

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA EM
UM MODELO *in vitro* DE TOXICIDADE INDUZIDA PELO PEPTÍDEO β -
AMILOIDE**

THALINE DA SILVA

Porto Alegre

2012

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA ATORVASTATINA EM
UM MODELO *in vitro* DE TOXICIDADE INDUZIDA PELO PEPTÍDEO β -
AMILOIDE**

Thaline da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2012

AGRADECIMENTOS

À Professora Christianne, pela oportunidade e generosidade em abrir as portas de seu laboratório e oferecer, além da estrutura física, amizade e carinho. Muito obrigada por ter me orientado e por ter me proporcionado seis anos de aprendizagem. Sinto-me lisonjeada em ter feito parte do teu grupo.

Aos colegas do laboratório 23, pela ajuda, pelos momentos de descontração e pela troca de experiências.

À Professora Cristiane Matté e grupo, que trouxeram alegria ao cotidiano do laboratório.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Às três pessoas mais importantes da minha vida: meu pai, Edvi; minha mãe, Lucila e minha irmã, Thaise. Muito obrigada por tudo. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida. Amo vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS

A β – peptídeo beta-amiloide (*Amyloid-beta peptide*)

A β 1-42 – peptídeo beta-amiloide contendo 42 aminoácidos

A β 25-35 – fragmento contendo 11 aminoácidos (do 25 ao 35) do peptídeo beta-amiloide de 42 aminoácidos

Akt/PKB – Homóloga Celular ao Oncogene Viral v-Akt/ proteína cinase B (*protein kinase B*)

Apo E – apolipoproteína E

APP – proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)

sAPP α - forma secretada da APP α

sAPP β – forma secretada da APP β

ATP - adenosina-5'-trifosfato

BACE -1 – β -secretase (*β -site of beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*)

Cdk5 – cinase dependente de ciclina-5 (*Cyclin-dependent kinase 5*)

DA – Doença de Alzheimer

DCF – diclorofluoresceína (*Dichlorofluorescein*)

DCFH2-DA –2', 7'– diclorofluoresceína diacetato (*2', 7'-dichlorofluorescein diacetate*)

DMSO – dimetilsulfóxido

ERK – cinase regulada por sinais extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

FPP – farnesilpirofosfato (*farnesyl pyrophosphate*)

GFAP – proteína glial fibrilar ácida (*Glial Fibrillary Acid Protein*)

GGPP – geranil-geranilpirofosfato (*geranylgeranyl pyrophosphate*)

GSK-3 β – glicogênio sintase cinase-3 beta (*Glycogen Syntase Kinase-3 beta*)

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

4HNE – 4-hidroxinonenal

IL – interleucina (*interleukin*)

IL-1 β – interleucina-1 beta (*interleukin-1 beta*)

IL-6 – interleucina-6 (*interleukin-6*)

IP – iodeto de propídeo (*Propidium iodide*)

LRP-1 - proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade –
1 (*LDL-Receptor-related Protein-1*)

LTP – potenciação de longa duração (*Long Term-Potential*)

MAPs – proteínas associadas aos microtúbulos (*Microtubule Associated
Proteins family*)

MAPK – proteína cinase ativada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein
Kinase*)

NF κ B – fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

NFTs – emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles*)

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

PHFs – filamentos helicoidais pareados (*Paired Helical Filaents*)

PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PS – presenilina (*Presenilin*)

ROS – espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

SNC – sistema nervoso central

SV – vesícula sináptica (*synaptic vesicle*)

TNF α - fator de necrose tumoral alfa (*Tumoral Necrosis Factor- alpha*)

Wnt – família de proteínas glicosiladas ricas em cisteína derivadas do gene *Wingless* de *Drosophila* e do gene *Int-1* de camundongo

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa relacionada à idade, que se caracteriza pela perda progressiva da memória, pela incapacidade de realizar atividades do cotidiano e alterações de personalidade. Esta doença é caracterizada histopatologicamente pela presença de placas senis e dos emaranhados neurofibrilares e também pela perda sináptica e morte neuronal. Além disso, já está bem estabelecido que a neuroinflamação é uma característica proeminente do cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, no qual respostas inflamatórias desempenham um papel significativo na progressão da doença. Infelizmente, os fármacos utilizados no tratamento desta doença são limitados a inibidores da acetilcolinesterase que não têm impacto na patogênese da doença. As estatinas, que pertencem à classe de drogas redutoras de colesterol, têm sido propostas como novos agentes úteis na terapia da doença de Alzheimer devido às suas propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias. Neste estudo, avaliamos o efeito neuroprotetor da atorvastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β 25-35 em culturas organotípicas de hipocampo de ratos. As culturas foram tratadas com 2,5 μ M ou 5 μ M de atorvastatina e então expostas a 25 μ M do peptídeo A β 25-35 durante 48h. Também foi investigado o envolvimento da via de sinalização PI3K, as respostas oxidativas, a ativação astrogliar, e os níveis de sinaptofisina (marcador pré-sináptico) e de citocinas. O tratamento com atorvastatina impediu a lesão celular induzida pela exposição ao A β 25-35, reduziu as respostas inflamatórias e oxidativa e aumentou o imunoconteúdo de sinaptofisina. Além disso, a atorvastatina preveniu significativamente a ativação da GSK-3 β , a ativação astrogliar e o aumento nos níveis de TNF- α e IL-6. Tomados em conjunto, estas observações sugerem que a atorvastatina pode proporcionar uma eficaz ação neuroprotetora contra a neurotoxicidade induzida pelo A β através da ativação da via de sinalização PI3K/AKT e atenuação das respostas oxidativas e neuroinflamatórias, podendo ser uma potencial terapia a ser usada na DA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is an age-related neurodegenerative disorder characterized by progressive memory loss, inability to perform the activities of daily living and personality changes. AD is characterized histopathologically by the presence of senile plaques, neurofibrillary tangles, synapse loss and neuronal death. Moreover, it is now recognized that neuroinflammation is a prominent feature of Alzheimer's disease brain, with inflammatory responses playing a significant role in modulating disease progression. Unfortunately, drugs effective for this disease are limited to acetylcholinesterase inhibitors that do not impact disease pathogenesis. Statins, which belong to the class of cholesterol-reducing drugs, were proposed as novel agents useful in AD therapy due the neuroprotective and anti-inflammatory properties that they have. In this study, we evaluated the neuroprotective effect of atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, against A β 25-35 peptide induced toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. The cultures were treated with 2.5 μ M or 5 μ M of atorvastatin and then exposed to 25 μ M of A β 25-35 for 48h. We also investigated the involvement of PI3K signaling pathway, oxidative responses, astroglial activation, and synaptophysin (pre-synaptic marker) and cytokines levels on the atorvastatin protection against β -amyloid-induced toxicity. Atorvastatin treatment prevented the cell damage induced by the exposure to peptide A β 25-35, reduced inflammatory and oxidative responses and increased the immunocontent of synaptophysin. In addition, atorvastatin significantly prevented the activation of GSK-3 β , the astroglial activation and the β -amyloid-induced increase in TNF- α and IL-6 levels. Taken together, these observations suggest that atorvastatin may provide an effective neuroprotective action against neurotoxicity induced by A β through the activation of the PI3K/AKT signaling pathway and attenuation of oxidative responses and neuroinflammation, and could be a potential drug used on Alzheimer disease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Alzheimer	1
1.2 Terapia.....	8
1.3 O peptídeo A β e o estresse oxidativo.....	9
1.4 Os mediadores inflamatórios na doença de Alzheimer	10
1.5 O peptídeo A β e a via de sinalização celular da PI3K.....	12
1.6 As estatinas.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. RESULTADOS	18
3.1Capítulo I: artigo científico a ser submetido ao periódico <i>Neurochemistry International</i>	18
Atorvastatin prevents β -amyloid neurotoxicity in organotypic hippocampal slice culture: involvement of PI3K pathway, oxidative stress and neuroinflammation.....	19
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÕES	70
6. PERSPECTIVAS	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS	89
8.1 Lista de figuras.....	89
8.2 Normas do periódico <i>Neurochemistry International</i>	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência entre a população idosa, correspondendo a 60-70% de todos os casos (PHILIPSON et al., 2010). Nas últimas décadas, a humanidade vem passando por uma visível transição demográfica, sendo que a população está deixando de ser formada predominantemente por jovens e adultos para ser composta por pessoas idosas. Embora esta observação demonstre um avanço na qualidade de vida, ela também alerta para a possibilidade de um significativo aumento no número de pessoas acometidas pelos chamados “males da idade”, dentre eles, a DA, uma vez que o envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento desta doença. Levando-se em conta projeções que indicam que a população mundial com mais de 80 anos será de 300 milhões em 2050, estima-se que, em menos de 50 anos, a DA acometerá mais de 100 milhões de pessoas (SUH e CHECLER, 2002). Dados recentes indicam que em 2011 mais de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo apresentaram a DA (QUERFURTH e LAFERLA, 2010; ITTNER e GOTZ, 2011). Devido a essa abrangência, a DA deixou de ser apenas um problema restrito ao núcleo familiar, convertendo-se em uma questão de saúde pública, pelo significativo impacto econômico e social que desencadeia. Calcula-se que nos EUA cerca de 720 bilhões de dólares serão gastos em 2030 em cuidados prestados diretamente aos pacientes (<http://www.alzheimermed.com.br>). Em vista disto, torna-se essencial compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença bem como desenvolver novas estratégias terapêuticas capazes de frear a evolução da DA.

A DA foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão Alois Alzheimer em 1906, durante o 37º Congresso do Sudoeste da Alemanha de Psiquiatria, na cidade de Tübingen. Na sua conferência, Alzheimer definiu a doença como uma patologia neurológica, que cursa com demência e destacou alguns sintomas clínicos como perda de memória, alterações comportamentais, e dificuldade para realizar tarefas cotidianas (MÖLLER e GRAEBER, 1998; GOEDERT e SPILLANTINI, 2006). A primeira paciente diagnosticada com a DA, Auguste D., de 51 anos, admitida por Alzheimer no Hospital de Frankfurt em 1901, apresentava marcante déficit cognitivo e progressiva perda de memória. Outros sintomas incluíam delírios, alterações no comportamento e progressiva perda da linguagem (ALZHEIMER et al., 1907; BURNS et al., 2002).

A perda da memória, um dos principais sintomas clínicos, é o que faz com que o diagnóstico da DA seja tão impactante tanto para o paciente quanto para seus familiares. A incapacidade de recordar eventos recentes, enquanto lembranças mais antigas permanecem claras, é um dos primeiros sinais da doença. No entanto, conforme a doença progride, as memórias novas e antigas vão desaparecendo gradualmente. Esta perda incontrolável das lembranças de uma vida inteira e conseqüentemente da identidade individual, fez com que a DA fosse definida por muitos como o “mal do século”.

A DA é uma doença multifatorial em que 90-95% dos casos, é esporádico, de início tardio e está relacionada a diversos fatores de risco tais como envelhecimento, sexo feminino, baixo nível educacional, tabagismo, sedentarismo e doenças crônicas (diabete mellitus, hipertensão, isquemia cerebral, hipercolesterolemia). Cerca de 5% dos casos são de origem genética,

sendo que, nesta situação, o início da doença é mais precoce e estão incluídas anormalidades em genes relacionados à proteína precursora amilóide (APP – *Amyloid Precursor Protein*), bem como àqueles relacionados ao seu processamento, tais como a presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) (CITRON, 2002; CASSERLY e TOPOL, 2004; BIENNOW et al., 2006). Além disso, níveis elevados da apolipoproteína E4 (ApoE ϵ 4) contribuem para o acúmulo do peptídeo β -amilóide (A β). A ApoE participa da remoção do peptídeo A β , via proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade – 1 (LRP-1 – *LDL-Receptor-related Protein-1*), por meio da formação do complexo ApoE/A β . Como a ApoE ϵ 4 possui uma menor afinidade pelo A β , há uma menor remoção deste, promovendo a formação das placas senis (BU, 2009).

Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas para um diagnóstico definitivo da DA. Esse só é obtido com a demonstração, *pot mortem*, das alterações histopatológicas encontradas por Alzheimer há mais de um século: os emaranhados neurofibrilares (NFTs) e as placas senis (SPs) (LAFERLA et al., 2007). Na prática clínica, um provável diagnóstico da DA é realizado através de exclusão de outras possíveis causas de demências e da aplicação de testes neuropsicológicos específicos (BRAAK e BRAAK, 1998).

Os emaranhados neurofibrilares intracelulares são inclusões filamentosas encontradas em neurônios piramidais, compostos pela proteína *tau* hiperfosforilada (ARRIGADA et al., 1992; HAMDAME et al., 2003; SELKOE, 2003). Esta fosfoproteína, pertencente à família das MAP's (*microtubule associated proteins*), é altamente expressa no cérebro, principalmente em neurônios e tem como principal função estabilizar os microtúbulos, que são

responsáveis por modular a organização funcional do neurônio. Sua atividade é regulada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação. A proteína *tau* possui mais de 30 sítios de fosforilação, podendo ser fosforilada por enzimas cinases diversas, tais como cinase 5 dependente de ciclina (cdk5) e a glicogênio-sintase-cinase-3 β (GSK-3 β) (IQBAL et al., 2005; IQBAL et al., 2009).

Na DA, a *tau* hiperfosforilada torna-se insolúvel, desprende-se dos microtúbulos e acumula-se intracelularmente sob a forma de filamentos helicoidais pareados (PHIEL et al., 2003; QUERFURTH e LAFERLA, 2010), como pode ser visualizado na Figura 1.

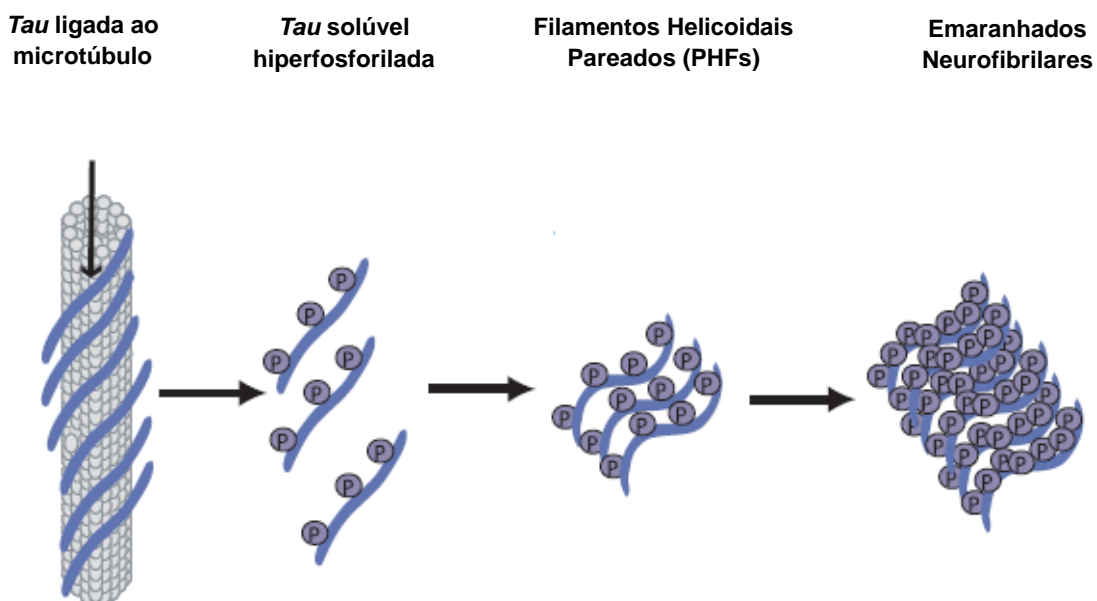


Figura 1. Hiperfosforilação da *tau* e formação dos emaranhados neurofibrilares. (Adaptado de GOLDE, 2006).

A perda da estabilização dos microtúbulos, devido à hiperfosforilação da *tau*, pode levar à desestruturação do citoesqueleto, alterando assim o transporte neuronal, contribuindo tanto para a disfunção sináptica quanto para a neurodegeneração (SELKOE e SCHENK, 2003; TROJANOWSKI et al., 2005). Além disso, o aumento nos níveis de emaranhados neurofibrilares pode

intensificar a resposta imunológica e conduzir ao estresse oxidativo (LEE et al., 2010). Acredita-se que fatores diretos e indiretos estejam envolvidos na fosforilação anormal da *tau*. Dentre os diretos, pode-se citar a elevada ativação de proteínas cinases ou a diminuição de proteínas fosfatases, modificações covalentes e mutações genéticas. Já a toxicidade mediada pelo peptídeo A β , o estresse oxidativo e a inflamação configuram eventos indiretos que alteram a fosforilação da *tau* (IQBAL et al., 2005; MACNAULL et al., 2010).

A outra alteração histopatológica que caracteriza a DA são as placas senis extracelulares, constituídas por agregados de um pequeno peptídeo insolúvel, de aproximadamente 4 kDa chamado A β , gerado pelo processamento proteolítico da APP, uma glicoproteína transmembrana, amplamente expressa na superfície celular de neurônios e das células gliais (PASTORINO e LU, 2006; QUERFURTH e LAFERLA, 2010). A APP pode seguir duas diferentes vias de processamento: o amiloidogênico ou o não-amiloidogênico (Figura 2).

A via de processamento da APP, quando iniciada pela α -secretase é chamada de via não-amiloidogênica. Esta é a via predominante e nela não há produção do peptídeo A β . A clivagem da APP pela ação da α -secretase ocorre na região central do domínio do peptídeo A β , liberando ao meio extracelular um fragmento solúvel (sAPP α). O fragmento de 83 aminoácidos que permanece na membrana é então posteriormente clivado pela γ -secretase liberando um pequeno fragmento hidrofóbico (p3) com funções ainda não elucidadas (LAFERLA et al., 2007).

O processamento proteolítico anormal da APP, denominado amiloidogênico, ocorre através da ação sequencial de duas proteases: β -

secretase ou BACE-1 (*Beta-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme-1*), e γ -secretase, resultando na produção do peptídeo A β de 38 a 43 aminoácidos (HAASS et al., 1992; SHOJI et al., 1992; HERZ and BEFFERT, 2000). A β -secretase é uma aspartil protease transmembrana que cliva a APP no seu domínio N-terminal liberando o fragmento solúvel sAPP β ao meio extracelular. O fragmento que permanece aderido à membrana será clivado pela γ -secretase liberando o peptídeo A β ao meio extracelular (HAASS e SELKOE, 2007; LAFERLA et al., 2007; QUERFURTH e LAFERLA, 2010).

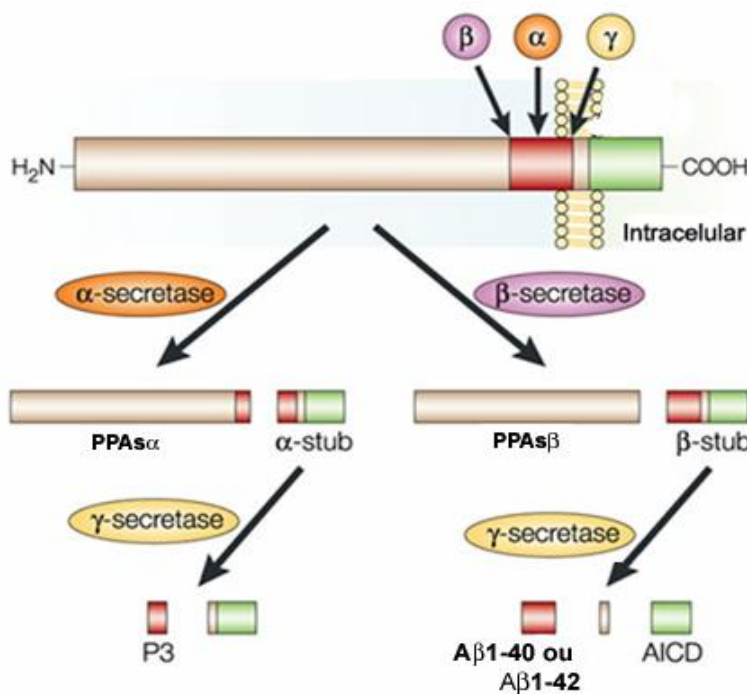


Figura 2. Processamento não amiloidogênico e amiloidogênico da APP. (Adaptado de LAFERLA, 2002). Forma secretada da APP α (sAPP α); forma secretada da APP β (sAPP β); peptídeo não-amiloidogênico (p3); domínio intracelular da APP (AICD).

O peptídeo contendo 40 aminoácidos (A β 1-40), que está fracamente associado à formação das placas, é a forma predominantemente produzida durante o processamento amiloidogênico. Embora secretado em menor quantidade, o peptídeo contendo 42 aminoácidos (A β 1-42) é o que gera as placas senis por ser a forma mais hidrofóbica e a mais propensa a formar

fibrilas (MATTSON, 1997; YOUNKIN, 1998; SELKOE, 2001). O peptídeo A β pode assumir múltiplas formas – monomérica, oligomérica, protofibrilar e fibrilar, sendo que a propriedade de formar fibrilas e outros estados intermediários constitui-se em uma característica que define a fisiopatologia da DA. Na forma monomérica, o peptídeo A β parece não ser neurotóxico. Contudo, o mesmo padrão não é observado para as espécies oligoméricas e protofibrilares que são consideradas potentes bloqueadores de potenciais de longa duração (LTP), além de interferirem em diversas vias de sinalização celular (LAFERLA, et al., 2007). Inicialmente, acreditava-se que o peptídeo A β induzia toxicidade somente quando na forma fibrilada. Todavia, várias evidências levaram a concluir que a reunião de pequenos fragmentos de A β geram espécies altamente neurotóxicas e que a formação de oligômeros solúveis precede o aparecimento de placas insolúveis. O fato de os sintomas iniciais da doença surgirem antes do acúmulo de placas e a elevada concentração de oligômeros de A β no tecido cerebral de pacientes com DA, confirmam esta hipótese (FINDER e GLOCKSHUBER, 2007). Estudos identificaram os oligômeros de A β em concentrações até 70 vezes mais altas em extratos de cérebros de pacientes com DA comparados com indivíduos controles (GONG et al., 2003).

Avanços no entendimento da patogênese da DA levaram a modificações na versão original da hipótese da cascata amilóide, pela qual se supunha que a agregação do A β em fibrilas seria a causa principal dos efeitos deletérios na DA (GELLERMANN et al., 2008; KARRAN et al., 2011). Assim, a ideia inicial de que seria possível bloquear os efeitos neurotóxicos desencadeados pela cascata amilóide ao impedir o processo de fibrilação e de formação das placas

senis, passou a ser questionada (HAASS e SELKOE, 2007; PIMPLIKAR, 2009). Embora os oligômeros solúveis do A β tenham sido colocados em um papel de destaque no que diz respeito ao desenvolvimento e progressão da DA, após a reformulação da cascata amilóide, isso não exclui a participação das placas insolúveis na degeneração neuronal progressiva que ocorre na DA. Além disso, a existência de dímeros e oligômeros aderidos às placas do A β insolúvel sugere que estas placas atuem como um estoque de pequenos oligômeros que podem se difundir para regiões mais distantes da placa causando dano sináptico/neurítico (SELKOE, 2011).

1.2 Terapia

O desenvolvimento de tratamentos eficazes que interfiram no processo neurodegenerativo progressivo que ocorre na DA, continua sendo um desafio, embora mais de 30 anos tenham passado desde a descoberta das alterações neuroquímicas que acontecem nesta doença (POTTER, 2010). As tentativas iniciais de tratamento focaram em aumentar a função colinérgica, visto que uma das mudanças patológicas da DA é a maciça degeneração colinérgica, que está intimamente relacionada com o declínio da função cognitiva. Assim, o primeiro tratamento de sucesso utilizado, foram os inibidores da acetilcolinesterase (HANSEN et al., 2008). Em 2003, foi lançada no mercado a memantina, um antagonista do receptor do N-metil-D-aspartato (NMDA) (WINBLAD et al., 2007). Embora, em muitos casos, os inibidores da acetilcolinesterase e a memantina tenham produzido melhoras nos sintomas da DA, a eficácia de ambos diminui com o progresso da doença. Mesmo tendo-se o conhecimento de que esses medicamentos não modificam o curso da DA,

atualmente eles são os únicos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), totalizando um número de cinco: quatro são inibidores da acetilcolinesterase (donezepil, galantamina, rivastigmina e tacrina) e o inibidor dos receptores de NMDA, a memantina.

Novas abordagens para o tratamento ou prevenção da DA incluem agonistas de receptores colinérgicos, terapias que diminuam os níveis do peptídeo A β e da *tau*, agentes anti-inflamatórios e substâncias que reduzam a morte e promovam a regeneração celular. Além disso, alguns medicamentos aprovados para outras finalidades têm se mostrado uma promessa no tratamento de pacientes com DA, caso das estatinas (POTTER, 2010).

1.3 O peptídeo A β e o estresse oxidativo

Diversas doenças relacionadas com o avanço da idade têm como características o aumento do estresse oxidativo e prejuízos no metabolismo celular energético, e, com a DA não é diferente. Inicialmente acreditava-se que a morte celular ocorrida após a exposição ao peptídeo A β envolvia dano oxidativo de uma maneira indireta, mas atualmente sabe-se que o peptídeo A β pode gerar espontaneamente espécies reativas (TABNER et al., 2002; BUTTERFIELD and LAUDERBACK, 2002).

Danos celulares mediados por espécies reativas são co-localizados com a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (BUTTERFIELD, et al., 2007). Durante a agregação, o peptídeo A β gera peróxido de hidrogênio, um processo que requer oxigênio e que é potencializado pela presença de Fe²⁺ e Cu⁺. Quando a agregação do A β ocorre ao nível da membrana celular, o estresse oxidativo associado à membrana resulta em peroxidação lipídica e na

consequente produção de 4-hidroxinonenal (4HNE), um aldeído neurotóxico que modifica covalentemente proteínas nos resíduos de cisteína, lisina e histidina. Modificações oxidativas da proteína *tau* pela ação de 4HNE e outras espécies reativas podem promover sua agregação e assim induzir a formação dos emaranhados neurofibrilares (MATTSON, 2004). A proteína *tau* hiperfosforilada não somente perde a função de estabilizar os microtúbulos, como também passa a aumentar o estresse oxidativo por sequestrar as proteínas *tau* normais, resultando na destruição dos microtúbulos (CROUCH et al., 2008; SAYRE et al., 2008).

O peptídeo A β pode também causar dano oxidativo mitocondrial e desregular a homeostase de Ca²⁺ resultando em danos na cadeia transportadora de elétrons, no aumento do radical ânion superóxido e na diminuição de ATP (MATTSON, 2004). Os neurônios são particularmente afetados pelas mutações no DNA das mitocôndrias, visto que sua principal fonte energética é o ATP gerado pela fosforilação oxidativa (JELLINGER, 2003; MARIANI et al., 2005; ZHU et al., 2007).

De uma maneira geral, o estresse oxidativo no cérebro de pacientes com DA está manifestado pelo aumento da oxidação proteica, da peroxidação lipídica, da oxidação do DNA e RNAm e na formação de espécies reativas (SMITH et al., 1997; LOVELL e MARKESBERY, 2001; BUTTERFIELD e LAUDERBACK, 2002).

1.4 Os mediadores inflamatórios na Doença de Alzheimer

Embora as placas senis e os emaranhados neurofibrilares sejam as características mais marcantes da DA, elas não são as únicas mudanças

significativas que ocorrem. Diversas outras alterações funcionais e estruturais acontecem, tal como a resposta inflamatória. A noção de que mecanismos inflamatórios poderiam estar envolvidos na patogênese da DA está presente desde o início das pesquisas desta doença.

Os principais mediadores da inflamação, observados na DA, são a astrogliose reativa, manifestada pelo aumento no número, tamanho e mobilidade dos astrócitos, e a microglia ativada circundantes às placas senis (AKIYAMA et al., 2000; WYSS-CORAY, 2006; ZAHEER et al., 2008). Estas células secretam citocinas e produtos neurotóxicos que contribuem para a degeneração e morte celular (SASTRE et al., 2006). Assim, um processo inflamatório crônico, desencadeado pelo acúmulo e deposição do peptídeo A β , parece ter importante contribuição no processo neurodegenerativo da DA. Esta visão é sustentada por dados epidemiológicos que mostram que tratamentos por um longo período com fármacos anti-inflamatórios não-esteróides podem ser uma forma de proteção contra a DA (GOLDE, 2002).

Em situações fisiológicas, as células microgлияis se encontram em um estado quiescente exibindo uma morfologia ramificada, mas em resposta a uma injúria local, como a deposição de A β , elas retraem seus processos adquirindo uma forma amebóide (microglia ativada) ou arredondada (microglia fagocítica) (SRIRAM e O'CALLAGHAN, 2007). Uma vez estimulada, a microglia libera uma ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios incluindo citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), componentes do sistema complemento, glutamato, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO – Nitric Oxide), além de aumentar a produção do A β (HENEKA et al., 2010). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α - Tumor Necrosis Factor- α) é o principal agente neurotóxico

secretado pela microglia ativada (JIANG et al., 2008). Assim como a microglia, os astrócitos podem secretar diversas moléculas pró e anti-inflamatórias (LEE et al., 2010). As citocinas iniciam e propagam um ciclo vicioso no processo amiloidogênico, no qual a ativação da microglia e astrócitos estimula a produção continuada dessas citocinas o que ocasiona um aumento na deposição do peptídeo A β , que por sua vez ativará mais células gliais o que resultará na perpetuação do ciclo neuroinflamatório e, conseqüentemente, dos eventos neurodegenerativos (GUO et al., 2002; HENEKA e O'BANION, 2007).

Estes mediadores inflamatórios, associados à ativação de complexas cascatas de sinalização intracelular, causam toxicidade para os neurônios, estando implicados no mecanismo responsável por exacerbar a neurodegeneração presente na DA.

1.4 O peptídeo A β e a via de sinalização celular da PI3K

O peptídeo A β no espaço extracelular pode ligar-se a uma variedade de biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e proteoglicanos. A ligação do peptídeo A β a receptores de membrana desencadeia uma cascata de eventos celulares, modulando diversas vias de sinalização celular, resultando em dano celular e marcante resposta inflamatória (SNYDER et al., 2005; BU et al., 2006). Entre as diversas vias de sinalização afetadas pelo peptídeo A β estão a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*), a via PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3-cinase), NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*), além da ativação de caspases e da fosforilação da proteína tau (CAMANDOLA e MATTSON, 2000; TROY et al., 2000; MATTSON e CAMANDOLA, 2001; RYDER et al., 2004; CHONG et al., 2006).

A via de sinalização de sobrevivência celular mediada pela PI3K/Akt é uma importante via neuronal anti-apoptótica que exerce um papel fundamental na diferenciação e sobrevivência de neurônios e células gliais (YUAN e YANKER, 2000). Distúrbios na sinalização da Akt (proteína cinase B) têm sido relacionados com a patogênese da DA (RYDER et al., 2004). O principal mecanismo regulatório dessas enzimas é por fosforilação: Akt é ativada enquanto a GSK-3 β é inibida por fosforilação (LI et al., 2000). A GSK-3 β encontra-se ativa quando desfosforilada, mas pode ser inibida através da fosforilação no sítio específico Ser-9 pela Akt/PKB e também por regulação negativa pela via de sinalização Wnt (família de proteínas glicosiladas ricas em cisteína derivadas do gene *Wingless* de *Drosophila* e do gene *Int-1* de camundongo) (LI et al., 2002; SALCEDO-TELLO, et al., 2011). A GSK-3 β é considerada uma enzima pró-apoptótica por inibir uma variedade de fatores de transcrição importantes para a sobrevivência celular. Além disso, a GSK-3 β participa do aparecimento de algumas das marcas características da DA: o acúmulo do peptídeo A β , a formação dos emaranhados neurofibrilares e marcadores inflamatórios, que em conjunto contribuem para a perda sináptica e neuronal e declínio da memória (HOPPER et al., 2008).

O processamento da APP também parece ser regulada pela GSK-3 β , levando a um aumento na produção de peptídeo A β (PHIEL et al., 2003). A exposição neuronal ao peptídeo A β resulta em um aumento na atividade da GSK-3 β por meio da inibição da via da PI3K (TAKASHIMA, et al., 1996). O peptídeo A β também pode atuar como um antagonista do receptor de insulina, impedindo a ativação da via da PI3K e Akt, prevenindo a fosforilação e inibição da GSK-3 β devido a ausência de atividade da Akt (TOWNSEND et al., 2007).

1.6 As estatinas

Estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC) têm sido amplamente pesquisadas. Dentre os muitos compostos investigados, os efeitos neuroprotetores das estatinas na DA têm sido objeto de muita pesquisa na última década. Estudos epidemiológicos demonstraram que a hipercolesterolemia é um fator de risco para o desenvolvimento da DA e observou-se que há uma diminuição na prevalência da DA em pacientes que fazem uso de estatinas (CHAUHAN, 2003).

As estatinas são fármacos usados no tratamento de hiperlipidemias. Elas inibem a enzima HMG-CoA-redutase bloqueando a conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato, inibindo assim os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Além de sua atividade hipocolesteremiante, as estatinas apresentam diversos efeitos independentes da redução de colesterol, conhecidos como efeitos pleiotrópicos (VEILLARD e MACH, 2002), sendo estes relacionados a prevenção/atenuação dos processos fisiopatológicos presentes na DA (SJOGREN et al., 2006). Muitos dos efeitos pleiotrópicos das estatinas são mediados principalmente pela inibição da síntese de isoprenóides, como farnesilpirofosfato (FPP) e geranyl-geranylpirofosfato (GGPP), que são metabólitos intermediários da síntese de colesterol mas que também servem como importantes moléculas lipídicas de adesão de muitas proteínas, como proteínas G heterotriméricas e a superfamília das preteínas G monoméricas, como Ras, Rab e Rho (MIIDA et al., 2004; LIAO e LAUFS, 2005; REISS e WIRKOWSKI, 2009). Estas e outras proteínas exercem importantes papéis na apoptose, no transporte intracelular de vesículas, na diferenciação e proliferação celular e na expressão de proteínas de membrana

(incluindo moléculas de adesão). O tratamento com estatinas reduz a prenilação e modifica várias destas funções celulares, apresentando, desta forma, um potencial terapêutico para o tratamento de muitas doenças neurológicas (WILLEY et al., 2010; WOOD et al., 2010). Efeitos anti-inflamatórios das estatinas podem ser atribuídos à diminuição da isoprenilação de proteínas envolvidas na inflamação e sinalização intracelular (LIAO e LAUFS, 2005).

Embora atuem pelo mesmo mecanismo de ação, as estatinas são divididas em duas categorias: as de origem natural (sinvastatina, pravastatina, lovastatina, mevastatina) e as de origem sintética (atorvastatina, fluvastatina, cerivastatina, pitavastatina e rosuvastatina) (MOST et al., 2009). Dentre as estatinas, a atorvastatina é relativamente a mais lipofílica e sua segurança foi confirmada em humanos utilizando-se altas doses (80 mg/dia/adulto) (WATERS, 2005).

As estatinas ativam várias vias celulares envolvidas com a neuroproteção, tais como as vias da PI3K/Akt, Wnt e ERK (MOST et al., 2009). Além de inibirem as enzimas relacionadas com a síntese endógena de colesterol, as estatinas também afetam aquelas envolvidas no processamento da APP, tais como a β -secretase e α -secretase, aumentando a atividade desta última favorecendo, dessa forma, o processamento não amiloidogênico da APP.

Além destes efeitos, tem sido demonstrada a ação anti-inflamatória das estatinas. Ratos tratados *in vivo* com atorvastatina por três semanas apresentaram aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, IL-4, no hipocampo, protegendo contra o déficit na potenciação de longa duração (LTP) causado por injeção aguda de peptídeo A β (CLARKE et al., 2007).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Considerando o descrito acima, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito neuroprotetor da atorvastatina em modelo *in vitro* de toxicidade do peptídeo A β , utilizando culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas ao peptídeo A β 25-35.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se o tratamento com a atorvastatina previne ou reduz a morte celular e a produção de espécies reativas induzidos pelo peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de ratos;
- b) Investigar o efeito da atorvastatina sobre as proteínas envolvidas na via de sinalização celular da PI3K/Akt, tais como Akt e GSK-3 β , no modelo de exposição das culturas organotípicas ao peptídeo A β ;
- c) Avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina sobre o nível da proteína de densidade sináptica, sinaptofisina, em culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas ao peptídeo A β .
- d) Avaliar o potencial neuroprotetor da atorvastatina na neuroinflamação induzida pela exposição ao peptídeo A β , através da investigação de seu efeito na ativação astrocitária, bem como, na secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

3. RESULTADOS

3.1 Capítulo I

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados na forma de artigo científico a ser submetido ao Periódico *Neurochemistry International*.

Atorvastatin prevents β -amyloid neurotoxicity in organotypic hippocampal slice culture: involvement of PI3K pathway, oxidative stress and neuroinflammation

Thaline da Silva¹, Rudimar Luiz Frozza¹, André Meneghetti¹, Juliana Simão¹,
Mariana Maier Gaelzer¹ and Christianne Salbego^{2,1}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

¹ Address correspondence and reprint requests to: Salbego, C.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Av. Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo I, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +55-51-3308-5547

FAX: +55-51-3308-5535

E-mail: salbego@terra.com.br

Abstract

Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative disease in the growing population of elderly people, which is probably caused by cytotoxic effect of the amyloid β -peptide. Increased brain deposition of A β and cognitive deficits are classical features of Alzheimer's disease, which have been highly associated to alterations in inflammatory response, formation of intracellular neurofibrillary tangles and oxidative stress. Here we evaluated the neuroprotective effect of atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, against A β ₂₅₋₃₅-induced toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. The cultures were treated with 2.5 μ M or 5 μ M of atorvastatin and then exposed to 25 μ M of A β ₂₅₋₃₅ for 48h. We also investigated the involvement of PI3K signaling pathway, oxidative responses, astroglial activation, as well synaptophysin (pre-synaptic marker) and cytokines levels on the atorvastatin protection against β -amyloid-induced toxicity. Atorvastatin treatment prevented the cell damage induced by the exposure to A β ₂₅₋₃₅, reduced inflammatory and oxidative responses and increased the immuncontent of synaptophysin. In addition, atorvastatin significantly prevented the activation of GSK-3 β , the astroglial activation and the β -amyloid-induced increase in TNF- α and IL-6 levels. Based on these results, we conclude that atorvastatin may provide an effective neuroprotective action against neurotoxicity induced by A β through the activation of the PI3K/AKT signaling pathway and attenuation of oxidative responses and neuroinflammation, and could be a potential drug used on Alzheimer disease.

Keywords: Atorvastatin, Alzheimer's disease, β -amyloid, PI3K/Akt pathway, oxidative stress, organotypic hippocampal culture, neuroinflammation.

Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia in the elderly, is characterized by amyloid β ($A\beta$)-containing plaques and neurofibrillary tangles (NFTs), as well synaptic and neuronal loss, along with progressive cognitive impairment (Kurinami et al., 2008). The main protein constituent of AD senile plaques, the $A\beta$ peptide is an abnormal proteolytic product of a much larger transmembrane protein, the amyloid precursor protein (APP) (Zhang et al., 2011). APP's physiological role remains unknown, but some findings suggest a crucial role in neuronal regeneration (Small et al., 1994; Sabo et al., 2001) as well as direct involvement in the pathophysiology of AD (Haass and Selkoe, 1993). When APP is cleaved by β -secretase, β -APP is produced, which then is further cleaved by γ -secretase which ultimately yields the $A\beta$ peptide (LaFerla et al., 2007). The exact mechanisms of $A\beta$ -induced neurotoxicity are not completely understood. For instance, it is assumed that the buildup of $A\beta$ aggregates in the AD brain is followed by the formation of NFTs, mainly composed of hyperphosphorylated forms of the *tau* protein, and activation of local inflammatory reactions (Akiyama et al., 2000). Moreover, $A\beta$ neurotoxicity appears to be due to a variety of factors, including the recruitment and activation of glial cells in response to $A\beta$ deposition (Schwab and McGeer, 2008) and oxidative stress (Butterfield and Lauderback, 2002). Considerable evidence gained over the past decade has supported the conclusion that neuroinflammation is associated with AD pathology. The AD is related mainly with microglial and astrocytic activation, leading to release of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic factors that accelerate neurodegeneration (Golde et al., 2002; Wyss-Coray et al., 2006; Park et al., 2007).

The social and economic consequences of AD represents a significant challenge to society and it is imperative that new strategies for treating or delaying the progression of the disease should be developed. Among the many compounds investigated, the neuroprotective effects of statins in AD have been the subject of many research groups over the last decade, once epidemiological studies have shown that hypercholesterolemia is a risk factor for the development of AD and there was observed a decrease in the prevalence of AD in patients taking statins (Lennernas and Fager, 1997; Wolozin et al., 2004).

Statins act by blocking the enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzymeA-reductase (HMG-CoA-reductase), the rate-limiting enzyme involved in cholesterol synthesis. This enzyme is necessary for the production of mevalonate, an intermediary product in the synthesis of cholesterol. However, statins may not only inhibit enzymes involved in the endogenous synthesis of cholesterol but also affect enzymes involved in A β metabolism, i.e., α -secretase and β -secretase thereby stimulating the non-amyloidogenic pathway (Sjögren et al., 2005). Although the primary action of statins is to inhibit cellular cholesterol synthesis, a second mechanism by which statins may act is by blocking the production of the non-sterol isoprenoid, metabolic intermediates in cholesterol synthesis, that are also important in cellular functioning.

Statins exhibit multiple nonlipid-lowering actions, called pleiotropic effects (Bonetti et al., 2003). These beneficial effects that extend beyond their cholesterol-lowering action include vasodilation, immunological properties attenuation of oxidative stress, and reduction of inflammation (Dangas et al., 1999; Rikitake et al., 2001; Liao, et al., 2005; Greenwood et al., 2006). Statins have both cholesterol-dependent and independent neuroprotective effects by

activating several neuroprotective pathways like: production of BDNF and activation of the PKB/Akt, Wnt and ERK pathways (Most et al., 2009).

Atorvastatin, a member of the family of agents that act as inhibitors of HMG-CoA-reductase, belongs to the newer third-generation synthetic statins. These newer statins are much more potent than the other statins, because they have greater lipophilicity and half-life (McTaggart et al., 2001). Consequently, these statins appear to bind hepatic HMG-CoA-reductase at higher affinity and inhibit the enzyme for a longer duration. Furthermore, the safety of high doses of atorvastatin (80 mg/day) in human has been demonstrated (Jones et al., 2008; Solomon and Kivipelto, 2009).

Experimental data have been reported that the treatment with atorvastatin activates α -secretase, and subsequently reduces the production of A β (Parvathy et al., 2004). Additionally the treatment with atorvastatin for seven consecutive days, after A β 1-40 injection in mice, was neuroprotective against cell degeneration induced by A β 1-40, reducing inflammatory and oxidative responses and increasing the expression of glutamatergic transporters (Piermartiri et al., 2010). Another study showed an increase of anti-inflammatory cytokine IL-4 production in the hippocampus of rats treated with atorvastatin (Clarke et al., 2007). Atorvastatin may also prevent the toxic events promoted by A β , such as synaptic damage and neuronal death (Bate and Williams, 2007) by decreasing the activity of the pro-apoptotic caspase-3 (Fonseca et al., 2009). Moreover, in a transgenic mouse model of tauopathy, atorvastatin were effective in reducing NFT burden (Boimel et al., 2009).

The access to the central nervous system is one limiting factor for the study of neurodegenerative diseases. Organotypic slice culture combine the

accessibility of *in vitro* culture systems and maintain intact cell architecture and interneuronal connections allowing an extend survival and molecular mechanism studies (Stoppini et al., 1991; Bruce et al., 1996) like the analysis of proteins and cascades of cell signaling pathways (Holopainen, 2005).

This culture system has been used by our group in attempt to investigate neuronal death associated with oxygen and glucose deprivation (Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2009) and A β toxicity (Nassif et al., 2007; Frozza et al., 2009; Hoppe et al., 2010). Using this model, here we assessed the potential protective effect of atorvastatin against cell damage and neuroinflammation associated with β -amyloid peptide toxicity. We also evaluated the effect of atorvastatin treatment on the signaling mechanism through the analysis of immunoccontent and phosphorylated status of Akt and GSK-3 β proteins. We have used one of the fragments of A β peptide (A β 25-35) which represents the biologically active region of A β 1-42 and, therefore, exhibit similar biological activity of the full length A β (Pike et al., 1996; Frozza et al., 2009).

Experimental procedures

1. Materials

A β 25-35 peptide was purchased from American Peptide Co. (Sunnyvale, CA, USA). Minimum Essential Medium (MEM), HBSS, fungizone (Anphotericin B) and horse serum inactivated were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Gentamicin was purchased from Schering-Plough (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Millicell culture inserts (Millicell[®] -CM, 0.4 μ m) were purchased from Millipore (Millipore[®], Bedford, MA, USA) and 6-well culture plate were from Tissue culture test plates TPP (Tissue culture test plates TPP[®], Switzerland).

Propidium iodide (PI) as well as acrylamide, bisacrylamide, SDS and β -mercaptoethanol used in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA) and Millipore (Millipore®, Bedford, MA, USA). ELISA kits were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-mouse IgG peroxidase-conjugated was purchased from Cell Signaling Technology. Anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated and reagents to detect chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Hybond-C nitrocellulose membranes were from Hybond™ ECL™ (Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). X-ray films were purchased from Kodak (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). Atorvastatin was purchased from Tocris (Minneapolis, MN, USA).

2. *Organotypic hippocampal slice cultures*

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991), with modifications (Frezza et al., 2009). Briefly, 400 μ m thick hippocampal slices were prepared from 6 to 8-days-old male *Wistar* rats using a McIlwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl₂ 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH₂HPO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 0.49, MgSO₄ 0.44, HEPES 25; fungizone 1% and gentamicin 0.100 mg/ml, pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture inserts and the inserts were transferred to a 6-well culture plate. Each well contained 1 ml of culture medium consisting of 50% MEM, 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum supplemented with (mM,

final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% and gentamicin 0.100 mg/ml, pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with a 5%CO₂/95%O₂ atmosphere at 37°C for 4 weeks. Culture medium was changed three times a week. All animal use procedures were approved by the local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

3. *Atorvastatin preparation and culture treatments*

Atorvastatin was first dissolved in absolute dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted with Milli-Q water (2 Milli-Q water : 1 DMSO). After 28 days, the cultures were treated with 2.5µM or 5µM (final concentration) of atorvastatin added to the culture medium. Cultures treated with DMSO (0.01%) were considered as control.

4. *Aβ₂₅₋₃₅ peptide preparation and culture treatments*

One milligram of Aβ peptide was dissolved in sterilized bidistilled water and stock solution of Aβ₂₅₋₃₅ (0.5mM) was stored at -20°C. Prior to use, Aβ peptide were aggregated at 37°C for 72h (Han et al., 2004). To establish the Aβ induced neurotoxicity, on the 28th day *in vitro*, the medium was replaced by a serum reduced medium (5%) and slices were exposed to 25µM (final concentration) of Aβ₂₅₋₃₅. Control slices received only serum reduced medium with the drug vehicle (DMSO 0.01%).

5. *Quantification of cellular death*

Cell damage was assessed by fluorescent image analysis of PI uptake (Norberg et al., 1999; Frozza et al., 2009). PI is a polar compound that is

impermeable to an intact cell membrane, but it penetrates damaged cell membranes of dying cells and binds to nuclear DNA to generate a bright red fluorescence. After 46h of A β peptide exposure, 5 μ M of PI was added to the culture medium and incubated for 2h. PI uptake is indicative of significant membrane injury (Macklis and Madison, 1990). PI fluorescence was observed by an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 300). Images were captured using a CCD camera (DXM1200C Nikon Instruments Inc., USA), stored and subsequently analyzed, by using an image analysis software (Scion Image software - <http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was detectable above background levels was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of damage.

6. *Evaluation of intracellular ROS formation*

Formation of intracellular reactive species was detected using an oxidant-sensing fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), which is de-esterified within cells by endogenous esterases to the ionized free acid, 2',7'-dichlorofluorescein and then is oxidized to the fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by hydroperoxides (Hempel et al., 1999). A 10 mM DCFH₂-DA stock solution was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). After 48h exposure to A β , with or without atorvastatin treatment, cultured slices were incubated with 10 μ M DCFH₂-DA in PBS at 37 °C for 30 min, and then washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The fluorescent DCF images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where DCF fluorescence was detectable higher than background levels was determined using the “density slice” option

of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of intracellular reactive species formation.

7. *Western blotting assay*

After obtaining fluorescent images, hippocampal slices were homogenized in lyses buffer, aliquots were taken for protein determination (Peterson, 1979) and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Proteins were resolved (20 μ g per lane) on 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electro transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20, pH 7.4) and further incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution. Primary antibodies against GFAP (1:1500; Sigma), Synaptophysin (1:1000, Millipore), anti β -actin (1:1000, Sigma), anti-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho Akt (Ser 473) (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-GSK-3 β (1:1000, Cell Signaling Technology) and anti-phospho GSK-3 β (Ser 9) (1:1000, Cell Signaling Technology), were used. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech) or horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:1000; Cell Signaling Technology) for 2h. The chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films that were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instruments). Data are expressed as percentage of control cultures.

8. Determination of cytokine levels in medium of organotypic cultures

After 48h of incubation with A β 25-35 peptide (25 μ M), with or without atorvastatin, the culture medium was collected, rapidly frozen and stored at -20°C for later measurement of TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, in accordance with the manufacturer's recommendations (R&D Systems, Minneapolis, MN). The values of cytokines were expressed as pg/mL medium.

9. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey's test. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

1. Atorvastatin attenuates cell damage induced by A β 25-35

The exposure of cultures to 25 μ M of A β 25-35 peptide for 48h caused a significant increase in fluorescence in hippocampal slices that means an increase in the cellular damage. This damage was prevented by the treatment with 2.5 μ M and 5 μ M of atorvastatin (Fig. 1A). Quantification of PI fluorescence showed that A β 25-35 peptide caused around 25% of damage in hippocampus, a significant increase when compared to control cultures (about 4% of cellular damage). In atorvastatin treated cultures, both concentrations 2.5 μ M and 5 μ M, the cell death was decreased to the control levels (Fig. 1B). Lower

concentrations of atorvastatin (100nM, 250nM, 500nM and 1 μ M) had no effect on A β toxicity (data not shown).

2. *Effect of atorvastatin treatment on oxidative stress induced by A β 25-35 peptide*

Although the pathogenic mechanisms underlying the AD are still unclear, there is available evidence suggesting that oxidative stress plays a key role. In order to clarify the involvement of oxygen radicals in A β -induced cell death in organotypic hippocampal slice cultures, we measured reactive species accumulation at 48h after A β application by using the fluorescent DCF. In comparison with not exposed cultures, the exposure to 25 μ M of A β 25-35 peptide for 48h caused increased DCF staining in all regions of hippocampus. DCF fluorescence was significantly decreased when cultures were treated with atorvastatin in both tested concentrations (Fig. 2A). Quantification of DCF fluorescence showed that A β 25-35 peptide caused increased around 55% of ROS, a significant increase when compared to controls cultures (about 4% of cellular damage). The treatment with atorvastatin decreased the production of reactive species to the control levels (Fig. 2B).

3. *Effect of A β 25-35 peptide and atorvastatin on Akt phosphorylation*

The status of Akt phosphorylation was examined after 48h of A β 25–35 peptide exposition by Western blotting with antibodies against the active form of Akt, phosphorylated at Ser473, as well as its total immunoccontent. As we can see in Fig. 3A, the exposure to A β 25-35 peptide for 48h decreased the amount of phospho-Akt around 55%. The treatment with atorvastatin not only prevented

the decrease but also increased the level of Akt phosphorylation above those detected in control cultures (Fig. 3B).

4. *Atorvastatin prevents GSK-3 β activation in response to A β 25-35*

Akt activated (i.e. phosphorylated) phosphorylates and inactivates GSK-3 β , being an important anti-apoptotic pathway. GSK-3 β (on Ser9) phosphorylation indicates its inactivation. Once it was observed that Akt protein was phosphorylated when treated with atorvastatin we decided to investigate GSK-3 β activity. We observed that A β 25-35 peptide exposition for 48h decreased GSK-3 β phosphorylation (Fig. 4A). Atorvastatin was able to prevent this decrease, suggesting that it maintain GSK-3 β inactivated (Fig. 4B).

5. *Atorvastatin prevents astroglial activation induced by A β 25-35 peptide in organotypic hippocampal slice*

The exposure of hippocampal organotypic cultures to A β 25-35 caused astrocytic activation, as evidenced by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity increase (Fig. 5A). Compared to control cultures, about 75% increase in GFAP immunoreactivity (Fig. 5B) was observed in cultures exposed to A β peptide for 48h, and atorvastatin in both concentrations, 2.5 μ M and 5 μ M, prevented this increase.

6. *Atorvastatin prevents A β 25-35 peptide-induced increase in TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels*

Neuroinflammation is implicated in the AD pathogenesis. Several mediators of the inflammation cascade contribute to neurodegeneration, including some pro-inflammatory cytokines as TNF- α , IL-6 and IL-1 β . Considering this, we also investigated the release of TNF- α , IL-6 and IL-1 β .

After exposure of hippocampal cultures to A β 25-35 for 48h, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were highly increased in the culture medium (Fig. 6A, 6B and 6C). Atorvastatin, in both concentrations 2.5 μ M and 5 μ M, prevented this increase.

7. *Atorvastatin prevents A β 25-35 peptide-induced decrease in synaptophysin levels*

A significant reduction in the pre-synaptic marker, synaptophysin, was observed after 48h of exposure to A β 25-35, suggesting a decrease in synaptic function. The decrease on synaptophysin immunoreactivity was approximately 45% and atorvastatin was able to prevent this decrease, this means that it was able to protect the tissue against the loss of synapses (Fig. 7B).

Discussion

AD, the most common cause of dementia in the elderly, is characterized by amyloid β containing plaques and NFTs, and both lead to neurodegeneration (Pastorino and Lu, 2006). The accumulation of A β , the major component of senile plaques, is thought to play a key role in the pathogenesis of AD, potentially contributing to progressive dementia. The A β 25-35 peptide, a A β 1–42 fragment with 11 amino acids residues, retains neurotoxic effects of the full-length peptide such as learning and memory impairment, neuronal apoptosis and oxidative stress (Olariu et al., 2001; Tohda et al., 2003). Previously, using organotypic slice culture as an *in vitro* model of A β toxicity, we have shown that A β 25-35 peptide induced a significant cell death after an exposure of 48h (Nassif et al., 2007; Frozza et al., 2009).

Treatment of dementia is becoming a social and economic problem and it is imperative that strategies to prevent or delay the onset of AD are developed. Although several approaches involve new agents, many are based on new applications of existing drugs. Considering this, statins may be a good candidate since there is strong evidence that these substances are associated with decreased risk of AD (Wolozin, 2004). In order to assess whether statins can have some action to prevent neurodegeneration induced by A β , we used organotypic hippocampal slice cultures exposed to A β 25-35 treated with atorvastatin. Our results showed that atorvastatin treatment reduced the cell damage induced by A β peptide, observed by the decreasing in fluorescence in hippocampal slices, at concentrations of 2.5 μ M or 5 μ M. The last concentration, 5 μ M, was neuroprotective in another study that used cell culture, since atorvastatin stimulated APP proteolysis at the cell surface by α -secretase, therefore decreasing the production of A β peptide (Parvathy et al., 2004).

Consistent with clinical reports, the effect of statins on A β metabolism has been reported *in vitro* and *in vivo* (Fassbender et al., 2001; Parvathy et al., 2004; Thelen et al., 2006). It was shown that transgenic AD mice, which were fed with high cholesterol diet, showed an increase in the production of amyloid plaques while statin treatment (atorvastatin) reduced this production by approximately 50% (Refolo et al., 2000).

It has been suggested that the beneficial effects of statins on AD might not be only through lipid-lowering effects, but also through pleiotropic effects like their antioxidative properties (Barone et al., 2010). Oxidative stress has been implicated in normal aging and in various neurodegenerative disorders, including AD (Ames and Shigenaga, 1992; Lewen et al., 2000). Moreover,

oxidative-dependent injury represents an early and significant change in AD brain (Butterfield and Lauderback, 2002). Here we demonstrated a beneficial effect of atorvastatin treatment in reducing the reactive species production in hippocampus by A β exposure (Fig. 2).

In order to investigate a molecular mechanism that could be involved in atorvastatin neuroprotective effect against A β peptide neurotoxicity, we studied the PI3K pathway, an important anti-apoptotic cell signaling pathway. Statins also show antiapoptotic properties, as evidenced by a study with atorvastatin in a cell-model of apoptosis (Tanaka et al., 2004). Akt protein, the main downstream kinase of PI3K that promotes cell survival, is activated by phosphorylation (Li et al., 2000). *In vivo* experiments have shown the activation of Akt after treatment with atorvastatin (10 mg/Kg) for 7 days (Piermatiri et al., 2009). Here, we observed a decrease in Akt phosphorylation when organotypic cultures were exposed to A β 25-35 peptide. Our results showed that all tested concentrations of atorvastatin prevented this decrease and also increased the phosphorylation and consequently activation of Akt.

One important downstream substrate from Akt is the GSK-3 β . Activation of GSK-3 β promotes pro-apoptotic signaling (Li et al., 2000). Our results showed that the exposure to aggregated A β peptide can significantly increase the GSK-3 β activity, by decreasing its phosphorylation, whereas treatment of the organotypic cultures with atorvastatin attenuated this decrease preventing its activation. A plausible explanation for the mechanism of how statins can activate PKB/Akt could be explained by its effect on Rho/ROCK pathway (Liu et al., 2009). Rho is one of the small GTPases that requires non-sterol isoprenoids for its activation. Inhibition of the Rho/ROCK signal transduction pathway has

been implicated as a potential mechanism underlying the pleiotropic benefits of statin therapy. By inhibiting mevalonate synthesis, statins prevent the formation of isoprenoid intermediates that are required for the intracellular trafficking and function of small GTPases such as Rho. Furthermore, it was demonstrated that the inhibition of ROCK results in PKB/ Akt activation (Wolfrum et al., 2004), presumably through inhibition of PTEN, a negative regulator of PKB/Akt (Song et al., 2005).

Inflammation has been implicated as a critical mechanism involved on the progression of neurodegeneration process. There is growing evidence that AD is accompanied by an inflammatory reaction which is considered a response to A β deposition in the brain (Akiyama et al., 2000). A β plays a role in inducing many of the alterations observed in glial cells (MacGeer and MacGeer, 2002). Abnormalities in astrocytes may contribute to synaptic dysfunction, neuronal death and production of pro-inflammatory cytokines (Mattson, 2004). In AD, active microglia congregate around amyloid plaques and degenerating neurons and by this way contributing to the neurodegenerative process through the release of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and other toxic products, including reactive oxygen species, nitric oxide, and excitatory amino acids (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Apelt and Schliebs, 2001; Wyss-Coray et al., 2006; Heneka and O'Banion, 2007).

In the attempt to better establish which mechanisms are involved with the neuroprotective effects of atorvastatin in AD, we also investigated the effect of atorvastatin on neuroinflammation mediated by A β 25-35 peptide in our model once recent evidence has stimulated the discussion about the use of statins as potential anti-inflammatory drug for the treatment of dementia, such as AD.

Here we demonstrated an increase of GFAP immunoreactivity in organotypic hippocampal cultures exposed to A β 25-35 peptide, suggesting that astrocytes are activated, and this effect was prevented by the pre-treatment with atorvastatin. This glial activation induces an increase on cytokines production/release, evidenced here by the high levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the culture medium after exposure to A β 25-35. These results are in agreement with other reports implicating A β peptide and neuroinflammation (Zaheer et al., 2008). In the same way, atorvastatin also reduced cytokines levels in organotypic hippocampal slice cultures exposed to A β 25-35. It was demonstrated that, in humans with AD, the primary action of statins might be to reduce inflammation due to its effect on microglia activation rather than to decrease A β levels (Wolosin, 2004).

In addition, some studies have shown that statins can reduce inflammatory responses A β induced through a geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) dependent mechanism (Cordle et al., 2005) and by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines in activated microglia (Lindberg et al., 2005; Selley, 2005). Moreover, *in vivo* experiments have shown that atorvastatin, exerts powerful anti-inflammatory effect in brain and that this effect is mediated by IL-4 (Clarke et al., 2007).

To assess the effect of the treatment with atorvastatin on synapses, we measured the levels of synaptophysin, a protein related to synaptic function. We observed a clear decrease in the synaptophysin levels in cultures exposed to A β peptide in comparison with the control groups (Fig. 7). Atorvastatin was able to prevent this decrease, suggesting that it maintains reserved pool of synaptic vesicles. These results suggest that A β peptide can affect presynaptic

density and neuronal trafficking, and atorvastatin is able to prevent this effect. Synaptophysin is the most abundant integral synaptic vesicle (SV) protein (comprising 8% of total SV protein) and is therefore often measured in attempts to quantify synapses. The role of synaptic proteins in causing dementia has been the subject of increasing interest since the correlation between synaptic loss and AD was first established (Davies et al., 1987). Synaptic transmission is essential for nervous system function, and its dysfunction is a known major contributing factor to Alzheimer's (Clare et al., 2010). Synapse loss has been shown to be positively correlated with neurons containing NFTs (Callahan and Coleman, 1995) and studies suggest that A β peptide, in its soluble and oligomeric forms, is especially toxic to synapses. The A β peptide has the property to solubilize or permeabilize membranes through its lipid binding properties. Likewise, pores can be harmful for the maintenance of the gradients and to the SV function, which are critical for interneuronal communication. Because A β peptide and SVs, are present in close proximity at the synapse in AD affected brains, it is hypothesized that A β might directly affect the integrity of SVs. SV seems to be an aspect of brain physiology particularly vulnerable to attack by A β (Allen and Chiu, 2008).

The overall results presented here reinforce the idea of the potential neuroprotective effect of atorvastatin against A β -induced neurotoxicity. This study adds a new evidence that the PI3K cascade could play a role in atorvastatin-induced neuroprotective effect. Moreover, the proposed mechanisms by which atorvastatin may act include the preventing glial activation, reduction of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels and consequently

neuroinflammation, as well as a reduction of oxidative-dependent injury and an increase in synaptophysin levels.

Acknowledgments

This work was supported the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS).

References

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G., Cooper, N., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B., Finch, C., Frautschy, S., Griffin, W., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I., McGeer, P., O'Banion, K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, S., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 21, 383-421.
- Allen, P.B., Chiu, D.T., 2008. Alzheimer's disease protein Abeta1-42 does not disrupt isolated synaptic vesicles. *Biochimica et Biophysica acta* 1782, 326-334.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., 1992. Oxidants are a major contributor to aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 663, 85–96.
- Apelt, J., Schliebs, R., 2001. β -amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenicTG2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Research* 894, 21-30.
- Barone, E., Cenini, G., Domenico, F., Martin, S., Sultana, R., Mancuso, C., Murphy, M., Head, E., Butterfield, D., 2010. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: A novel mechanism of action. *Pharmacological Research* 63, 172-180.

Bate, C., Williams, A., 2007. Squalastatin protects neurons and reduces the activation of cytoplasmic phospholipase A2 by Abeta(1-42). *Neuropharmacology* 53, 222-231.

Boimel, M., Grigoriadis, N., Lourbopoulos, A., Touloumi, O., Rosenmann, D., Abramsky, O., Rosenmann, H., 2009. Statins reduce the neurofibrillary tangle burden in a mouse model of tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, 314 – 325.

Bonetti, P.O., Lerman, L.O., Napoli, C., Lerman, A., 2003. Statin effects beyond lipid-lowering - are they clinically relevant? *European Heart Journal* 24, 225-248.

Butterfield, D.A., Lauderback, C.M., 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid- β -peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 32, 1050–1060.

Bruce, A.J., Makfroy, B., Baudry, M., 1996. β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a syntetic catalytic free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2312-2316.

Callahan, L.M., Coleman, P.D., 1995. Neurons bearing neurofibrillary tangles are responsible for selected synaptic deficits in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 16, 311-314.

Clarke, R.M., O'Connell, F., Lyons, A., Lynch, M.A., 2007. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of

amyloid-beta1–42 in the rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology* 52, 136–145.

Cimarosti, H., Zamin, L.L., Frozza, R., Nassif, M., Horn, A.P., Tavares, A., Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochemical Research* 30,191-199.

Clare, R., King, V., Wirenfeldt, M., Vinters, H.V., 2010. Synapse Loss in Dementias. *Journal of Neuroscience Research* 88, 2083-2090.

Cordle, A., Koenigsnecht-Talboo, J., Wilkinson, B., Limpert, A., Landreth, G., 2005. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 34202–34209.

Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., Yates, P.O., 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurological Sciences* 78, 151-164.

Dangas, G., Badimon, J.J., Smith, D.A., Unger, A.H., Levine, D., Shao, J.H., Meraj, P., Fier, C., Fallon, J.T., and Ambrose, J.A., 1999. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 1294 - 1304.

Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Runz, H., Kuhls, S., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., Hartmann, T., 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid

peptides Abeta 42 and Abeta 40 *in vitro* and *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98, 5856-5861

Fonseca, A.C., Proença, T., Resende, R., Oliveira, C.R., Pereira, C.M., 2009. Neuroprotective effects of statins in an *in vitro* model of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease 17, 503-517.

Frezza, R.L., Horn, A.P., Hoppe, J.B., Simão, F., Gerhardt, D., Argenta-Comiran, R., Salbego, C., 2009. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. Neurochemical Research 34, 295-303.

Golde, T., 2002. Inflammation takes on Alzheimer's disease. Nature Medicine 8, 936-938.

González-Scarano, F., Baltuch, G., 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annual Review of Neuroscience 22, 219-240.

Greenwood, J., Steinman, L., Zamvil, S.S., 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. Nature Reviews Immunology 6, 358-370.

Haass, C., Selkoe, D.J., 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. Cell, 75, 1039-1042.

Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., Flaherty D. M., 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-

carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 146–159.

Heneka, M.T., O'Banion, M.K., 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* 184, 69-91.

Holopainen, I.E., 2005. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochemistry Research* 30, 1521-1528.

Hoppe, J.B., Frozza, R.L., Horn, A.P., Comiran, R. A., Bernardi, A., Campos, M.M, Battastini, A.M, Salbego, C., 2010. Amyloid- β neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , *tau* and neuroinflammation. *Journal of Pineal Research* 48, 230-238.

Horn, A.P., Frozza, R.L., Grudzinski, P.B., Gerhardt, D., Hoppe, J.B., Bruno, A.N., Chagastelles, P., Nardi, N.B., Lenz, G., Salbego, C., 2009. Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience Research* 63, 35-41.

Jones, R.W., Kivipelto, M., Feldman, H., Sparks, L., Doody, R., Waters, D.D., Hey-Hadavi, J., Breazna, A., Schindler, R.J., Ramos, H., 2008. The Atorvastatin/Donepezil in Alzheimer's Disease Study (LEADe): design and baseline characteristics. *Alzheimer's & Dementia* 4, 145–153.

Kurinami, H., Sato, N., Shinohara, M., Takeuchi, D., Takeda, S., Shimamura, M., Ogihara, T., Morishita, R., 2008. Prevention of amyloid A β -induced memory

impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid β accumulation and oxidative stress in amyloid β injection mouse model. *International Journal of Molecular Medicine* 21, 531-537.

LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular β -amyloid in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 8, 499-509.

Lennernas, H., Fager, G., 1997. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clinical Pharmacokinetics* 32, 403-425.

Lewen, A., Matz, P., Chan, P. H., 2000. Free radical pathways in CNS injury. *Journal of Neurotrauma* 17, 871–890.

Liao, J.K., 2005. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond lowdensity lipoprotein cholesterol. *The American Journal of Cardiology* 96, 24–33.

Lindberg, C., Crisby, M., Winblad, B., Schultzberg, M., 2005. Effects of statins on microglia. *Journal of Neuroscience Research* 82, 10–19.

Li, M.; Wang, X.; Meintzer, M.K.; Laessig, T.; Birnbaum, M.J.; Heidereich, K.A., 2000. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 9356-9363.

Liu, P.Y., Liu, Y.W., Lin, L.J., Chen, J.H., Liao, J.K., 2009. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiledcoil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 119, 131–138.

Macklis, J.D., Madison, R.D., 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Methods* 31, 43-46.

MacGeer, P. L., MacGeer, E. G., 2002. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Neurovirology* 8, 529-538.

McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck, D., Smith, G., Warwick, M., 2001. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *The American Journal of Cardiology* 87, 28–32.

Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639.

Most, P., Dolga, A., Nijholt, I., Luiten, P., Eisel, U., 2009. Statins: Mechanisms of neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 88, 64-75.

Nassif, M., Hoppe, J., Santin, K., Frozza, R., Zamin, L.L., Simão, F., Horn, A.P., Salbego, C., 2007. β -amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 β , and PTEN. *Neurochemistry International* 50, 229-235.

Noraberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J., 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Research Protocols* 3, 278-290.

Olariu, A. Tran, M. H., Yamada, K., Mizuno, M., Hefco, V. Nabeshima, T., 2001. Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *Journal of Neural Transmission* 108, 1065-1079.

Park, K.W., Lee, H.G., Jin, B.K., Lee, Y.B., 2007. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Experimental & Molecular Medicine* 39, 812-819.

Parvathy, S., Ehrlich, M., Pedrini, S., Diaz, N., Refolo, L., Buxbaum, J.D., Bogush, A., Petanceska, S., Gandy, S., 2004. Atorvastatin-induced activation of Alzheimer's alpha secretase is resistant to standard inhibitors of protein phosphorylation-regulated ectodomain shedding. *Journal of Neurochemistry* 90, 1005-1010.

Pastorino, L., Lu, K.P., 2006. Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 545, 29-38.

Peterson, G.L., 1979. Review of the folin-phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100, 201-220.

Piermartiri, T.C.B., Vandresen-Filho, S., de Araújo Herculano, B., Martins, W.C., Dal'agnolo, D., Stroeh, E., Carqueja, C.L., Boeck, C.R., Tasca, C.I., 2009. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotoxicity Research* 16, 106–115.

Piermartiri, T.C.B, Figueiredo, C. P., Rial, D., Duarte, F.S., Bezerra, S.C., Mancini, G., de Bem, A.F., Prediger, R.D.S, Tasca, C.I., 2010. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1–40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Experimental Neurology* 226, 274-284.

Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1996. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 64, 253-265.

Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., Pappolla, M.A., 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease* 7, 321–331.

Rikitake, Y., Kawashima, S., Takeshita, S., Yamashita, T., Azumi, H., Yasuhara, M., Nishi, H., Inoue, N., and Yokoyama, M., 2001. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 154, 87 - 96.

Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., Greengard, P., 2001. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *Journal Cell Biology*, 153, 1403-1414.

Schwab, C., McGeer, P.L., 2008. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Journal Alzheimer's Disease* 13, 359-369.

Selkoe, D. J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 924, 17-25.

Selley, M.L., 2005. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Research* 1037, 1–6.

Sjögren, M., Mielke, M., Gustafson, D., Zandi, P., Skoog, I., 2005. Cholesterol and Alzheimer's disease - is there a relation? *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 138-147.

Solomon, A., Kivipelto, M., 2009. Cholesterol-modifying strategies for Alzheimer's disease. *Expert Review Neurotherapeutics* 9, 695 – 709.

Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *Journal Neuroscience*, 14, 2117-2127.

Song, G., Ouyang, G., Bao, S., 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9, 59–71.

Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 37,173-182.

Tanaka, K., Honda, M., Takabatake, T., 2004. Anti-apoptotic effect of atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on

cardiac myocytes through protein kinase C activation. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31, 360–364.

Thelen, K.M., Laaksonen, R., Paiva, H., Lehtimäki, T., Lutjohann, D., 2006. High-dose statin treatment does not alter plasma marker for brain cholesterol metabolism in patients with moderately elevated plasma cholesterol levels. *Journal of Clinical Pharmacology* 46, 812-816.

Tohda, C., Tamura, T., Komatsu, K., 2003. Repair of amyloid beta(25-35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to. *Brain Research* 990, 141-147.

Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A. Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379-386.

Wyss-Coray, T., 2006. Inflammation in Alzheimer's disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine* 12(9), 1005-1015.

Wolfrum, S., Dendorfer, A., Rikitake, Y., Stalker, T.J., Gong, Y., Scalia, R., Dominiak, P., Liao, J.K., 2004. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 24, 1842–1847.

Wolozin, B., 2004. Cholesterol, statins and dementia. *Current Opinion in Lipidology* 15, 667–672.

Zaheer, A., Zaheer, S., Thangavel, R., Wu, Y., Sahu, S.K., Yang, B., 2008. Glia maturation factor modulates β -amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. *Brain Research* 1208, 192-203.

Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H., 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain* 4, 1-13.

Figure 1: Atorvastatin attenuates cell damage after exposure of organotypic hippocampal slices cultures to A β 25-35 peptide. **(A)** Representative photomicrographs of PI uptake in hippocampal slices after 48h exposure to 25 μ M of A β 25-35 and treatment with atorvastatin 2.5 μ M and 5 μ M. **(B)** Quantification of PI uptake in response to A β peptide and atorvastatin. Values was expressed as percentage of cell death in hippocampus. Bars represent the mean \pm SEM, n=12. # significantly different from control culture; *** significantly different from A β 25-35 (25 μ M). (One-way ANOVA followed by Tukey's test, p<0.001).

Figure 2: Effects of atorvastatin treatment in A β 25-35 induced oxidative stress. A β 25-35 induced increase in DCF fluorescence in organotypic hippocampal slice cultures and treatment with atorvastatin prevented this effect. **(A)** Representative DCF fluorescent images from hippocampal slices after 48h exposure to 25 μ M of A β 25-35 and treatment with atorvastatin 2.5 μ M and 5 μ M. **(B)** Quantification of DCF images. Data were expressed as percentage of DCF fluorescence in hippocampus. Bars represent the mean \pm SEM, n= 9. # significantly different from control culture; *** significantly different from A β 25-35 (25 μ M). (One-way ANOVA followed by Tukey's test, p<0.001).

Figure 3: Effect of atorvastatin on the percentage of phosphorylated Akt in organotypic hippocampal cultures. **(A)** Representative Western blotting showing phospho-Akt (Ser 473) and Akt 48h after A β 25-35 peptide exposure and treatment with 2.5 μ M and 5 μ M of atorvastatin. **(B)** Quantification of pAkt 48h after A β exposure with or without treatment with atorvastatin normalized to the total amount of Akt. Data are expressed as a ratio of the normalized pAkt and Akt. Bars represent the mean \pm SEM, n=5. * significantly different from A β 25-35,

$p < 0.05$; ***significantly different from A β 25-35 control culture, $p < 0.001$ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 4: GSK-3 β activated by A β peptide exposure can be prevented by atorvastatin. **(A)** Representative Western blotting of pGSK-3 β and GSK-3 β after 48h of A β 25-35 peptide (25 μ M) exposure and treatment with 2.5 μ M and 5 μ M of atorvastatin. **(B)** Quantification of pGSK-3 β 48h after A β exposure with or without treatment with atorvastatin normalized to the total amount of GSK-3 β . Data are expressed as a ratio of the normalized pGSK-3 β and GSK. Bars represent the mean \pm SEM, $n=5$. # significantly different from all other groups (One-way ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0,01$).

Figure 5: Astrocytic activation induced by A β 25-35 peptide can be prevented by atorvastatin. **(A)** Representative Western blotting of GFAP immunocontent in organotypic hippocampal cultures after 48h of exposure to A β 25-35. **(B)** Quantification of GFAP immunocontent after A β peptide exposure and treatment with 2.5 μ M and 5 μ M of atorvastatin. Bars represent the mean \pm SEM, $n=9$. # significantly different from all other groups; *** significantly different from A β 25-35 (One-way ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0,001$).

Figure 6: A β 25-35 peptide-induced increase in IL-6, TNF- α and IL-1 β levels can be prevented by atorvastatin. **(A)** IL-6 levels in the culture medium from cultures exposed to A β 25-35 for 48h. Treatment with atorvastatin 2,5 μ M and 5 μ M was able to prevent the increased level at 48h. Bars represent the mean \pm SEM, $n=3$ **(B)** TNF- α levels in the culture medium after exposure of hippocampal cultures to A β 25-35 for 48h. Treatment with atorvastatin in both concentrations reduced these levels. Bars represent the mean \pm SEM, $n=3$ **(C)**

IL-1 β levels in the culture medium from cultures exposed to A β 25-35 for 48h. Treatment with atorvastatin 2.5 μ M and 5 μ M was able to prevent the increased level at 48h. Bars represent the mean \pm SEM, n=3. # significantly different from all other groups, p<0.001; (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 7: Atorvastatin protected the cultures against synapse loss induced by A β . **(A)** Representative Western blotting of synaptophysin immunocontent in organotypic hippocampal cultures after 48h of exposure to A β 25-35. **(B)** Quantification of synaptophysin immunocontent after A β peptide exposure and treatment with 2.5 μ M and 5 μ M of atorvastatin. Bars represent the mean \pm SEM, n=7. # significantly different from control culture; * significantly different from A β 25-35 (One-way ANOVA followed by Tukey's test, p<0,05).

Figure 1

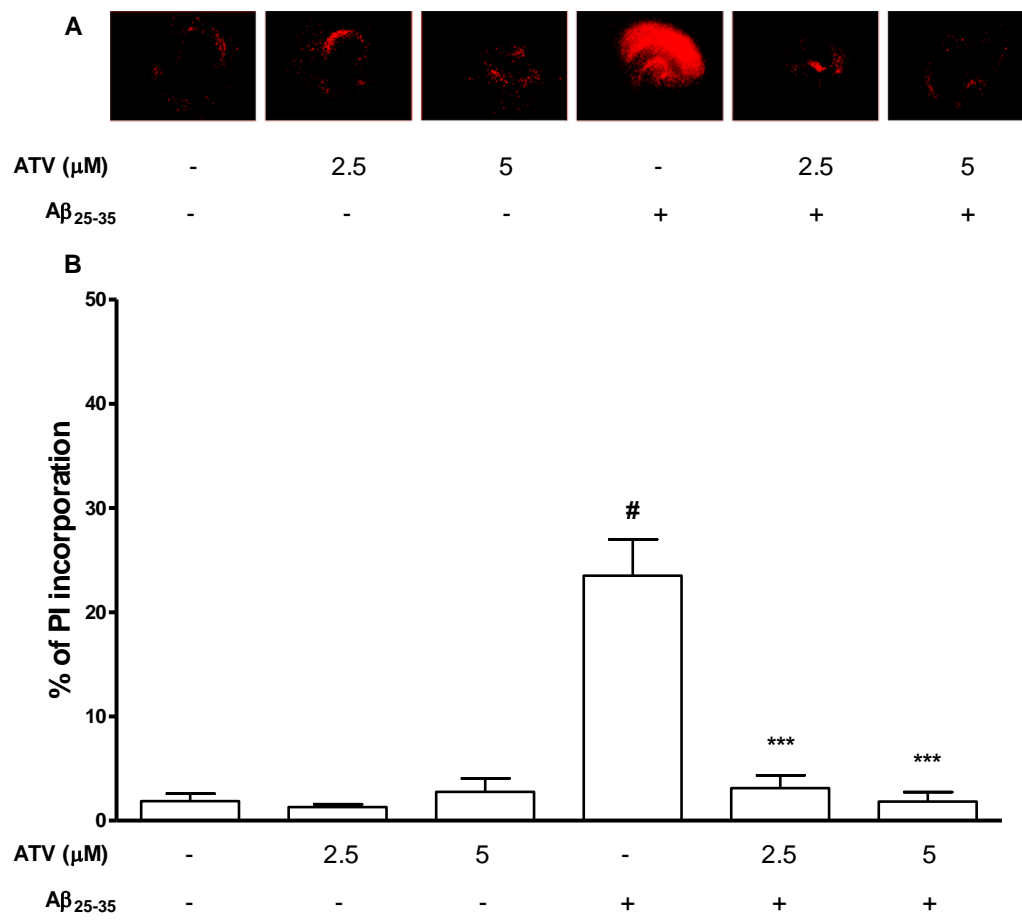


Figure 2

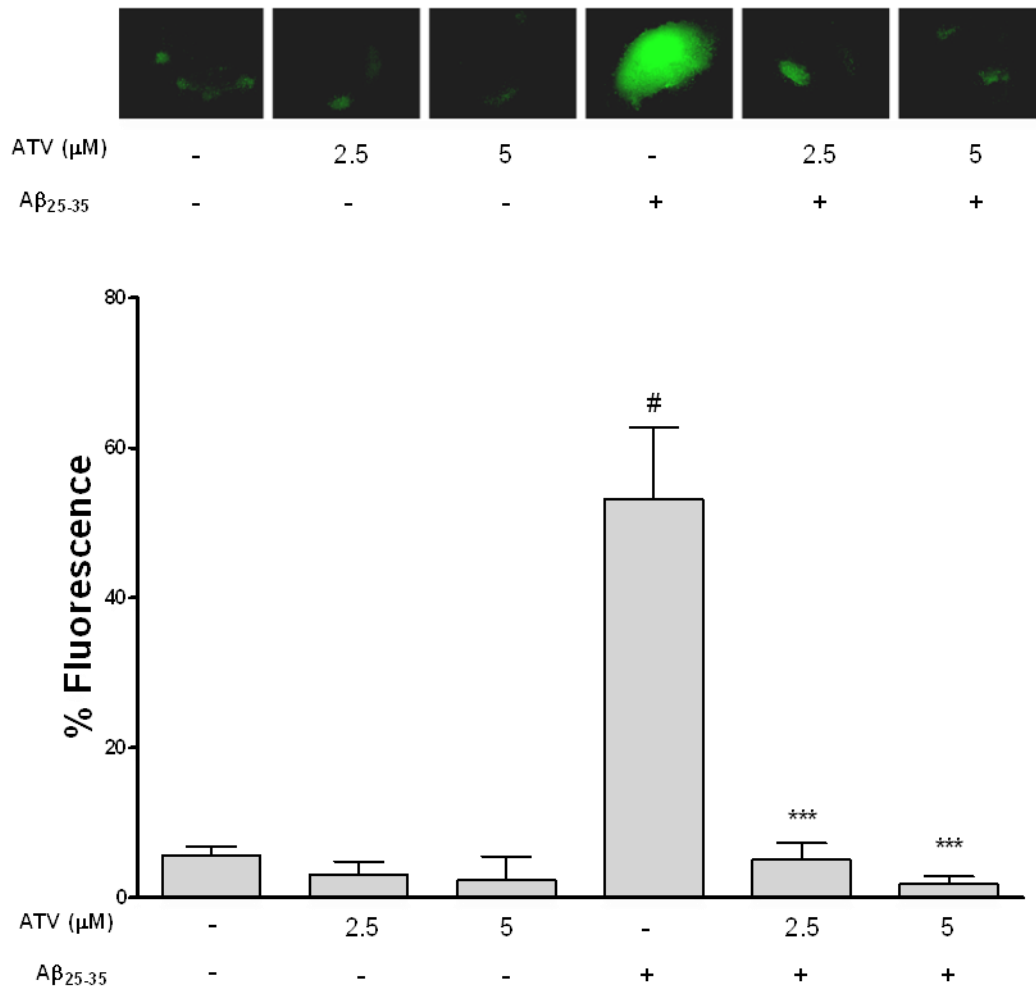


Figure 3

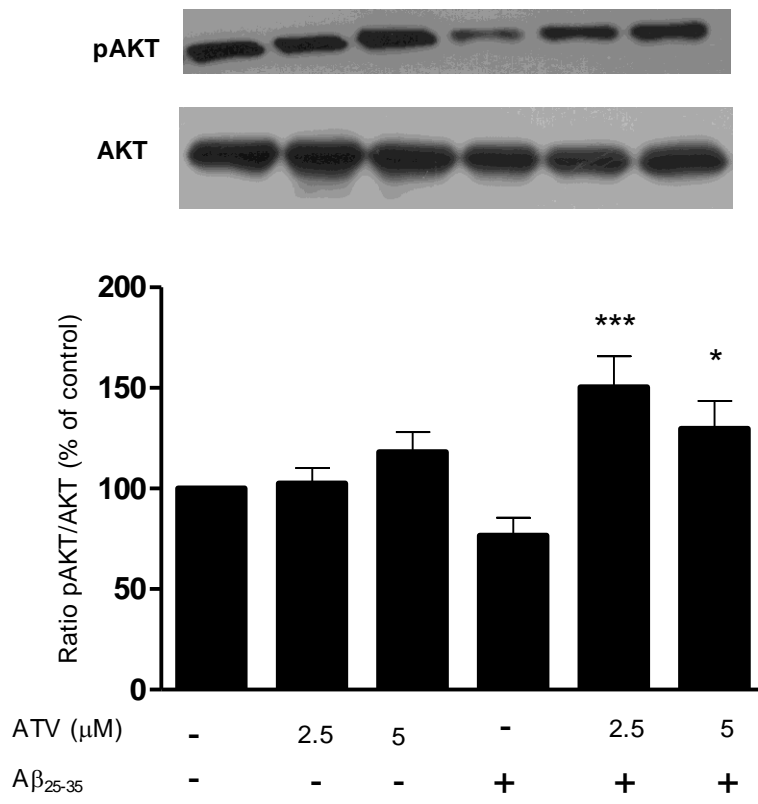


Figure 4

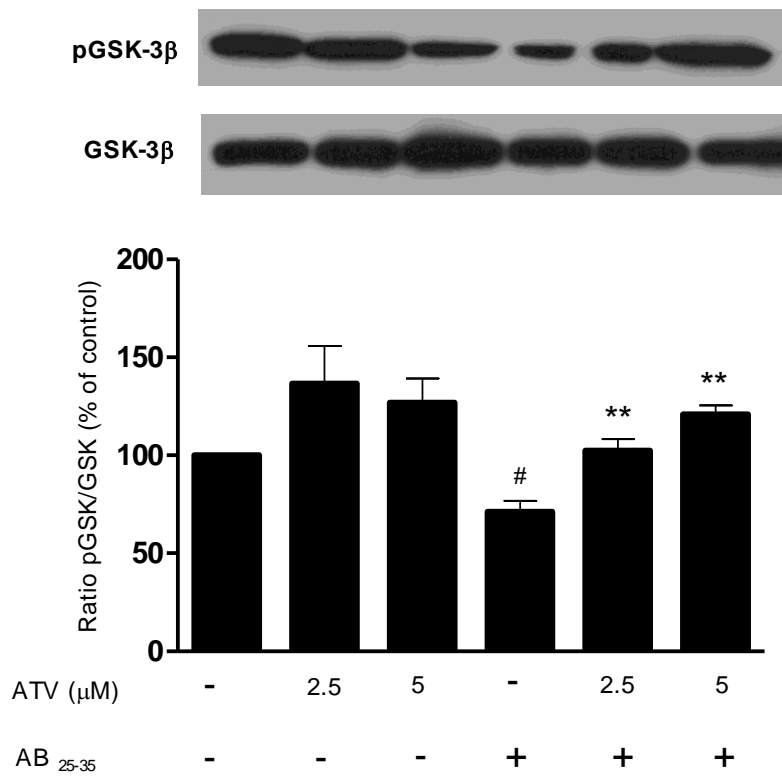


Figure 5

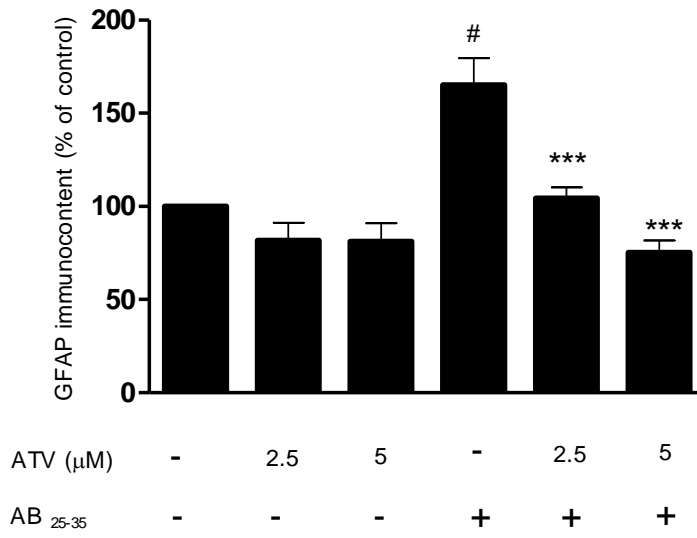
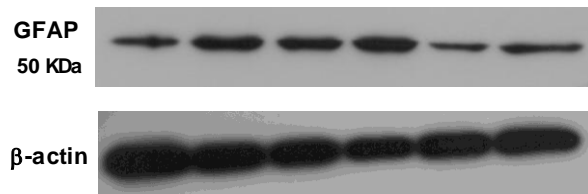


Figure 6

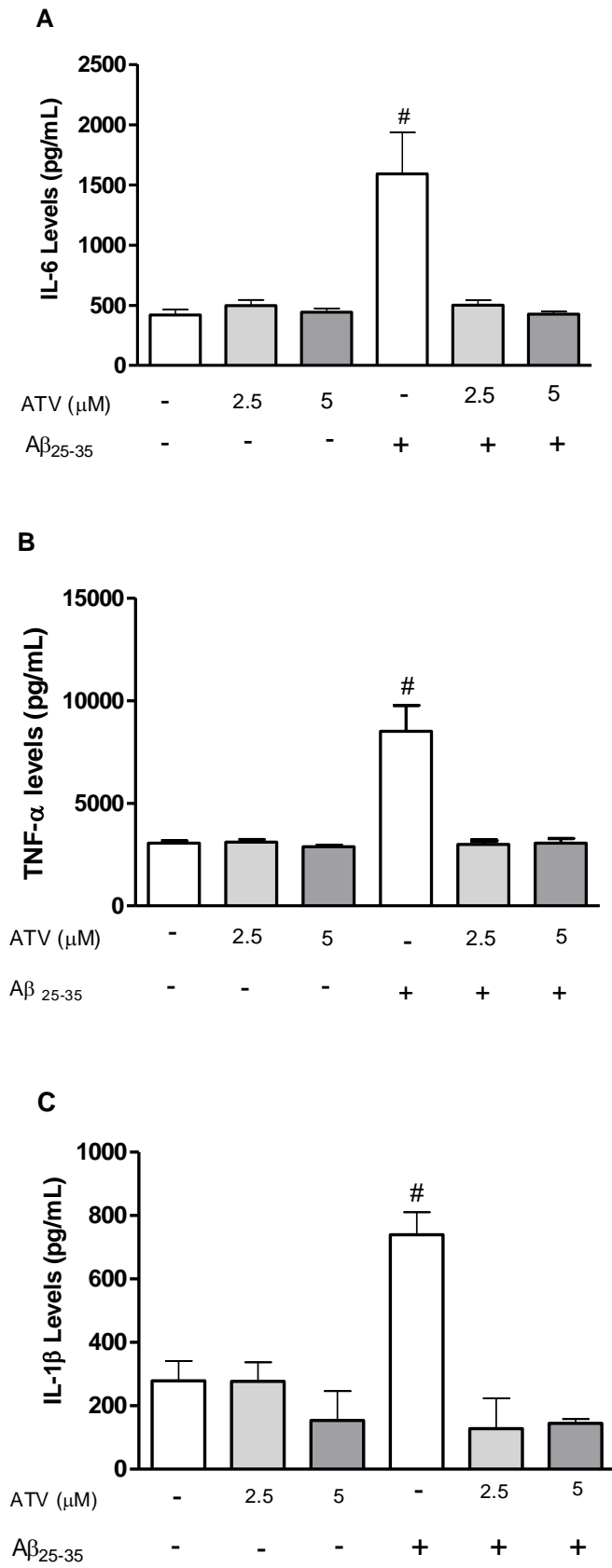
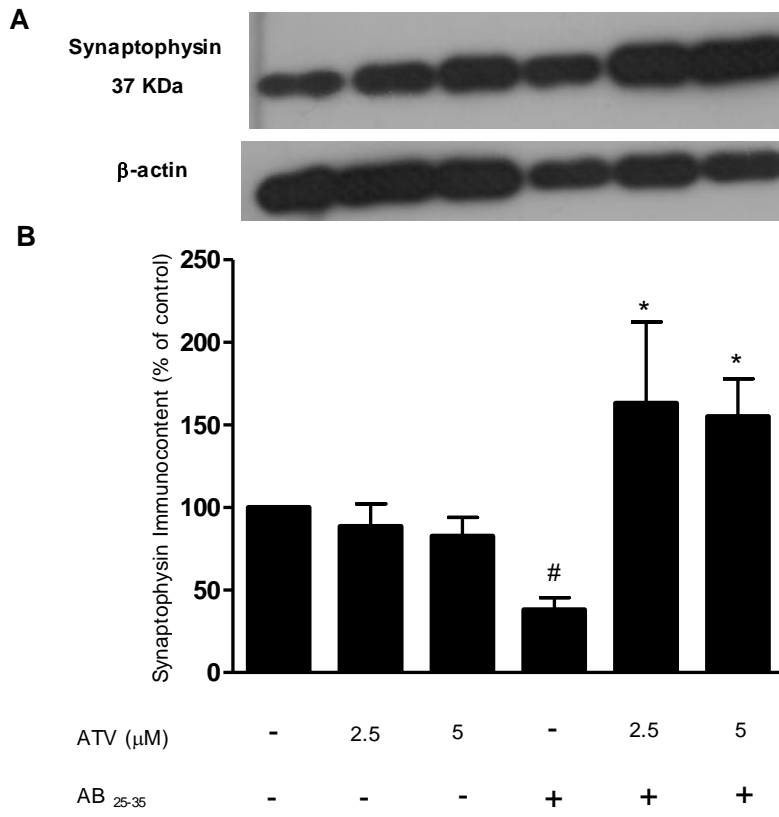


Figure 7



4. DISCUSSÃO

A demência é uma síndrome progressiva e degenerativa do cérebro que afeta a memória, o pensamento, o comportamento e a emoção. Dentre as demências, a DA acomete de 8 a 15% da população com mais de 65 anos (PHILIPSON et al., 2010).

Conforme apresentado na introdução, alterações histopatológicas foram descritas por Alzheimer há mais de um século, porém as características moleculares destas alterações foram elucidadas somente na década de 80 ou seja, a composição das placas senis, formadas pela agregação de subunidades proteicas do peptídeo A β , e os emaranhados neurofibrilares, constituídos por agregados da proteína *tau* hiperfosforilada. Mesmo tendo passado mais de 100 anos desde a descrição do primeiro caso de DA, o diagnóstico definitivo desta doença é obtido unicamente *post-mortem*, sendo possível somente após a detecção das lesões acima descritas no cérebro dos indivíduos.

A teoria da cascata amilóide é a mais aceita pelos pesquisadores no estudo da DA. Segundo ela, as mudanças graduais no metabolismo de agregação do peptídeo A β iniciam uma cascata de eventos que desencadeiam lesões neuronais e inflamatórias culminando na extensiva disfunção e morte neuronal, levando à demência (SELKOE, 1991; HARDY e HIGGINS, 1992). Com as contribuições dos estudos que sucederam essa proposta inicial da cascata amilóide, uma nova versão foi elaborada, incluindo nessa nova hipótese revisada, o impacto neurotóxico do peptídeo A β na sua forma oligomérica (HARDY e SELKOE, 2002).

Com o intuito de buscar um melhor entendimento dos mecanismos neurotóxicos desencadeados pelo peptídeo A β , nosso grupo avaliou seus efeitos em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, um modelo *in vitro* de toxicidade do peptídeo, já bem estabelecido (NASSIF et al., 2007; FROZZA et al., 2009; HOPPE et al., 2010). O fato de este modelo preservar a organização sináptica e celular do circuito intra hipocampal, mantendo, desse modo, várias das características funcionais observadas *in vivo* (HOLOPAINEN, 2005; NORABERG et al., 2005), o torna uma excelente ferramenta para o estudo de neurotoxicidade, focando no tecido hipocampal, uma área importante para o aprendizado e memória e uma das principais regiões afetadas na DA.

O peptídeo A β 25-35, utilizado neste trabalho, representa uma alternativa mais econômica no desenvolvimento de modelos experimentais da DA. Ele exerce uma toxicidade similar ao A β 1-42, uma vez que ele é formado de um fragmento de 11 aminoácidos originário do A β 1-42, que representa a região biologicamente ativa deste. Nosso grupo já demonstrou, em estudos anteriores, que os peptídeos A β 1-42 e seu fragmento, A β 25-35, exercem um efeito tóxico similar na morte celular por necrose e na regulação de vias de sinalização por apoptose em cultura organotípica de hipocampo de ratos (FROZZA et al., 2009).

Apesar do grande avanço no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que envolvem a DA a terapia atual não tem a capacidade de alterar o curso natural da doença, mostrando-se limitada a benefícios sintomáticos. Dentre os muitos compostos investigados, para o tratamento de doenças que acometem o SNC, os efeitos neuroprotetores das estatinas na DA têm sido objeto de muita pesquisa na última década. Estes inibidores da HMG-

CoA-redutase tornaram-se foco da atenção de pesquisadores do mundo inteiro a partir de evidências de que elas poderiam estar associadas com a diminuição do risco da DA (WOLOZIN, 2004). Neste estudo, nós avaliamos o potencial efeito neuroprotetor da atorvastatina, uma estatina de origem sintética, em um modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos, exposta ao peptídeo A β 25-35 por 48h. Nossos resultados mostraram que a exposição das culturas ao peptídeo causou uma significativa morte celular, analisada através do aumento da incorporação do corante IP. Como pode ser observado na Figura 1, o tratamento com atorvastatina em ambas concentrações utilizadas, 2,5 μ M e 5 μ M, preveniu significativamente a morte celular induzida pela exposição das culturas ao peptídeo A β 25-35. As concentrações de atorvastatina que se mostraram neuroprotetoras em nosso trabalho estão de acordo com as de outros estudos envolvendo modelos *in vitro* de toxicidade do peptídeo A β (PARVATHY et al., 2004). As concentrações de 100nM, 250nM, 500nM e 1 μ M de atorvastatina também foram testadas, porém elas não diminuíram a morte celular induzida pelo peptídeo A β 25-35. Já concentrações superiores a 5 μ M apresentaram neurotoxicidade (dados não mostrados).

Entre os possíveis mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor da atorvastatina, alguns estudos sugerem que o tratamento com estatinas aumenta a atividade da α -secretase e diminui a atividade da β -secretase favorecendo, dessa forma, o processamento não amiloidogênico da APP (SJÖGREN et al., 2006). Por outro lado, acredita-se que a atorvastatina diminua a toxicidade e a produção de A β impedindo a clivagem da APP pela γ -secretase e β -secretase, e conseqüentemente reduzindo a formação de placas (PEDRINI et al., 2005; ZIGMAN et al., 2007).

O mecanismo molecular pelo qual o A β induz a morte neuronal é bastante controverso. Alguns estudos sugerem que a neurotoxicidade induzida pelo A β resulta do estresse oxidativo por ele gerado (WANG et al., 2007). A Figura 2A mostra que a exposição das culturas aos peptídeos A β 25-35 causou um significativo aumento na produção de espécies reativas. O tratamento com atorvastatina (2,5 e 5 μ M) diminuiu a fluorescência do DCF, o que indica que ela foi capaz de prevenir a produção de espécies reativas. Este resultado sugere que o efeito antioxidante da atorvastatina pode contribuir para seu efeito neuroprotetor, já que mecanismos oxidativos estão envolvidos na morte celular que ocorre na DA. Além disso, já foi descrito que entre os efeitos benéficos das estatinas, devido às suas propriedades antioxidantes, está a melhora nos déficits de memória (KURINAMI et al.,2008).

Na sequência do nosso estudo, nós avaliamos o efeito da atorvastatina sobre a via de sinalização de sobrevivência celular mediada pela PI3K/Akt. Consta na literatura que as estatinas ativam diversas vias de sinalização celular que exercem efeitos neuroprotetores, podendo-se citar o aumento na produção de BDNF e a ativação das vias da PI3K/Akt, Wnt e ERK (MOST et al., 2009). A via mediada pela PI3K/Akt é uma importante via celular anti-apoptótica. A Akt é a principal cinase desta via que promove a sobrevivência celular, devido a sua habilidade de fosforilar e inativar vários alvos pró-apoptóticos, tal como a GSK-3 β . A desfosforilação/inativação da Akt em culturas organotípicas expostas ao peptídeo A β 25-35 já foi estabelecido em nosso grupo (NASSIF et al., 2007). Nossos resultados mostram que a exposição das culturas ao peptídeo A β 25-35 por 48h ocasionou uma diminuição nos níveis da Akt na sua forma fosforilada (Figura 3A) e uma consequente diminuição na fosforilação da GSK3 β (Figura

4A). O tratamento com atorvastatina preveniu a diminuição na fosforilação da Akt (Figura 3B) bem como a desfosforilação/ativação da GSK3 β (Figura 4B).

Além de sua atividade pró-apoptótica, a GSK-3 β é a principal cinase envolvida na formação dos emaranhados neurofibrilares (INESTROSA et al., 2002; FUENTEALBA et al., 2004; MATEO et al., 2006). A proteína *tau* normalmente contém 85 sítios que podem sofrer fosforilação. Destes, 40 foram identificados na isoforma de *tau* encontrada no cérebro de pacientes com DA: 28 em Serina, 10 em Treonina e 2 em Tirosina (HANGER et al., 2009). A GSK-3 β pode fosforilar 23 destes sítios sugerindo que esta cinase é uma das mais importantes envolvidas na regulação da fosforilação da proteína *tau* no cérebro. A partir dos nossos resultados, pode-se sugerir que a atorvastatina poderá prevenir a fosforilação da proteína *tau*, e a formação dos emaranhados neurofibrilares, através da inibição da GSK-3 β . Já foi demonstrado por Lu e colaboradores (LU et al., 2010) que o tratamento crônico por via oral com atorvastatina (15 mg/Kg/dia) *in vivo*, foi capaz de inibir a hiperfosforilação da *tau*.

A noção de que mecanismos inflamatórios poderiam estar envolvidos na patogênese da DA está presente desde o início das pesquisas desta doença. No mesmo ano em que Alzheimer descreveu o caso de August D., Oskar Fischer publicou um artigo sobre a formação de placas em pacientes com demência senil. Neste artigo e no seguinte, em 1910, ele afirmou que a formação de placas seria o resultado da deposição extracelular de uma substância peculiar estranha no córtex que induziria uma reação inflamatória local. Nesta época, o papel da microglia ainda era obscuro, embora investigadores já tivessem sugerido que as células gliais no cérebro possuíam

funções similares as dos macrófagos em outros tecidos (EIKELENBOOM et al., 2006). Atualmente, já está bem estabelecido a ativação da microglia em resposta a condições adversas ou patológicas. Um dos eventos neurotóxicos induzidos pelo peptídeo A β é a exacerbada ativação da microglia com elevação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e radicais livres. Tem sido demonstrando que a ativação da microglia contribui para o dano neuronal encontrado no cérebro de pacientes acometidos pela DA (BRITSCHGI e WYSS-CORAY, 2007; FLODEN et al., 2005). O preciso mecanismo pelo qual o peptídeo A β inicia a resposta inflamatória mediada pela microglia, ainda é desconhecido e vem sendo foco de interesse em muitos estudos. Já está demonstrado que tanto o peptídeo A β quanto a APP agem como potentes ativadores da microglia (BARGER e HARMON, 1997). Uma via dependente de NF κ B, necessária para a transcrição dos genes das citocinas, é estimulada pelo peptídeo A β (COMBS et al., 2001). Coletivamente, esses achados sugerem que a ativação da microglia pela exposição ao peptídeo A β , pode ser um passo crucial no início do processo de inflamação na DA.

Em situações fisiológicas, as células microgliais se encontram em um estado quiescente, mas em resposta a eventos neurodegenerativos, elas tornam-se ativadas e passam a liberar uma variedade de mediadores proinflamatórios, incluindo citocinas, espécies reativas, fatores do complemento e óxido nítrico (NO) que podem levar à disfunção neuronal e morte celular, possivelmente criando um ciclo vicioso (GRIFFIN et al., 1998; SRIRAM e O'CALLAGHAN, 2007). Assim, um processo inflamatório crônico, desencadeado pelo acúmulo e deposição do peptídeo A β , parece ter importante contribuição na neurodegeneração observada na DA. Na DA, os

principais mediadores da inflamação são os astrócitos reativos e a microglia ativada circundantes às placas senis (AKIYAMA et al., 2000; WYSS-CORAY, 2006; ZAHEER et al., 2008), que, secretando citocinas e produtos neurotóxicos, contribuem para a degeneração e morte celular (SASTRE et al., 2006). Trabalhos demonstram que os astrócitos, além de participarem na expressão de mediadores pró-inflamatórios, podem atuar como uma fonte de peptídeo A β , uma vez que apresentam uma superexpressão de β -secretase, em resposta ao estresse crônico (ROSSNER et al., 2005). Uma característica da astrogliose reativa é a regulação positiva da proteína glial fibrilar ácida GFAP, reconhecida como um marcador para astrócitos reativos, uma vez que é expressa principalmente por astrócitos diferenciados no SNC (MCGEER e MCGEER, 2003). Neste trabalho, mostramos que a atorvastatina diminuiu o imunoconteúdo da GFAP, indicando sua ação na prevenção da ativação de astrócitos. Esses resultados estão de acordo com um estudo prévio no qual foi demonstrado que o tratamento com atorvastatina previne o aumento no número de células imunorreativas para GFAP, induzido tanto pelo peptídeo A β 1-40 quanto pelo peptídeo A β 25-35 (PIERMARTIRI et al., 2010).

Conforme descrito acima, a ativação glial presente na DA, pode agravar o dano tecidual por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Praticamente todas as citocinas que vem sendo estudadas na DA, encontram-se em níveis elevados em comparação com indivíduos controle saudáveis (HENEKA e O'BANION, 2007). A partir da observação de que exposição das culturas ao peptídeo A β 25-35 ocasionou uma ativação astrogliar, decidimos avaliar os níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Nossos resultados mostram que o tratamento com 2,5 ou 5 μ M de atorvastatina foi capaz de reduzir

significativamente a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no meio de cultivo das culturas expostas ao peptídeo A β 25-35, o que era esperado uma vez que o tratamento com atorvastatina havia previamente prevenido a ativação astrocitária.

Além da presença das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, principais características neuropatológicas, a distrofia neurítica e a perda de sinapses, tanto quanto a morte neuronal, também são características patológicas marcantes encontradas na DA (LACOR et al., 2004). Somado a isso, é crescente o número de evidências que mostram que a deterioração morfológica e funcional de sinapses, fundamentais para a formação de memória, é induzida por oligômeros do peptídeo A β (DE FELICE et al., 2009). Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com atorvastatina sobre as sinapses, nós medimos os níveis da proteína sinaptofisina, que está relacionada com a função sináptica. Nós observamos uma clara diminuição nos níveis de sinaptofisina nas culturas expostas ao peptídeo A β . A atorvastatina foi capaz de prevenir esta diminuição, o que nos permite sugerir que ela possa agir preservando as vesículas sinápticas, que por sua vez, são componentes essenciais para a comunicação interneuronal. Em um modelo de acidente vascular cerebral, o aumento nos níveis de sinaptofisina, promovidos pelo tratamento com atorvastatina (10 mg/Kg), também foram observados (CHEN et al., 2005).

As abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento da DA até os dias atuais, falham em retardar a progressão rápida da neurodegeneração, e a necessidade por novas e efetivas estratégias é urgente, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida e o crescimento da população idosa. Nosso

grupo vem investigando mecanismos celulares de possíveis candidatos a agentes terapêuticos que possam prevenir ou minimizar o avanço da doença.

O conjunto dos resultados deste trabalho sugerem que a atorvastatina possa exercer efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β através da ativação da via de sobrevivência celular (PI3K) por meio da ativação da Akt e inibição da GSK-3 β , assim como, prevenindo a ativação glial, reduzindo os níveis de liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e conseqüentemente a neuroinflamação. É sabido que o estresse oxidativo contribui para as lesões observadas na DA, mas não há consenso de que haja uma relação deste com a neuroinflamação. No entanto, a microglia ativada é uma fonte abundante de espécies reativas no SNC (MCGEER e MCGEER, 2003). Partindo-se dessa afirmação, pode-se inferir que a diminuição na produção de espécies reativas observada com o tratamento com atorvastatina (Figura 2), pode ser devido também a sua propriedade anti-inflamatória somada a sua atividade como antioxidante.

Nosso trabalho traz informações relevantes para o estudo da patogênese da DA, e pode contribuir para a descoberta de uma nova e eficiente abordagem terapêutica.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que:

- a) O tratamento agudo com atorvastatina nas concentrações de 2,5 μ M e 5 μ M preveniu tanto a morte celular quanto a produção de espécies reativas, em culturas organotípicas de hipocampo de ratos induzidos pela exposição ao A β 25-35 por um período de 48h;
- b) A atorvastatina foi capaz de ativar a via da PI3K, por meio da ativação/fosforilação da Akt e inativação da GSK3 β ;
- c) A atorvastatina, em ambas concentrações, preveniu a ativação astrogliar induzida pela exposição por 48h ao A β 25-35, observada por meio do aumento no imunoconteúdo da GFAP;
- d) O peptídeo A β 25-35 induziu o aumento dos níveis de liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e a atorvastatina foi capaz de prevenir este aumento;
- e) A atorvastatina promoveu o aumento no imunoconteúdo da proteína sinaptofisina, sugerindo uma ação protetora sobre as vesículas sinápticas, submetidas à ação tóxica do peptídeo A β .

6. PERSPECTIVAS

- Estudar o envolvimento da via de sinalização mediada pela via canônica Wnt/ β -catenina em resposta ao peptídeo A β 25-35 e ao tratamento com resveratrol;
- Avaliar o efeito da atorvastatina sobre a hiperfosforilação da proteína *tau* decorrente da exposição ao A β 25-35;
- Estudar o efeito da atorvastatina sobre a ativação glial induzida pela exposição ao A β 25-35, por meio da reatividade da Isolectina B4;
- Investigar o potencial terapêutico da atorvastatina em um modelo *in vivo* da DA induzida pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A β 25-35 em ratos de 60 dias;
- Avaliar o efeito da atorvastatina sobre parâmetros comportamentais após injeção i.c.v. do peptídeo A β 25-35;
- Estudar o envolvimento da neuroinflamação em resposta ao peptídeo A β 25-35 injetado i.c.v. e ao tratamento com atorvastatina através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias, da investigação do envolvimento das vias de sinalização celular mediadas pela JNK e p38.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZHEIMER, A. Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allg Z Psychiatr** 64: 146-148, 1907.

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

ARRIGADA, P.V.; GROWDON, J.H.; HEDLEY-WHITE, T.; HYMAN, B.T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity in Alzheimer's disease. **Neurology** 42: 631-639, 1992.

BARGER, S. W.; HARMON, A. D. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. **Nature** 338: 878-881.

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

BRAAK, H.; BRAAK, E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. **J. Neural Transm. Suppl** 53:127-140, 1998.

BRITSCHGI, M.; WYSS-CORAY, T. Systemic and acquires immune responses in Alzheimer's disease. **Int Rev Neurobiol** 82: 205-233, 2007.

BU, G.; CAM, J.; ZERBINATTI, C. LRP in amyloid- β production and metabolism. **Ann NY Acad Sci** 1086: 35-53, 2006.

BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nat Rev Neurosci** 10: 333-344, 2009.

BURNS, A.; BYRNE, J.; MAURER, K. Alzheimer's disease. **Lancet** 1086: 35-53, 2002.

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

BUTTERFIELD, D. A.; T. REED; NEWMAN, S.F.; SULTANA, R. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Free Radic Biol Med** 43: 658-77. 2007.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Pro-apoptotic action of Par-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of Bcl-2 expression. **J Neurosci Res**, 61: 134-139, 2000.

CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded protein. **Lancet** 363: 1139-1146, 2004.

CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in Discovery and development. **Nature Neurosci Sup** 5: 1055-1057, 2002.

CHAUHAN N.B. Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease. **J Lipid Res** 44: 2019-29, 2003.

CHEN, J.; ZHANG, C.; JIANG, H.; ZHANG, L.; ROBIN, A.; KATAKOWSKI, M.; LU, M.; CHOPP, M. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. **J Cereb Blood Flow Metab** 25(2): 281-290, 2005.

CHONG, Y.H.; SHIN, Y.J.; LEE, E.O.; KAYED, R.; GLABES, C.G.; TENNER, A.J. ERK1/2 activation mediates A β oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. **J Biol Chem** 281: 20315-20325, 2006.

CLARKE, R.M., O'CONNELL, F., LYONS, A., LYNCH, M.A. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of amyloid-beta1–42 in the rat hippocampus in vivo. **Neuropharmacology** 52: 136–145, 2007.

COMBS, C. K.; KARLO, J. C.; KAO, S. C.; LANDRETH, G. E. Beta_Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. **J Neurosci** 21(4): 1179-1188.

CROUCH, P. J.; HARDING, S. M. E.; WHITE, A.R.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I.; MASTERS, C. L. Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol** 40: 181-198, 2008.

DE FELICE, F.G.; VIEIRA M.N.; BOMFIM, T. R.; DECKER, H.; VELASCO, P. T.; LAMBERT, M. P.; VIOLA, K. L.; ZHAO, W. Q.; FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. **Pro Natl Acad Sci USA** 106(6) 1971-1976, 2009.

EIKELENBOOM, P.; VEERHUIS, R.; SCHEPER, W.; ROZEMULLER, A. J. M.; VAN GOOL, W. A.; HOOZEMANS, J. J. M. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 113: 1685-1695, 2006.

FLODEN, A.M.; LI, S.; COMBS, C.K. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. **J Neurosci** 25(10): 2566-2575, 2005.

FINDER, V. H.; GLOCKSHUBER, R. Amyloid-beta aggregation. **Neurodegener Dis** 4: 13-27, 2007.

FROZZA, R.L., HORN, A.P., HOPPE, J.B., SIMÃO, F., GERHARDT, D., ARGENTA-COMIRAN, R., SALBEGO, C. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochem Res** 34: 295-303, 2009.

GELLERMANN, G. P., BYRNES, H.; STRIEBINGER, A.; ULLRICH, K.; MUELLER, R.; HILLEN, H.; BARGHORN, S. A β -globulomers are formed independently of the fibril pathway. **Neurobiol Dis** 30: 212-220, 2008.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. A Century of Alzheimer's disease. **Science** 314: 777-780, 2006.

GOLDE, T.E. Inflammation takes on Alzheimer's disease. **Nat Med** 8(9): 936-938, 2002.

GONG, Y.; CHANG, L.; VIOLA, K.L.; LACOR, P.N.; LAMBERT, M.P.; FINCH, C.E.; KRAEFFT, G.A.; KLEIN, W.L. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Biochem Biophys Res Commun** 351: 259-265, 2006.

GRIFFIN, W .S.; Sheng, J. G.; ROYSTON, M .C.; GENTLEMAN, S. M.; MCKENZIE, J. E.; GRAHAM, D. I.; ROBERTS, G. W.; MRAK, R. E. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a cytokine cycle in disease progression. **Brain Pathol** 8(1): 65-72, 1998.

GUO, J.T.; YU, J.; GRASS, D.; BEER, F.C. KINDY, M.S. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum Amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. **J Neurosci** 22(14): 5900-5909, 2002

HAASS, C.; SCHLOSSMAN, M.G.; HUNG, A.Y.; VIGO-PELFREY, C.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B.L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E.H.; SCHENCK, D.; TELOW, C.B.; SELKOE, D.J. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature** 359: 322-325, 1992.

HAASS, C.; SELKOE, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. **Nature** 8: 101-112, 2007.

HANGER, D.P.; SEEREERAM, A.; WOBLE, W. Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Expert Rev Neurother** 9(11): 1647-1666, 2009.

HAMDANE, M.; DELOBEL, P.; SAMBO, A.V.; SMET, C.; BÉCARD, S.; VIOLLEAU, S.; LANDRIEU, I.; DELACOURTE, A.; LIPPENS, G.; FLAMENT, S.; BLUÉE, L. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? **Biochem Pharmacol** 66(8): 1619-1625, 2003.

HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol** 184: 69-91, 2007.

HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K.; TERWEL, D. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 117: 919-947, 2010.

HANSEN, R.A.; GARTKEHNER, G.; WEBB, A.P.; MORGAN, L.C.; MOORE, C.G.; JONAS, D.E. Efficacy and safety of donepezil, galantamina and rivastigmina for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Clin Interv Aging** 3(2): 211-225, 2008.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the Road to therapeutics. **Science** 297: 353-356, 2002.

HERZ, J.; BEFFERT, U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. **Nat Neurosci** 1: 51-58, 2000.

HOLOPAINEN, I.E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal death, neuroprotection, and synaptic plasticity. **Neurochem Res** 30: 1521-1528, 2005.

HOPPE, J.B.; FROZZA, R.L.; HORN, A.P.; COMIRAN, R. A.; BERNARDI, A.; CAMPOS, M.M.; BATTASTINI, A.M.; SALBEGO, C. Amyloid- β neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , *tau* and neuroinflammation. **J Pineal Res** 48, 230-238, 2010.

HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem** 104: 1433-1439, 2008.

INESTROSA, N.C.; DE FERRARI, G.V.; GARRIDO, J.; ALVAREZ, A., OLIVARES, G.H.; BARRIA, M.I.; BRONFMAN, M.; CHACÓN, M.A. Wnt signaling involvement in b-amyloid-dependent neurodegeneration. **Neurochem Int** 41:341–344, 2002.

ITTNER, L.M.; GOTZ, J. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci** 12: 65-72, 2011.

IQBAL, K.; ALONSO, A. C.; CHEN, S.; CHOCHAN, M. O.; EL-AKKAD, E.; GONG, C.X.; KHATOON, S.; LI, B.; LIU, F.; RAHMAN, A.; TANIMUKAI, H.; GRUNDKE-IQBAL, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other taupathies. **Biochim Biophys Acta** 118: 198-210, 2005.

IQBAL, K.; LIU, F; GONG, C.X; ALONSO, A. C.; GRUNDKE-IQBAL, I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. **Acta Neuropathol** 118: 53-69, 2009.

JIANG, B.; JING, D.; LIU, J.H.; BAO, Y.M.; AN, L.J. Catalpol attenuates the neurotoxicity by β -amyloid1-42 in cortical neuron-glia cultures. **Brain Res** 1188: 139-147, 2008.

LEE, J.; LEE, Y.; YUK, D.; CHOI, D.; BAN, S.; OH, K.; HONG, J. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **J Neuroinflammation** 5(37): 1-14, 2008.

JELLINGER, K. A. General aspects of neurodegeneration. **J Neural Transm** 65: 101-144, 2003.

KANG, J.; LEMAIRE, H.G.; UNTERBECK, A.; SALBAUM, J.M.; MASTERS, C.L.; GRZESCHIK, K.H.; MULTHAUP, G.; BEYREUTHER, K.; MÜLLER-HILL, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid-A4 protein resembles a cell surface receptor. **Nature** 325: 733-736, 1987

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nat Rev Drug Dis** 10: 698-712, 2011.

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

LACOR, P.N.; BUNIEL, M. C.; CHANG, L.; FERNANDEZ, S. J.; GONG, Y.; VIOLA, K. L.; LAMBERT, M. P.; VELASCO, P. T.; BIGIO, E. H.; FINCH, C. E.; KRAEFFFT, G. A.; KLEIN, W. L. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. **J Neurosci** 24(45): 10191-10200, 2004.

LAFERLA, F.M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci** 3(11): 862-872, 2002.

LAFERLA, F.M.; GREEN, K.N.; ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nat Neurosci** 8: 499-509, 2007.

LEE, Y.J.; HAN, S.B.; NAM, S.Y.; OH, K.Y.; HONG, J.T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res** 33: 1539-1556, 2010.

LI, M.; WANG, X.; MEINTZER, M.K.; LAESSIG, T.; BIRNBAUM, M.J.; HEIDEREICH, K.A. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. **Mol Cell Biol** 20: 9356-9363, 2000.

LI, X.; BIJUR, G.N.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers and neuroprotection. **Bipolar Disord** 4: 137-144, 2002.

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

LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R. Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid. **Arch Neurol** 58: 392-396, 2001.

LU, F.; LI, X.; SUO, A.Q.; ZHANG, J. W. Inhibition of tau hyperphosphorylation and beta amyloid production in rat brain by oral administration of atorvastatin. **Chin Med J** 123(14): 1864-1870, 2010.

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

MATEO, I.; INFANTE, J.; LLORCA, J.; RODRIGUEZ, E.; BERCIANO, J.; COMBARROS, O. 2006. Association between glycogen synthase kinase-3 β genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord** 21, 228–232, 2006.

MATTSON, M.P. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. **Physiol Reviews** 77: 1081-1132, 1997.

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

MCGEER, E.G; MCGEER, P.L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 27: 741-749, 2003.

MCNAULL, B.B.; TODD, S.; MCGUINNESS, B.; PASSMORE, A. P. Inflammation and antiinflammatory strategies for Alzheimer's disease – a mini-review. **Gerontology**. 56: 3-14, 2010.

MIIDA, T.; HIRAYAMA, S.; NAKAMURA, Y. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. **J Atheroscler Thromb** 11: 253-264, 2004.

MÖLLER, H.J.; GRAEBER, M.J. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci** 248: 111-122, 1998.

MOST, P.; DOLGA, A.; NIJHOLT, I.; LUITEN, P.; EISEL, U. Statins: Mechanisms of neuroprotection. **Prog Neurobiol** 88, 64-75, 2009.

NASSIF, M.; HOPPE, J.; SANTIN, K.; FROZZA, R.; ZAMIN, L.L.; SIMÃO, F.; HORN, A.P.; SALBEGO, C. β -amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 β , and PTEN. **Neurochem Int** 50: 229-235, 2007.

NORABERG, J.; KRISTENSEN, B.W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res Protocol** 3: 278-290, 1999.

NORABERG, J.; POULSEN, F.R.; BLAABJERG, M.; KRISTENSEN, B.W.; BONDE, C.; MONTERO, M.; MEYER, M.; GRAMSBERG, J.B.; ZIMMER, J. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disor** 4(4): 435-452, 2005.

PARVATHY, S., EHRLICH, M., PEDRINI, S., DIAZ, N., REFOLO, L., BUXBAUM, J.D., BOGUSH, A., PETANCESKA, S., GANDY, S. Atorvastatin-induced activation of Alzheimer's alpha secretase is resistant to standard inhibitors of protein phosphorylation-regulated ectodomain shedding. **J Neurochem** 90, 1005-1010, 2004.

PASTORINO, L.; LU, K.P. Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol** 545: 29-38, 2006.

PEDRINI, S.; CARTER, T.L.; PRENDERGAST, G.; PETANCESKA, S.; EHRlich, M.E.; GANDY, S. Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. **PLoS Med** 2(1): 69-78.

PHIEL, C.J.; WILSON, C.A.; LEE, V.M.; KLEIN, P.S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **Nature** 425: 435-439, 2003.

PHILIPSON, O.; LORD A, GUMUCIO, A.; O' CALLAGHAN, P.; LANNFELT, L.; NILSSON, L.N. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. **Febs J** 277:1389-1409, 2010

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

PIMPLICAR, S.X. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol** 41: 1261-1268.

POTTER, P.E. Investigational medications for treatment of patients with Alzheimer's disease. **J Am Osteopath Assoc** 110: 27-36, 2010.

QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med** 362: 329-344, 2010.

REISS, A.B.; WIRKOWISKI, E. Statins in neurological disorders: mechanisms and therapeutic value. **Scientific World Journal** 9: 1242-1259, 2009.

ROSSNER, S.; LANGE-DOHNA, C.; ZEITSCHEL, U.; PEREZ-POLO, J.R. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. **J Neurochem** 92(2): 226-234, 2005.

RYDER, J.; SU, Y.; NI, B. Akt/GSK3 β serine/threonine kinases: evidence for a signaling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. **Cell Signal** 16: 187-200, 2004.

SASTRE, M.; KLOCKGETHER, T.; HENEKA, M. T. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. **Int J Devl Neuroscience** 24: 167-176, 2006.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chem Res Toxicol** 21: 172-188, 2008.

SELKOE, D.J. Amyloid protein and Alzheimer's disease. **Sci Am** 265(5): 68-7, 1991.

SELKOE, D.J. Alzheimer's Disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Reviews** 81: 741-766, 2001.

SELKOE, D.J.; SCHENK, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 43: 545-584, 2003.

SELKOE, D.J. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. **Nat Med** 17: 1060-1065, 2011.

SHOJI, M.; GOLDE, T.T.; GHISO, J.; CHEUNG, T.T.; ESTUS, S.; SHAFFER, L.M.; CAI, X.; MCKAY, D.M.; TINTNER, R.; FRANGIONE, B.; YOUNKIN, S.G. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **Science** 258: 126-129, 1992.

SJÖGREN, M., MIELKE, M., GUSTAFSON, D., ZANDI, P., SKOOG, I. Cholesterol and Alzheimer's disease - is there a relation? **Mech Ageing Dev** 127: 138-147, 2006.

SLACEDO-TELLO, P.; MATAMOROS, A.O.; ARIAS, C. GSK3 in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. **Int J Alzheimers Dis** 2011: 189728, 2011.

SMITH, M. A.; RICHEY HARRIS, P. L.; SAYRE, L. M.; BECKMAN, J. S.; PERRY, G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. **J Neurosci** 17: 2653-2657, 1997.

SNYDER, E.M.; NONG, Y.; ALMEIDA, C.G.; PAUL, S.; MORAN, T.; CHOI, F.Y.; NAIM, A.C.; SALTER, M.W.; LOMBROSO, P.J.; GOURAS, G.K.; GREENGARD, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . **Nature Neurosci** 8: 1051-1058, 2005.

SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J.P. Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol** 2: 140-153, 2007.

STOPPINI, L.; BUCHS, P.A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods** 37: 173-182, 1991.

SUH, Y.; CHECLER, F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. **Pharmacol Rev** 54: 469-525, 2002.

TABNER, B.J; TURNBULL, S.; EL-AGNAF, O.; ALLSOP, D. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. **Curr Top Med Chem** 6: 507-517, 2001.

TAKASHIMA, A.; HONDA, T.; YASUTAKE, K.; MICHEL, G.; MURAYAMA, O.; MURAYAMA, M.; ISHIGURO, K.; YAMAGUCHI, H. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. **Neurosci Res** 31: 317-323, 1998.

TROJANOWSKI, J.Q.; SMITH A.B.; HURYN, D.; LEE, V.M. Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. **Int J Pharm** 6: 683-686, 2005.

TOWNSEND, M.; MEHTA, T.; SELKOE, D.J. Soluble A beta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. **J Biol Chem** 282: 33305-33312.

VEILLARD, N.R.; MACH, F. Statins: the new aspirin? **Cell Mol Life Sci** 59: 1771-1786, 2002.

WANG, X.C.; ZHANG, Y.C.; CHATTERJIE, N.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; WANG, J.Z. Effect of melatonin and melatonylvalpromide on β -amyloid and neurofilaments in N2a cells. **Neurochem Res** 33: 1138-1144, 2007.

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

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

WINBLAD, B.; JONES, R.W.; WIRTH, Y.; STOFFLER, A.; MOBIUS, H.J. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Dement Geriatr Cogn Disord** 24(1): 20-27, 2007.

WOLOZIN, B. Cholesterol, statins and dementia. **Curr Opin Lipidol** 15: 667-672, 2004.

WOOD, W.G.; ECKERT, G.P.; IGBAVBOA, U.; MÜLLER, W.E. Statins and neuroprotection: a prescription to move the field forward. **Ann NY Acad Sci** 1199: 69-76, 2010.

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer's disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med** 12(9): 1005-1015, 2006. YOUNKIN, S.G. The role of A β 42 in Alzheimer's disease. **J Physiol Paris** 92: 289-292, 1998.

YUAN, J., YANKER, A. Apoptosis in the nervous system. **Nature** 407: 802-809, 2000.

ZAHEER, A.; ZAHEER, S.; THANGAVEL, R.; WU, Y.; SAHU, S.K.; YANG, B. Glia maturation factor modulates β -amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. **Brain Res** 1208: 192-203, 2008.

ZAHEER, A.; ZAHEER, S.; THANGAVEL, R.; WU, Y.; SAHU, S.K.; YANG, B. Glia maturation factor modulates β -amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. **Brain Res** 1208: 192-203, 2008.

ZHU, X.; LEE, H.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. **Biochim Biophys Acta** 4: 494-502, 2007.

ZIGMAN, W.B.; SCHUPF, N.; JENKINS, E.C.; URV, T.K.; TYCKO, B.; SILVERMAN, W. Cholesterol level, statin use and Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. **Neurosci Lett** 416(3): 279-284, 2007.

8. ANEXO

8.1 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hiperfosforilação da *tau* e formação dos emaranhados neurofibrilares4

Figura 2. Processamento não amiloidogênico e amiloidogênico da APP6

8.2 Normas do Periódico *Neurochemistry International* , no qual o artigo científico será submetido

Neurochemistry International

Guide for Authors

I. General

Neurochemistry International is devoted to the rapid publication of outstanding original articles and timely reviews in neurochemistry. Manuscripts on a broad range of topics will be considered, including molecular and cellular neurochemistry, neuropharmacology and genetic aspects of CNS function, neuroimmunology, metabolism as well as the neurochemistry of neurological and psychiatric disorders of the CNS.

1. Types of communication

(a) *Papers reporting original research* are considered for publication provided that they describe significant, new and carefully confirmed findings and that adequate experimental details are given. All papers must be prepared according to the instructions given in Section III.

(b) *Rapid Communications* are those reporting original research and which are considered of such importance that **publication is necessary within the shortest possible time**. These papers should be between 1000 and 4000 words in length, and will be published within 10 weeks of *acceptance*. When submitting a manuscript for publication as a rapid communication, authors should include a brief statement justifying the reason for its inclusion in the rapid publication section of the journal.

(c) *Reviews* on a specific topic of neurochemistry written at the invitation of the Editors-in-Chief or submitted directly by any author will be considered. These need not only be exhaustive reviews, but can also be shorter articles intended either to draw attention to developments in a specific field for workers in other scientific disciplines, or to bring together observations over a wide area which seem to point in a new direction, to give the author's personal views on a controversial topic, or to direct soundly based criticism at some widely held dogma or widely used technique in neuroscience. Authors should always endeavour to make their reviews understandable to neuroscientists of other disciplines.

2. Submission.

To help ensure that papers are reviewed by the most suitable referees, authors can use their covering letter to provide a list of up to five candidate referees (including names, addresses, fax and e-mail) who do not have conflict of interest in the research being submitted. The Editors reserve the right to choose different referees from the ones suggested.

3. *Refereeing*. Every manuscript received by the Editors-in-Chief will be refereed by at least two specialists (who may or may not be members of the Editorial Advisory Board). The final decision on the acceptance of a manuscript will lie with the Editors-in-Chief and/or the Associate Editors, who will act on the advice of the referees.

4. *Submission of manuscripts to Neurochemistry International* will be held to imply that they represent original research not previously published (except in the form of an abstract or preliminary report) and that they are not being considered for publication elsewhere in similar form, in any language, without the consent of the publishers.

5. Authors are encouraged to submit a computer disk containing the **final** version of the papers

along with the **final** manuscript to the office of the appropriate Editor-in-Chief. Please observe the following criteria:

- (a) Send only hard copy (i.e. no disk) when first submitting your paper.
- (b) When your paper has been refereed, revised if necessary and accepted, send a disk containing the **final** version with the **final** hard copy. **Make sure that the disk and the hard copy match exactly.**
- (c) Specify what software was used, including which release, e.g. WordPerfect 5.1.
- (d) Specify what computer was used (either IBM-compatible PC or Apple Macintosh).
- (e) Include the text file and separate table and illustration files, if available.
- (f) The file should follow the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of this journal as given in the Instructions to Authors.
- (g) The file should be one and a half or double spaced and should use the wrap-around end of line feature, i.e. no returns at the end of each line. All textual elements should begin flush left; no paragraph indents. Place two returns after every element such as title, headings, paragraphs, figure and table call-outs.
- (h) Keep a back-up disk for reference and safety.

6. Offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with a pdf offprint. Should they wish, they may opt to receive 25 paper offprints instead.

7. Proofs Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multi-authored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon, EX1 2AH, UK.

II. Experimental Procedures

All experiments on human subjects should be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Manuscripts must be accompanied by a statement that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1978).

Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to *in vivo* techniques, if available.

Authors are advised to consult "A fair press for animals" [*New Scientist* (1992) **1816**: 18-30] before preparing their manuscript.

The Editors-in-Chief reserve the right to reject papers if there is doubt whether suitable procedures have been used.

III. Manuscript requirements

1. Form

- (a) Manuscripts should be typewritten with one and a half or double spacing throughout and with

margins at least 2.5 cm wide. If possible, A4 size (210 x 297 mm) paper should be used. Four copies of each manuscript should be submitted to facilitate reviewing by referees. It is only necessary to send photocopies of diagrams, or rough prints of halftones, with the third and fourth copies.

(b) Each manuscript must have a title page which includes only the title, the authors' names, the laboratory or origin, the name and address of the person to whom proofs should be mailed, **including a Fax number and e-mail address where possible**, and any necessary footnotes.

The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided. Original manuscripts and diagrams are discarded 1 month after publication unless the Publisher is requested to return original material to the author. Corrections to the proof should be restricted to printer's errors. Substantial alterations may be charged to the author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections to any articles cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.

(c) The title should be as short as is consistent with clarity. Papers should not be numbered in series, but sub-titles are accepted.

(d) A running title, not to exceed 56 letters and spaces, should be included on a separate sheet.

(e) Pages should be numbered in succession, the title page being page 1.

(f) Tables and figures should be on separate pages placed at the end of the manuscript. Their desired approximate locations should be indicated in the margin of the text.

(g) Footnotes to the text should be used sparingly; where they must be used their locations should be indicated by superscript numbers, and they should be typed with corresponding numbers on a separate sheet. In Tables, reference to footnotes should be made by the symbols *, †, ‡, §, ||, ¶ in that order.

(h) Greek characters should be clearly identified.

(i) Isotopic specifications should conform to the IUPAC system [*Biochem. J.* (1975) **145**, 1-20].

(j) *Drug names should be the official or approved names*: trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. nM or μ M, or as unit weight/volume solution, stating whether the weight refers to the salt or the active component of the drug. The molecular weight, inclusive of water of crystallization, should be stated if doses are given as unit weight.

(k) The IUB Enzyme Commission (EC) number must be quoted with the full name of the enzyme when it is first mentioned in the text. Subsequently the accepted trivial name should be used, e.g. *Full name*: Acetyl-CoA: choline O-acetyl transferase (EC 2.3.1.6.) *Trivial name*: Choline acetyltransferase not choline acetylase. For this information the author should refer to *Enzyme Nomenclature* (1973), Elsevier, Amsterdam and the supplement in *Biochim. Biophys. Acta* (1976) **429**, 1-45.

2. Style

(a) Manuscripts should be concisely written in English in a readily understandable style. Technical jargon, 'laboratory slang' or words not defined in dictionaries should not be used. Abbreviations should be avoided unless they conform to the instructions under sub-section 6. They must not be used as a short form for experimental procedures or for concepts.

(b) Redundant words, phrases, and sentences should not be used. For example, the captions of Tables and Figures, with or without paraphrasing, should not be repeated in the text. The Editors reserve the right to revise the wording of manuscripts accepted for publication in *Neurochemistry International*.

Authors should familiarize themselves with the format and style of recently published papers.

3. Organization

- (a) Each paper must begin with a brief *Abstract*. It should not exceed 300 words. The first paragraph of the abstract should summarize the results obtained, the final paragraph should summarize the major conclusions in such a way that a reader not familiar with the techniques used can see any implications for his area of neuroscience. Abbreviations must not be used in the Abstract.
- (b) The remaining text of all papers, however short, should be organized in the following four main sections:
- (i) An *introductory statement* should first 'set the scene' for a non-specialist and then continue with the specific reasons for undertaking the investigation. Exhaustive reviews of the literature should be avoided and no attempt should be made to indicate the results obtained. The heading 'Introduction' should be omitted.
- (ii) *Experimental procedures*. Procedures used should be given in sufficient detail to permit the repetition of the work by others. However, published procedures should only be briefly summarized and only described in detail if they have been substantially modified. Special chemicals, drugs, etc. with their sources of supply should be grouped under a separate subheading *Materials*.
- (iii) *Results*. In this section findings should be described without discussion of their significance. Sub-sections should be used in order to clarify the expression of the results.
- (iv) *Discussion*. In this section the authors' interpretations of their findings should be accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work. Repetition of material given under 'Results' should be avoided. *Sub-sections should be used wherever possible* and sub-sections dealing with technical or highly specialized matter should be clearly separated from the rest of the text so that they can be printed in small type.

4. Presentation of data in tables or figures

- (a) In general, tables and figures should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text.
- (b) Each figure must be accompanied by a caption and explanatory legend typed on a separate sheet.
- (c) Care should be taken to present data in a precise manner. For example, histograms should not be used when the data can equally well be given in a Table.
- (d) *Figures*:
- (i) Each figure must have its number, the authors' names and '*Neurochemistry International*' written lightly on the reverse side.
- (ii) Line drawings should be on white card or paper. Where possible, illustrations should be submitted in a form *suitable for direct reproduction*. Delay in publication is inevitable if figures require redrawing. Line drawings should normally be about twice the final size; in no case should the dimensions exceed 20 x 30 cm.
- (iii) Symbols on graphs, etc. should be inserted by the author using the following standard characters:
 $\wedge \bullet \sim \square \square X +$

5. References

- (a) In the text, references should be quoted by giving author's name, followed by the year of publication in parentheses. For more than two authors, the name of the first author is given followed by the words 'et al.'
- (b) The reference list should be typed separately at the end of the manuscript in alphabetical order and arranged as follows: author's name and initials, year, title of the article, full journal title, volume, *first* and *last* page numbers.
- For example:
 Betz, H., Becker, C.-M., 1988. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochemistry International* 13, 137-146.
- References to books should include the author's name and initials, year, title of book, volume,

page numbers, publisher and place of publication. Where relevant, the title of a paper within a book, and the editor's names, should be given.

For example:

Baker, P. F., 1972. The sodium pump in animal tissues and its role in the control of cellular metabolism and function. In: Hopkin, L. E. (Ed.) *Metabolic Pathways*. Vol. 6, Academic Press, New York, pp. 243-268.

(c) *Unpublished experiments may be mentioned only in the text; they must not be included in the list of References*; initials as well as surnames must be given for authors whose unpublished experiments are quoted.

(d) A paper which has been accepted for publication but which has not appeared may be cited in the References with the abbreviated name of the Journal followed by the words 'In press'. The date of acceptance of each such paper should be indicated when the manuscript is submitted to *Neurochemistry International*.

(e) Personal communications may only be used when written authorization from the communicator is submitted with the original manuscript: they may only be mentioned in the text.

6. Abbreviations

(a) Symbols for physical units should be restricted to the *Système Internationale (S.I.)* Units. Examples of commonly used symbols can be found in *Biochem J.* (1975) **145**, 1-20 and more detailed description, in *Quantities, Units and Symbols* (1971) The Royal Society, London.

(b) *The excessive use of abbreviations in the text is strongly discouraged*. In particular, awkward and unfamiliar abbreviations and those intended to express concepts or experimental techniques will not be permitted. In order to aid communication between scientists of different disciplines, authors should only use abbreviations sparingly and should always define the abbreviation when first used by placing it in parentheses after the full term, e.g. Acetylcholinesterase (AChE).

7. Chemical and biochemical nomenclature

As far as possible authors should follow the conventions used in *The Biochemical Journal*. See *Biochem J.* (1975) **145**, 1-20.