaptic cleft can impair purinergic signaling (Figure 3). Based on these findings, we believe that the effects found in the hippocampus may be related to the activity of different enzyme

isoforms. Furthermore, disturbances on the ATP levels may impair processes such as the establishment of the neuronal long-term potentiation (LTP) (Fujii 2004; Wieraszko and Ehrlich 1994; Yamazaki et al. 2003) affecting memory formation (Cooke and Bliss 2006; Howland and Wang 2008; Lovinger 2010). Consequently, this increased in the ATP extracellular observed in the SDAT group may stimulate an increase in intracellular calcium levels which could cause significant neuronal damage and loss of memory (Biesselss 2002; Sperl agh 2006).

In the brain, it was also observed that SDAT groups decreased the activity E-5'-nucleotidase activity and VD₃ 125 µg/kg *per se* increase the activity of this enzyme. The activity of this enzyme is very important because it leads to the production of extracellular adenosine (Burnstock 2006 a,b; Robson et al. 2006; Schetinger 2001). The E-5'-nucleotidase and adenosine deaminase are key enzymes in the regulation of extracellular levels of adenosine in the synaptic cleft. A decrease of E-5'-nucleotidase activity reduces the adenosine formation, and the depletion of extracellular adenosine may disrupt memory formation since adenosine has been reported as an important neuromodulator in the establishment of LTP and long-term depression (LTD), as well as in synaptic plasticity (de Mendonca and Ribeiro 1997; de Mendonca et al. 2002).

Interestingly, when VD₃ was associated with SDAT it was able to prevent the alteration observed in the E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activity when compared to the vehicle. The possible mechanism by which VD₃ acts on these enzymes needs to be further investigated, but we may suggest that considering the external localization of the E- NTPDase catalytic site and its Ca²⁺ requirement for enzyme activity, VD₃ may arbitrate its neuroprotective effect, inducing the synthesis of Ca²⁺-binding proteins (Viragh et al. 1989). Moreover, it is possible that

VD₃ directly regulates the ectonucleotidase activity despite the interaction with Ca²⁺-binding proteins.

Regarding our results, the present study demonstrates alterations in nucleotide hydrolysis and AChE activity in rats with SDAT, suggesting that these alterations may be the cause of memory loss observed. On the other hand, the treatment with VD₃ was able to restore these alterations and probably the calcium homeostasis since this hormone may exhibit important neuroprotective actions via Ca²⁺ metabolism. In this case, we may speculate that VD₃ may be considered an important candidate to be used as adjuvant therapy to conventional treatment for Alzheimer's Disease.

Conclusion

The Injection icv-STZ caused impaired in memory gain of animals, increase in AChE activity and change in E-NTPDase and in E-5'-Nucleotidase. The treatment with VD₃ was able to prevent deficits in memory and reversed the increase in AChE suggesting a neuroprotective effect of this compound. However, the VD₃ reversed changes caused by STZ in E-NTPDase and in E-5'-Nucleotidase, probably because the VD₃ mediates its effects through the induction of synthesis of binding protein to Ca²⁺.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes).

References

Anand, P., Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacological Research*. v. 36, p. 375-399.

Annweiler, C., Schott, A. M., Allali, G., Bridenbaugh, S. A., Kressig, R. W., Allain, P., Herrmann, F. R., Beauchet, O. (2010). Association of vitamin D deficiency with cognitive impairment in older women, Cross-sectional study. *Neurology*. v. 74, p. 27–32.

Annweiler, C., Rolland, Y., Schott, A. M., Blain, H., Vellas, B., Beauchet, O. (2012). Serum vitamin D deficiency as a predictor of incident non-Alzheimer dementias: a 7-year longitudinal study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorder*. v. 32, p. 273–278

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhatsky, A., Zimmermann, H. (2008). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Cel Press*. v. 32, p. 19–29.

Awasthi, H., Tota, S., Hanif, K., Nath, C., Shukla, R. (2010). Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life Sciences*. v. 86, p. 87-94.

Balabanova, S. Richter, H. P., Antonioadis, G., Homoki, J., Kremer, N., Hanle, J. Teller, W. N. (1984) 25-Hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr*. v. 62, p.1086–1090.

Biessels, G. J., Laak, M. P., Hamers, F. P. T., Gispen, W. H. (2002). Neuronal Ca²⁺ disregulation in diabetes mellitus, *European Journal of Pharmacological*. v. 447, p. 201–209.

Borges, A. C. R., Feres, T., Vianna, L. M., Paiva, T. B. (2002). Cholecalciferol treatment restores the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to bradykinin. *Pathophysiology*. v. 8, p 263-268.

Bowen, D. M., Benton, J. S., Spillane, J. A., Smith, C. C., Allen, S. J. (1982). Choline cetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *Journal of the Neurological Science*. v. 57, p. 191-202.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254.

Buell, J. S., Dawson-Hughes, B., Scott, T. M., Weiner, D. E., Dallal, G. E., Qui, W. Q., Bergethon, P., Rosenberg, I. H., Folstein, M. F., Patz, S., Bhadelia, R. A., Tucker, K. L. (2010). 25-Hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology*. V. 74, p. 18-26.

Burnstock G. (2006 a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 27, p. 166–76.

Burnstock, G. (2006 b). Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, p. 166-176.

Cekic, M., Sayeed, I., Stein, D. G. (2009). Combination treatment with progesterone and vitamin d hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. v. 30, p. 158-172.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K. D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺ NTPase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 157, p. 375–378.

Clemens, T. L., Garret, K. P., Zhou, X. Oike, J. W., Haussler, M. R., Dempster, D. W. (1988) Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology*. v. 122, p. 1224–1230

Cooke, S. F., Bliss, T. V. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. v. 129, p. 1659–73.

Costenla, A. R., de Mendonca, A., Ribeiro, J. A. (1999). Adenosine modulates synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Brain Research*. v. 851, p.228–234.

de Mendonca, A., Ribeiro, J. A. (1997). Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sciences*. v. 60, p. 245–251,

de Mendonca, A., Costenla, A. R., Ribeiro, J. A. (2002). Persistence of the neuromodulatory effects of adenosine on synaptic transmission after long-term potentiation and long-term depression. *Brain Research*. v. 932, p.56–60.

Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., Heath, J. W., Kidd, G. J., Rostas, J. A. P. (1986). A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Research*. v. 372, n. 1, p. 115-129.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. v. 7, p. 88-95.

Emilien, G., Durlach, C., Minaker, K. L., Winblad, B., Gauthier, S., Maloteaux, J. M. (2004). *Alzheimer Disease Neuropsychology and Pharmacology*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, v. 1, p. 33-45.

Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*. v.31, p. 47- 59.

Evatt, M. L., DeLong, M. R., Khazai, N., Rosen, A., Triche, S., Tangpricha, V. (2008). Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Patients With Parkinson Disease and Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. v. 65, p. 1348 -1352.

Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J. J. (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. v. 29, p. 21—30.

Fernandes de Abreu, D. A., Eyles, D., Féron, F. (2009). Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*. v. 34, p. 265–277.

Ferrer, I. (2009). Altered Mitochondria, energy metabolism, voltage- dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomenbranes*. v. 41, p. 425- 431.

Fujii, S. (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: the role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Pharmacology Sciences*. v. 94, p. 103–106.

Gezen-Ak, D., Dursun, E., Yilmazer, S. (2013). Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement. *Neurological Sciences*. v. 34, p. 1453–1458.

Gutierrez, J. M., Carvalho, F. B., Schetinger, M. R. C., Marisco, P., Agostinho, P., Rodrigues, M. V., Rubin, M.A., Schmatz, R., Silva da, C. R., Cognato, G. P., Morsch, V; M., Mazzanti, C. M., Bogo, M., Bonan, C. D., Spanevello, R. M. (2014). Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by 1 streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sciences*. v. 96, p. 7- 17.

Hauptmann, S., Scherping, I., Dröse, S., Brandt, U., Schulz, K. L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A., Müller, W. E. (2009). Mitochondrial dysfunction: An early

event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiology of Aging*. v. 30, p. 1574–1586.

Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G. M. (1984.) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. v. 43, p. 263-273.

Howland, J. G., Wang, Y. T. (2008). Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus. *Progress in Brain Research*. v.169, p.145–158.

Illes, P.; Ribeiro, A. (2004). Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*. v.483, p.5-7.

Lannert, H., Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behavioral Neuroscience*. v.112, p.112-208.

Levin, E. D., Bradley, A., Addy, N., Sigurani, N. (2002). Hippocampal alpha 7 and alpha 4 beta 2 nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*. v. 109, p. 757–765.

Lovinger, D. M. (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*. v. 58, p. 951–961.

Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell Press*. v. 78, p. 535–538.

Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Musthaq, A., Pereira, L. B., Gonçalves, J. F., Corrêa, M., Schmatz^b, R., Stefanello, N., Leal, D. B. R., Mazzanti, A., Ramos, A. T., Martins, T. B., Danesi, C. C., Graça, D. L., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C. (2009). Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase

activity: interaction with demyelinating agents. *International Journal of Developmental Neuroscience*. v. 27, p. 73–80.

McKhann, G., Drachman, D. A., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. v. 34, p. 939–944.

Mitterauer, B. (2004). Imbalance of glial- neuronal interaction in synapses: A possible mechanism of pathophysiology of bipolar disorder. *Neuroscientist*. v. 10, p.199-206.

Musiol, I. M., Stumpf, W. E., Bidmon, H. J., Heiss, C., Mayerhofer, A., Bartke, A. (1992) Vitamin D nuclear binding to neurons of the septal, substriatal and amygdaloid area in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) brain. *Neuroscience*. v. 48, p. 841–848.

Oudshoorn, C., Mattace-Raso, F. U. S., van der Velde, N., Colin, E. M., van der Cammen, T. J. M. (2008). Higher serum vitamin D3 levels are associated with better cognitive test performance in patients with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. v. 25, p. 539-543.

Paleari, L., Grozio, A., Cesario, A., Russo, P. (2008). The cholinergic system and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. v. 18, p. 211-217.

Paxinos, G., Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. San Diego.

Pinton, S., da Rocha, J. T., Zeni, G., Nogueira, C. W. (2010). Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neuroscience Letters*. v. 472, p. 56-60.

Pinton, S., Brüning, C. A., Oliveira, C. E. S., Prigol, M., Nogueira, C. W. (2013). Therapeutic effect of organoselenium dietary supplementation in a sporadic dementia of Alzheimer's type model in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v.24, p. 311–317.

Przybelski, R. J., Binkley, N. C., 2007. Is vitamin D important for preserving cognition. A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 460, p. 202–205.

Rathbone, M. P., Middlemiss, P. J., Gysbers, J. W., Andrew, C., Herman, M. A., Reed, J. K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology*. v. 59, p. 663–690.

Robson, S. C., Sévigny, J., Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathological significance, *Purinergic Signalling*. v. 2, p. 409–430.

Rocha, J. B., Emanuelli, T., Pereira, M. E. (1993). Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Warsaw)*. v. 53, p. 431-7.

Rubin, M. A., Boemo, R. L., Jurach, A., Rojas, D. B., Zanolla, G. R., Obregon, A. D. C., Souza, D. O., Mello, C. F. (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioural Pharmacology*. v.11, p.57-61.

Santos, R. S., Vianna, L. M. (2005). Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. *Clinica Chimica Acta*. v. 358 p. 146–150.

Sato, Y., Asoh, T., Oizumi, K. (1998). High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with alzheimer's disease. *Bone*. v. 23, p. 555–557.

Schetinger, M. R. C., Porto, N. M., Moretto, M. B., Morsch, V. M., Rocha, J. B. T., Vieira, V., Moro, F., Neis, R. T., Bittencourt, S., Bonacorso, H. G., Zanatta, N. (2000). New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochemical Research*. v. 25, p. 949-955.

Schetinger, M. R., Vieira, V. L., Morsch, V. M., Balz, D. (2001). ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. v. 128, p. 731–41.

Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Bonan, C. D., Wyse, A. T. (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors*. v. 31, p. 77–98.

Slinin, Y., Paudel, M. L., Taylor, B. C., Fink, H. A., Ishani, A., Canales, M. T., Yaffe, K., Barrett-Connor, E., Orwoll, E. S., Shikany, J. M., Leblanc, E. S., Cauley, J. A., Ensrud, K. E., Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Research Group, 25-hydroxyvitamin D levels and cognitive performance and decline in elderly men. *Neurology*. v. 74, p. 33–41.

Sperlagh, B., Kittel, A., Lajtha, A., Vizi, E. S. (1995). ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme cytochemical evidence. *Neuroscience*. v. 66, p. 915–920.

Sutherland, M. K., Somerville, M. J., Yoong, L. K. K., Bergeron, C., Haussler, M. R., McLachlan, D. R. C. (1992) Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Molecular Brain Research*. v. 13, p. 239–250

Tiwari, V., Kuhad, A., Bishnoi, M., Chopra, K., (2009). Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavioural*. v. 93, p. 183-189.

Tota, S., Kamat, P. K., Awasthi, H., Singh, N., Raghurir, R., Nath, C., Hanif, K. (2009). Candesartan improves memory decline in mice: involvement of AT1 receptors in memory deficit induced by intracerebral streptozotocin. *Behavioural Brain Research*. v.199, p.235-40.

Tota, S., Awasthi, H., Kamat, P. K., Nath, C., Hanif, K. (2010). Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behavioural Brain Research*. v. 209, p. 73-79.

Viragh, P. A., Haglid, K. G., Celio, M R. (1989). Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis. *Proceedings of the National Academy Sciences*. v. 86, p. 3887–3890.

Wieraszko, A., Ehrlich, Y. H. (1994). On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. v. 63. p.1731–1738.

Wieraszko, A. (1996). Extracellular ATP, as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Warsaw)*. v. 56, p. 637–648.

Wilkins, C. H., Sheline, Y. I., Roe, C. M., Birge, S. J., Morris, J. C. (2006) Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. v.14, p. 1032-1040.

Yamazaki, Y., Kaneko, K., Fujii S., Kato, H., Ito, K. (2003). Long-term potentiation and long-term depression induced by local application of ATP to hippocampal CA1 neurons of the guinea pig. *Hippocampus*. v.13, p. 81–92.

Yegutkin, G. (2008). Nucleotide and nucleoside – converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1783, p. 673- 694.

Zimmermann, H., Mishra, S., Shukla, V., Langer, D., Gampe, K., Grimm, I., Delic, J., Braun, N. (2007). Ecto-Nucleotidases, molecular properties and functional impact. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. v. 73, p. 537- 566.

Legends

Scheme 1. Chemical structure of Vitamin D₃ [25-Hydroxyvitamin D₃ or (C₂₇H₄₄O₂)] (A); Structure of Streptozotocin [N-(methylnitrosocarbonyl)- α -D-glucosamine or (C₈H₁₅N₃O₇)] (B); Schematic representation in days of the experimental design (C). Day 0 indicates the day of the surgery (icv- STZ infusion).

Table 1. Serum levels of Vitamin D₃ (VD) in rats treated in doses of 12.5; 42 and 125 μ g/kg and submitted the icv-STZ (3mg/kg) injection. *Denotes significant difference to Vehicle, 12.5VD, SDAT and SDAT+VD12.5. Data are reported as means \pm S.E.M. with \pm 7 rats for group. Two-way ANOVA followed by Newman Keuls test.

Figure 1. Object Recognition index of rats with SDAT and Vitamin D₃ treated (VD) in different doses (μ g/Kg). *Indicates significant difference from Vehicle (P<0.05), #Indicates significant difference from SDAT (P<0.05). Data are reported as means \pm S.E.M. with \pm 7 rats for group. Two-way ANOVA followed by Newman Keuls test.

Figure 2. AChE activity in hippocampus synaptosomes of rats with Sporadic Dementia of Alzheimer Type (SDAT) and treated with Vitamin D₃ (VD) in different doses (μ g/ kg). *Indicates significant difference from the vehicle (P<0.05). #Indicates significant difference from SDAT (p<0.05). Each column represents mean \pm SEM (n=7). Results are expressed as μ mol AcSCh/mg protein (Two- way ANOVA followed by Bonferroni test).

Figure 3. ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in rats with Sporadic Dementia of Alzheimer Type (SDAT) and treated with Vitamin D₃ (VD) in different doses (μ g/Kg). *Indicates significant differences from the vehicle (P<0.05). #Indicates significant differences from SDAT (P<0.05). Each column represents mean \pm SEM (n=7). Results are expressed as nmol Pi/min/mg of protein (Two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

SCHEME 1

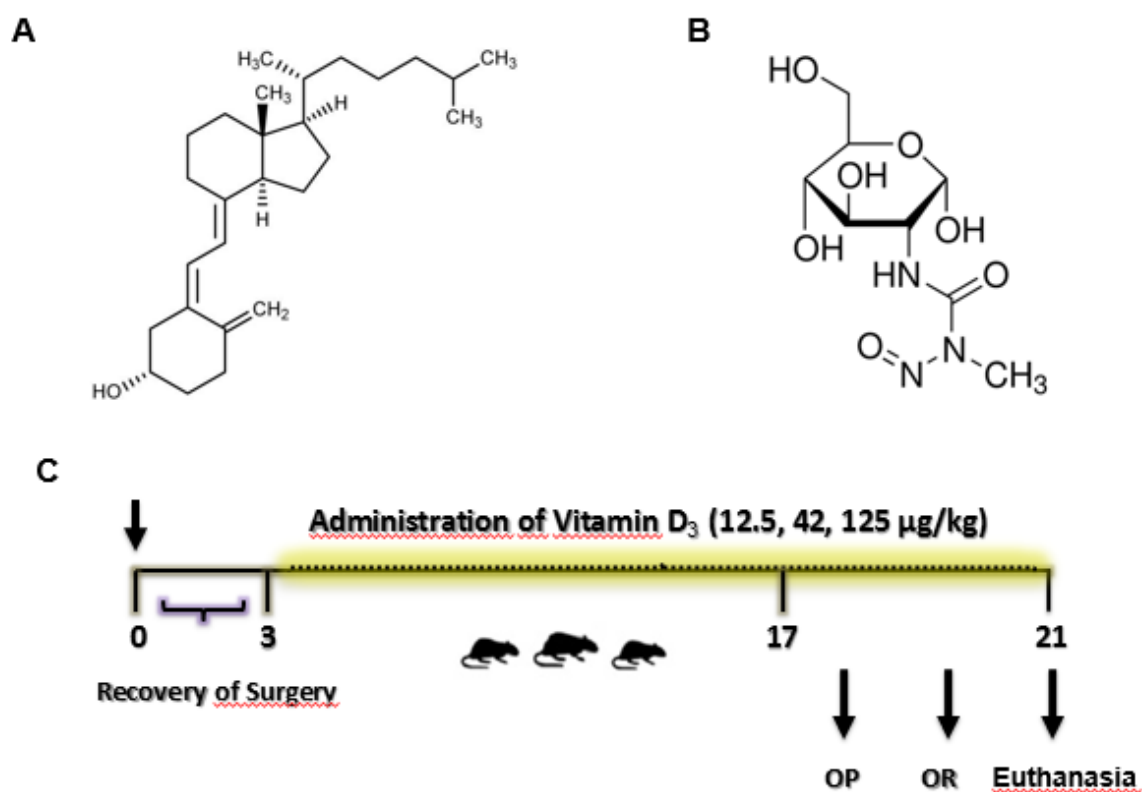


TABLE 1

Groups	Vitamin D levels (ng/mL)
vehicle	80.23 ± 5.326
12.5VD	91.57 ± 7.511
42VD	132.7 ± 22.78 *
125VD	150.4 ± 0.2026 *
SDAT	60.95 ± 9.498
SDAT+VD12.5	75.23 ± 3.821
SDAT+VD42	118.4 ± 19.96 *
SDAT+VD125	150.5 ± 0.3862 *

FIGURE 1

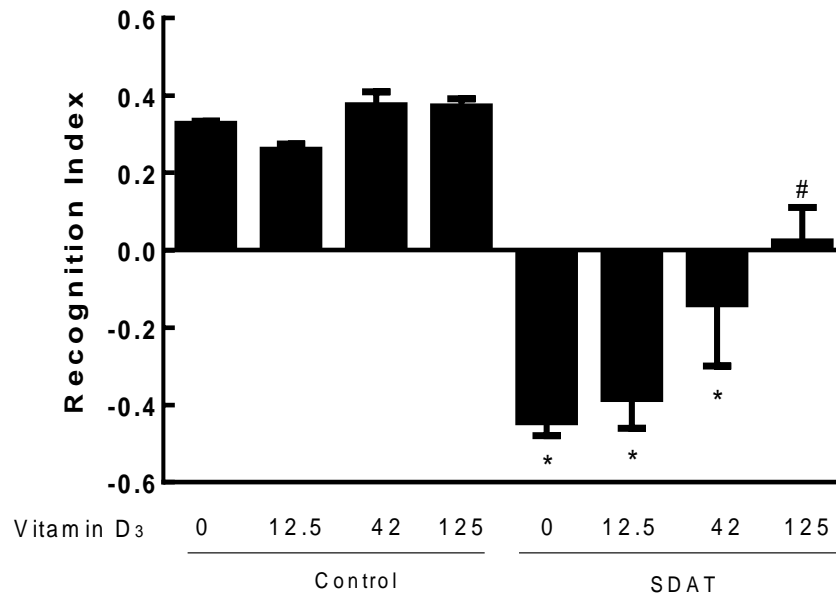


FIGURE 2

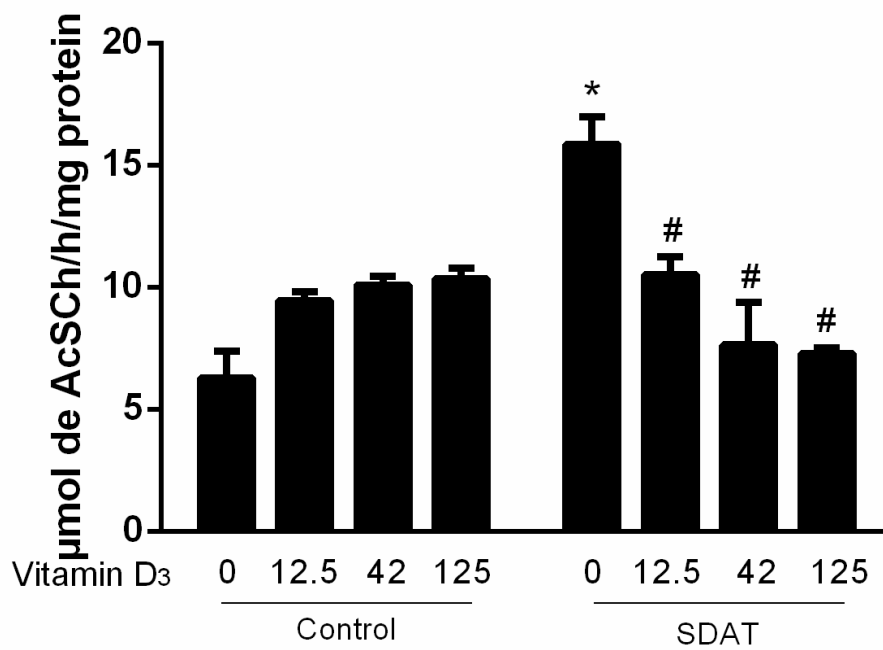
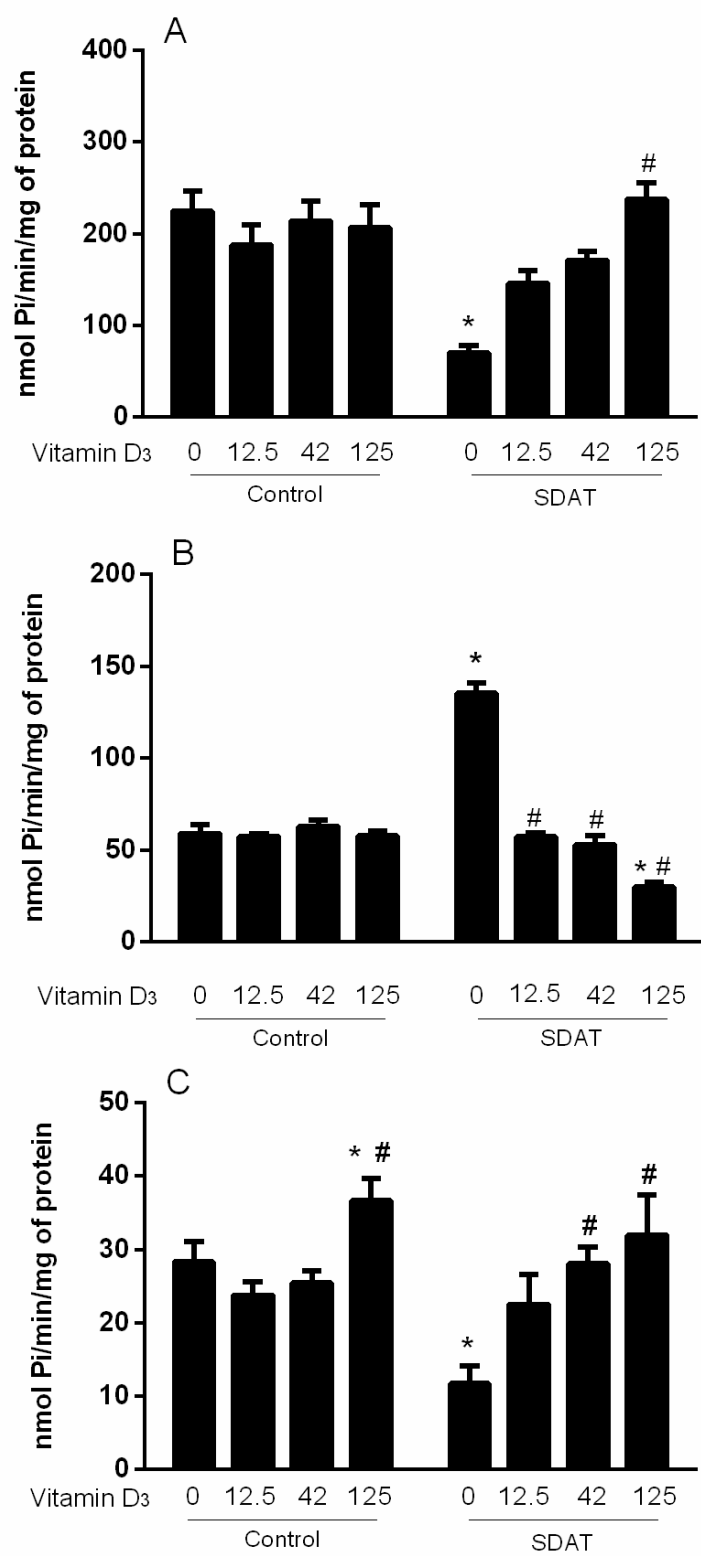


FIGURE 3



4. Conclusões

Conclusões

1) A injeção icv- STZ prejudicou a aquisição de memória nos animais, sendo que o tratamento com VD₃ foi capaz de diminuir os déficits de memória encontrados neste modelo, sugerindo um efeito neuroprotetor deste composto.

2) Foi observada um aumento na atividade da enzima AChE nos animais que receberam a injeção de STZ. Podemos sugerir que a injeção de icv-STZ causa anormalidades na função do receptor nicotínico de acetilcolina em hipocampo o que também poderia levar a problemas cognitivos e de memória.

3) Observamos uma diminuição na hidrólise de ATP e um aumento na hidrólise de ADP no hipocampo dos animais com demência. A administração da VD₃ foi capaz de reverter essas alterações observadas na enzima E-NTPDase. Além disso, esses animais apresentaram também uma redução na atividade da enzima E-5'-Nucleotidase, sendo que a VD₃ também foi capaz de reverter essa diminuição, sugerindo também que a VD₃ pode regular diretamente a atividade das ectonucleotidases.

REFERÊNCIAS:

ADLARD, P.A., JAMES, S. A. BUSH, A.L., MASTERS, C.L. Beta-Amyloid as a molecular therapeutic target in Alzheimer's disease. **Drugs Today (Barc)**, v.45, n.4, p.293-304, 2009.

AGRAWAL, R., TYAGI, E., SHUKLA, R., NATH, C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 779- 787, 2009.

AGRESTI, C. MEOMARTINI, M.E., AMADIO, S., AMBROSINI, E., VOLONTÉ, C. ALOISI, S., VISENTIN, S. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. **Brain Research Reviews**, v. 48, p. 157- 165, 2005.

AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S., BRADT, B., BAUER, J., COLE, G. M., COOPER, N.R., EIKELENBOOM, P.E.M., FIEBICH, B.L., FINCH, C.E., FRAUTSCHY, S., GRIFFIN, W.S., HAMPEL, H., HULL, M., LANDRETH, G., LUE, L., MRAK, R., MACKENZIE, I.R., MCGREER, P.L., O'BANION, M.K., PACHTER, J., PASINETTI, G.P.S.C., ROGERS, J., RYDEL, R., SHEN, Y., STREIT, W., STROHMEYER, R., TOOYOMA, I., VAN MUISWINKEL, F.L., VEERHUIS, R., WALKER, D., WEBSTER, S., WEGRZYNIAK, B., WENK, G., WYSS- CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology Aging**, v. 21, p. 383-421, 2000.

ALMERAS, L., EYLES, D., BENECH, P., LAFFITE, D., VILLARD, C., PATATIAN, A., BOUCRAUT, J., MACKAY- SIM, A., MCGRATH, J., FÉRON, F. Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: Implications for neuropsychiatric disorders. **Proteomics**, v. 7, p. 769-780, 2007.

ANNWEILER, C., SCHOTT, A.M., ALLALI, G., BRIDENBAUGH, S.A., KRESSING, R.W., ALLAIN, P., HERRMANN, F.R., BEAUCHET, O., Association of vitamin D deficiency with cognitive impairment in older women, Cross-sectional study. **Neurology**, v. 74, p. 27–32, 2010.

APPLEYARD, M.E. Non- Cholinergic functions of acetylcholinesterase. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. 749- 755, 1992.

AWASTHI, H., TOTA, S., HANIF, K., NATH, C., SHUKLA, R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life Sciences**, v. 86, p. 87-94, 2010.

BAI, F., WITZMANN, F.A. Synaptosome proteomics. **Subcellular Biochemistry**, v.43, p.77-98, 2007.

BARREDA, E.G., AVILA, J. Is tau a suitable therapeutic target in tauopathies? **World Journal of Biological Chemistry**, v. 1, p. 81–84, 2011.

BERCHTOLD, N. C., COTMAN, C. W. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. **Neurobiology Aging**, v.19, n.3, p.173-89, 1998.

BERNARDI, L., GERACITANO, S., COLAO, R., PUCCIO, G., GALLO, M., AFONSSI, M., FRANGIPANE, F., CURCIO, S.A.M, MIRABELLI, M., TOMAINO, C., VASSO, F., SMIRNE, N., MALETTA, R., BRUNI, A.C. AbetaPP A713T mutation in late onset Alzheimer's disease with cerebrovascular lesions. **Journal of Alzheimers Disease**, v.17, n.2, p.383- 389, 2009.

BIANCHI, V., SPYCHALA, J. Mammalian 5'-nucleotidases. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46195- 46198,. 2003.

BIOGENNESE, F., LÉVESQUE, S.A., LULKUSKL, F., LECKA, J., ROBSON, S.C., FERNANDES, M.J., SEVEGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v. 43, p. 5511- 5519, 2004.

BLOKLAND A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Research**, v. 21, p. 285–300, 1995.

BREWER, L.D., PORTER, N.M., KERR, D.S., LANDFIELD, P.W., THIBAUT, O. Chronic 1,25- (OH)₂vitamin D₃ treatment reduces Ca²⁺-mediated hippocampal biomarkers of aging. **Cell Calcium**, v. 40, p. 277-286, 2006.

BOUILLON, R., CARMELIET, G., DACI, E., SEGAET, S. & VERSTUYF, A. Vitamin D metabolism and action. **Osteoporosisi**, v. 8, p. 13-19, 1998.

BRUNEAU, E.G., AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Molecular Neurobiology**, v. 34, p. 137-51, 2006.

BUELL JS, DAWSON- HUGUES, B. Vitamin D and neurocognitive dysfunction: preventing Decline? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 415– 422, 2008.

BUELL, J.S., DAWSON-HUGHES, B., SCOTT, T.M., WEINER, D.E., DALLAL, G.E., QUI, W.Q., BERGETHON, P., ROSENBERG, I.H., FOLSTEIN, M.F., PATZ, S., BHADLIA, R.A., TUCKER, K.L. 25-hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. **Neurology**, v. 74, p. 18–26, 2010.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 659– 797, 2007a.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 1471- 1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends Pharmacological Science*, v. 27, p. 166- 176, 2006.

CANADIAN STUDY OF HEALTH AND AGING: STUDY METHODS AND PREVALENCE OF DEMENTIA. *Canadian Medical Association Journal*, v. 150, p. 899– 913, 1994.

CEKIC, M., SAYEED, I., STEIN, D.G. Combination treatment with progesterone and vitamin d hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 30, p. 158-172, 2009.

CHACÓN, M.A., REYES, A. E. INESTROSA, N.C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *Journal Neurochemistry*, v. 87, p. 195- 204, 2003.

CHEN, T.C., CHIMEH, F., LU, Z., MATHIEU, J.PERSON, K.S., ZHANG, A., KOHN, N., MARTINELLO, S., BERKOWITZ, R., HOLICK. M.F. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 460, p. 213– 217, 2007.

CORRADA, M.M., BROOKMEYER, R. BERLAU, D., PAGANINI- HILL, A., KAWAS, C.H. Prevalence of dementia after age 90: results from the 90+ study. *Neurology*, v.71, n.5, p.337-43, 2008.

CHRISTAKOS, S., AJIBADE, D.V., DHAWAN, P., FECHNER, A.J., MADY, L.J. Vitamin D: metabolism. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v. 39(2), p. 243–253, 2010.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*, v. 38, n. 2, p. 107- 125, 2001.

CUNHA, R. A., Ribeiro, J. A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sciences**, v. 68, n. 2, p.119- 137, 2000.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v.68, p.1545-1555, 2001.

DE LORENZO S., VEGGETTI, M., MUCHNICK, S., LOSAVIO, A. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 142, p. 71- 81, 2006.

DESCARRIES, L., GISIGER, V., STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 53, p. 603- 625, 1999.

DI VIRGILIO, F., CHIOZZI, P., FERRARI, D., FALZONI, S., SANZ, J.M., MORELLI, A., TORBOLI, M., BOLOGNESI, G., BARICORDI, R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, p. 587- 600, 2001.

DUNWIDDIE, T., MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31- 55, 2001.

DURSUN, E., GEZEN-AK, D., YILMAZER, S. A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-b and preventing the amyloid-b induced alterations by vitamin D in cortical neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 23, p. 207–219, 2011.

DURSUN, E. GEZEN- AK, D., YLMAZER, S. A New Mechanism for Amyloid-_β Induction of iNOS: Vitamin D-VDR Pathway Disruption. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 36, p. 459– 474, 2013.

EYLES, D.W., SMITH, S., KINOBE, R., HEWISON M., MCGRATH, J.J. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, p. 21- 30, 2005.

FERNANDES DE ABREU, D.A., EYLES, D., FE'RON, F. Vitamin D, a neuroimmunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34S, p. 265- 277, 2009.

FIELDS, R.D. BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 423- 436, 2006.

GARCION, E., WION-BARBOT, N., MONTERO-MENEI, C., BERGER, F., WION, D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, p. 100- 105, 2002.

GAO, S., HENDRIE, H. C., HALL, K.S., HUI, S. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. **Archives of General Psychiatry**, v.55, p.809-815, 1998.

GEZEN- AK, D., DURSUN, E., ERTAN, T., HANAGASI, H., GURVIT, H., EMRE, M., EKER, E., OZTURK, M., ENGIN, F., YLMAZER, S. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 212, p. 275-282, 2007.

GEZEN- AK, D. DURSUN, E. YLMAZER, S. Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement. **Neurological Sciences**, v. 34, p. 1453– 1458, 2013.

GIACOBINI, E. New trends in cholinergic therapy for Alzheimer disease: nicotinic agonists or cholinesterase inhibitors? **Progress in Brain Research**, v. 109, p. 311- 323, 1996.

GRISARU, D., STERNFELD, M., ELDOR, A., GLICK, D., SOREG, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 672- 686, 1999.

GOTTI, C., CLEMENTI, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Progress in Neurobiology**, v. 74, p. 363- 369, 2004.

GUTIERRES, J.M., CARVALHO, F.B., SCHETINGER, M.R.C., MARSICO, P. AGOSTINO, P., RODRIGUES, M.V., RUBIN, M.A., SCHMATZ, R., DA SILVA, C.R., COGNATO, G.P., FARIAS, J.G., SIGNOR, C., MORSCH, M.V., MAZZANTTI, C.M., BOGO, M., BONAN, C.D., SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sciences**, v. 96, p. 7– 17, 2014.

HESS, A.F. On the induction of antirachitic properties in rations by exposure to light. **Sciences**. v. 60, p. 269, 1924.

HOLICK, M.F. Vitamin D: A millennium perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 296– 307, 2003.

HOLICK, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2062– 2072, 2006.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357. P; 266- 281, 2007.

HOLICK, M.F.; CHEN, T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 1080S- 1086S, 2008.

HOYER, S., LANNERT, H., NÖLDNER, M. CHATTERJEE S.S. Damaged neuronal energy metabolism and behavior are improved by Ginkgo biloba extract (EGb 761). **Journal of Neural Transmission**, v. 106, n. 11-12, p. 1171- 1188, 1999.

HUME, E.M., SMITH, H.H. The effect of irradiation of the environment with ultra-violet light upon the growth and calcification of rats, fed on a diet deficient in fat-

soluble vitamins. The part played by irradiated sawdust. **Biochemistry Journal**, v. 18, p. 1334-1348, 1924.

HUNSAKER, M.R., ROGERS, J.L., KESNER, R.P. Behavioral characterization of a transection of dorsal CA3 subcortical efferents: comparison with scopolamine and physostigmine infusions into dorsal CA3. **Neurobiology of Learning Memory**, v.88, n.1, p.127-36, 2007.

ILLES, P., RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, p. 5- 7, 2004.

KALUEFF, A.V, TUOHIMAA, P. Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, p. 12– 19, 2007.

KAWASHIMA, K., FUJII, T. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacological and Therapeutics**, v.86, p.29-48, 2000.

KRUEGER, L. E. e SALTHOUSE, T. A. Influence of cognitive abilities and age on word recall performance across trials and list segments. **The American Journal of Psychology**, v.124, n.3, p.291-300, 2011.

LING, K.K.Y. et al. ATP potentiates the formation of AChR aggregate in the co-culture of NG108-15 cells with C2C122 myotubes. **FEBS Letters**, v.579, p.2469-2474, 2005.

LIU, Y., LIU, F., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I., GONG, C.X. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. **FEBS Letters**, v.582, n.2, p.359-64, 2008.

LIU, E., MEIGS, J.B., PITTAS, A.G., MCKEOWN, N.M., ECONOMOS, C.D., BOOTH, S.L., JAQUES, P. F. Plasma 25-hydroxyvitamin D is associated with

markers of the insulin resistant phenotype in nondiabetic adults. **Journal of Nutrition**, v. 139 p. 329-34, 2009.

LIU, Y., LUI, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., GONG, C.X. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. **The Journal of Pathology**, v.225, n.1, p.54-62, 2011.

LÓPEZ, E. ARCE, C., OSET- GASQUE, M.J., CAÑADAS, S., GANZÁLEZ, M.P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 940- 951, 2006.

LUNKES, G.I., LUNKES, D., STEFANELLO, F., MORSCH, A., MORSCH, V.M., MAZZANTTI, C.M., SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189- 194, 2003.

MALMSJO, M., EDVINSSON, L., ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, p.173- 180, 2000.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.31-41, 1993.

MCLARNON, J. G., CHOI, H.B., LUE, L.F., WALKER, D.G. KIM, S.U. Perturbations in calciummediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. **Journal of Neurosciences**, Res. v. 81, p. 426– 435, 2005.

MCCAN, J.C., AMES, B.N. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? **FASEB Journal**, v. 22, p. 982– 1001, 2008.

MICHON, A. The concept of mild cognitive impairment: relevance and limits in clinical practice. **Frontiers of Neurology and Neurosciences**, v.24, p.12-9. 2009.

MILLAR, J.K., JAMES, R., CHRISTIE, S., PORTEOUS, D.J. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v.30, p.477-484, 2005.

MEERZA, D., NASEEM, I., AHMED, J. Can vitamin D be a potential treatment for type 2 diabetes mellitus. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 4, p. 245- 248, 2010.

MEHAN, S., ARORA, R., SEHGAL, V., SHARMA, D., SHARMA, G. Dementia – A Complete Literature Review on Various Mechanisms Involved in Pathogenesis and an Intracerebroventricular Streptozotocin Induced Alzheimer's Disease. **Inflammatory Diseases – Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases**, 2012.

MESULAM, M.M. GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v.110, p.627-639, 2002.

MU, Y., GAGE, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, p. 85–94, 2011.

MULLER, D., NITSCH, R.M., WURTMAN, R.J., HOYER, S. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. **Journal of Neural Transmission**, v.105, n.10-12, p.1271-81, 1998.

MOORE, A. H., O'BANION, M. K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1627-1656, 2002.

NATHAN, C., CALINGASAN, N., NEZEZON, J., DING, A., LUCIA, M. S., LA PERLE, K., FUORTES, M., LIN, M., EHRT, S., KWON, N. S., CHEN, J., VODOCOTZ, Y., KÍANI, K., BEAL, M. F. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1163-1169, 2005.

NGUYEN, M.L., COX, G.D., PARSONS, S.M. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. **Biochemistry**, v. 37, n. 38, p. 13400- 13410, 1998.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v. 2, p. 1013-1067, 2002.

OUDSHOORN, C., MATTACE-RASO, F.U., VAN DER VELDE, N., COLIN, E.M., VAN DER CAMMEN, T.J. Higher serum vitamin D3 levels are associated with better cognitive test performance in patients with alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 25, p. 539–543, 2008.

PATEL, A.B., ROTHMAN, D.L., CLINE, G.W., BEHAR, K.L. Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex in vivo following acute GABA-transaminase inhibition. **Brain Research**, v. 919, p. 207-20, 2001.

PATHAN, A.R., VISWANADA, B., SONKUSARE, S.K., RAMARAO, P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sciences**, v.79, n.23, p. 2209-16, 2006.

PEDROSA, M.A.C, CASTRO, M.L. Papel da Vitamina D na função neuromuscular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 495- 502, 2005.

PERRY, E. WALKER, M., GRACE, J., PERRY, R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 273- 280, 1999.

PRZYBLSKI, R.J., BINKLEY, N.C. Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, 202–205, 2007.

RAND, J.B. Acetylcholine. **WormBook**, p. 1-21, 2007.

REED, T.T., PIERCE, W.M., W.R., D.A. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. **Brain Research**, v.1274, p.66-76. 2009.

ROBSON, S.C., SÉVIGNY, J., ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function, relationships and pathophysiology significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409- 430, 2006.

ROGERS, J. L., KESNER, R. P. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p. 102- 107, 2004.

SACRAMENTO, E.F., SILVA, B.B. Vitaminas e minerais. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A., 2006, cap.93, p. 913-920.

SALKOVIC- PETRISIC, M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. **Periodicum Biologorum**, v.110, n.1, p.17-25, 2008.

SALTHOUSE, T.A. Memory aging from 18 to 80. **Alzheimer Disease Association Disorder**, v.17, p.162-167, 2003.

SARTER, M., PARIKH, V. Choline transporters cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews**, v. 6, p. 48- 56, 2005.

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

SCHETINGER, M.R.C., VIEIRA, V.L., MORSCH, V.M., BALZ, D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 128, n. 4, p. 731-741, 2001.

SCHETINHER, M.R.C. MORSCH, V.M., BONAN, C.D., WYSE, A.T. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77–98, 2007.

SCHMATZ, R. PEREIRA, L.B., STEFANELLO, N., MAZZANTI, C., SPANEVELLO, R., GUTIERRES, J., BAGATINI, M., MARTINS, C.C., ABDALLA, F.H., SERRES, J. D.S., ZANINI, D., VIEIRA, J.M., CARDOSO, A.M., SCHETINHER, M.R.C., MORSCH, V.M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin- induced diabetic rats. **Biochimie**, p., 1- 10, 2011.

SHI, J., KUKAR, T., WANG, C., LI, Q., CRUZ, P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17472- 17478, 2001.

SLININ, Y., PAUDEL, M.L., TAYLOR, B.C., FINK, H.A., ISHANI, A., CANALES, M.T., YAFEE, K., BARRETT-CONNOR, E., ORWOLL, E.S., SHOKANY, J.M., LEBLANC, E.S., CAULEY, J.A., ENSRUD, K.E., Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Research Group, Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Research Group. 25-hydroxyvitamin D levels and cognitive performance and decline in elderly men. **Neurology**, v. 74, p. 33–41, 2010.

SMALL, D.H., MICHAELSON, S., SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v.28, p. 453- 483, 1996.

SOILU-HÄNNIENEN, M., LAAKSONEN, M., LAITINEN, I., ERÄLINNA, J.P., LILIUS, E.M., MONONEM, I. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, p.152– 157, 2013.

SONNENBERG, J., LUINE, V.N., KREY, L.C., CHRISTAKOS, S. 1,25 dihydroxyvitamin D3 treatment results in increased choline acetyltransferase activity in specific brain nuclei. **Endocrinology**, v. 118, p. 1433- 1439, 1986.

SONKUSARE, S., SRINIVASAN, K., RAMARAO, P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Life Sciences**, v.77, n.1, p.1-14. 2005.

SOREQ, H., SEIDMAN, S. Acetylcholine-neuro roles for an old actor. Nature Reviews. **Neuroscience**, v. 2, p. 294- 302, 2001.

SOUBELET, A. SATHOUSE, T.A. Correlates of level and change in the Mini-Mental State Examination. **Psychological Assessment**, v.23, n.4, p.811-8, 2011.

STEENBOCK, H. The induction of growth promoting and calcifying properties in a rat by exposure to light. **Science**, v. 60, p. 224- 225, 1924.

STEFANELLO, N., SCHMATZ, R., PEREIRA, L.B., RUBIN, M. A., ROCHA, J.B.T., FACCO, G., PEREIRA, M.E., MAZZANTI, C.M.A., PASSAMOINTI, S., RODRIGUES, M.V., CARVALHO, F.B., ROSA, M.M., GUTIERRES, J.M., CARDOSO, A.M., MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C. Effects of chlorogenic

acid, caffeine and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetics rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 388, p.277- 286, 2014.

STEVENS, B. PORTA, S., HAAK, L.L., GALLO, V., FIELDS, R.D. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potential. **Neuron**, v. 36, p. 855- 868, 2002.

STIX, G. Alzheimer's: forestalling the darkness. **Scientific American**,. v. 302, p. 50-57, 2010.

TOTA, S., AWASTHI, H., KAMAT, P.K., NATH, C., HANIF, K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 209, p. 73-79, 2010.

VAN der ZEE, E.A., LUITEN, P.G.M., Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in the relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 58, p. 409- 472, 1999.

WANG, L., HARA, K., VAAN BAREM, J.M., PRICE, J.C., BEECHAM, G.W., GALLINS, P.J., WHITEHEAD, P.L., WANG, G., LU, C., SLIFER, M.A., ZHÜCNER, S., MARTIN, E.R., MASH, D., HAINES, J.L., PERICAK- VANCE, M.A., GLIBERT, J.R. Vitamin D receptor and Alzheimer's disease: a genetic and functional study. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 1844.e1– 1844.e9, 2012.

WHARTON, S.B., O'CALLAGHAN, J.P., SAVVA, G.M., NICOLL, J.A.R., MATTEWS, F., SIMPSON, J.E., FORSTER, G., SHAW, P.J., BRAYNE, C., INCE, P.G. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.27, n.5, p.465-73, 2009.

WILKINS, C.H., SHELINE, Y.I., ROE, C.M., BIRGE, S.J., MORRIS, J.C. Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 14, p. 1032–1040, 2006.

WINK, M. BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A.S.K., CASALI, E.A., KARL, J., BARRETO- CHAVES, E.L., SARKIS, J.J.F., BATATISNI, A.M.O. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocytes cultures from different brain regions. **Neurochemistry International**, v. 43, p. 621- 628, 2003.

WORTAMANN, M. Dementia: a global health priority – highlights from na ADI ad world Health Organization report. **Alzheimer's Research & Therapy**, v.4, n.5, p.40, 2012.

YEGUTKIN G. Nucleotide and nucleoside conserving ectoenzymes: important modulators of purinergic cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673- 694, 2008.

ZAWIA, N.H., LAHIRI, D. K., CARDOSO- PELAEZ, F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.46, n.9, p.1241-9, 2009.

ZEHNDER, D., BLAND, R., WILLIAMS, M.C., MCNINCH, R.W., HOWIE, A.J., STEWART, P.M., HEWISON, M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolim**, v. 86, p. 888– 894, 2001.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Developmental Research**, v. 52, p. 44- 56, 2001.

ZIMMERMANN, H. MISHRA, S.K., SHUKLA, V., Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537- 566, 2007.

ZIMERMANN, H., ZEBICH, M., STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, p. 437– 502, 2012.