

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CITOTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS A β 1-42 E A β 25-35 EM CULTURA
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS

Rudimar Luiz Frozza

Orientadora: Dra. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao curso 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, fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CITOTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS A β 1-42 E A β 25-35 EM CULTURA
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS

Rudimar Luiz Frozza

Orientadora: Dra. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao curso 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, fevereiro de 2008

Aos meus pais,
meus irmãos
e à Andressa.

Assim como o ferro, sem exercício, se oxida, assim como a água se putrefaz, e no frio gela, assim também a mente humana, não exercitada, se arruína.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

À Christianne, pela excelente orientação e pela confiança. Por sua dedicação, pelo respeito aos seus alunos e pelo exemplo de ética. Pela liberdade que sempre me ofereceu e pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório Ale Bruno (Gabiru), Ana Paula, Bianca, Cristiane, Daniéli, Fabrício, Guilherme, Juliana, Lauren, Mariana, Patrícia, Ricardo e Thaline pela ajuda, amizade e pelo trabalho em equipe. Em especial à Ana Paula e à Juliana, por todas as discussões e trocas de idéias.

Ao pessoal do laboratório 22, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

À Alessandra pelo excelente trabalho com o material da cultura.

Ao Departamento de Bioquímica, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, por ter proporcionado os recursos financeiros necessários para que esta dissertação se fizesse.

Aos meus pais, pelo exemplo de caráter, por me apoiarem e não terem medido esforços para que eu estudasse e por aceitarem minha ausência por mais de dez anos.

Aos meus irmãos, pelo apoio, pelo carinho e por abdicarem de muitas coisas por mim.

À Andressa, por quem serei eternamente apaixonado, por toda ajuda, compreensão, apoio e incentivo. Pelo companheirismo e pela felicidade de viver cada dia ao seu lado!

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a mais comum desordem neurodegenerativa relacionada à idade. Os sintomas clínicos resultam da deterioração de determinadas regiões cognitivas, particularmente aquelas relacionadas à memória. Estima-se que 29 milhões de pessoas no mundo sofram de demência do tipo DA. A presença de emaranhados neurofibrilares (NFTs) intracelulares constituídos pela proteína *tau* hiperfosforilada e as placas extracelulares constituídas pela proteína beta-amilóide (A β) são características da DA. Existe uma ampla variedade de evidências genéticas, fisiológicas e bioquímicas que suportam a idéia que o peptídeo A β é ao menos uma das causas que originam a DA. Em diferentes modelos experimentais têm sido utilizados diversos peptídeos A β sintéticos para estudar os mecanismos de toxicidade envolvidos na DA. Entre os fragmentos do peptídeo A β utilizados, o peptídeo A β 25-35 é considerado o mais curto fragmento tóxico exercendo efeitos neurotóxicos similares àqueles produzidos pelos peptídeos A β 1-40 ou A β 1-42, tais como danos no aprendizado e na memória, apoptose neuronal, disfunção colinérgica e estresse oxidativo. Este fragmento exibe significantes níveis de agregação molecular, mantendo a toxicidade observada pelo peptídeo A β 1-42 e dessa forma representa a região biologicamente ativa do peptídeo encontrado em pacientes com DA. Assim, o peptídeo A β 25-35 é rotineiramente usado para estabelecer modelos de DA, para estudar as propriedades neurotóxicas do peptídeo A β e para a triagem de fármacos neuroprotetores. Neste trabalho, nós procuramos estabelecer uma comparação entre os dois peptídeos A β comumente usados, A β 1-42 e A β 25-35 num modelo *in vitro* de toxicidade pelo peptídeo A β . Para esse propósito foram utilizadas culturas organotípicas de hipocampo de rato expostas a 25 μ M do peptídeo A β 1-42 ou a 25 μ M do peptídeo A β 25-35 durante 48h. A morte celular foi quantificada pela medida da captação do iodeto de propídeo (IP), um marcador de morte celular. Nós observamos que ambos os peptídeos A β apresentaram toxicidade similar, causando cerca de 39% de dano celular no hipocampo. Não houve diferença significativa na extensão da morte celular entre os peptídeos A β 1-42 e A β 25-35, indicando que ambos causaram um efeito tóxico similar. Além disso, nós avaliamos a ativação de caspase 3, uma proteína executora chave na apoptose, por *Western blotting*. A exposição a 25 μ M dos peptídeos A β 1-42 ou A β 25-35 por 48h aumentou significativamente a quantidade de caspase 3 clivada quando comparado às fatias controles não expostas aos peptídeos. Além disso, não houve diferenças entre os níveis de caspase 3 clivada induzida pelos peptídeos A β 1-42 e A β 25-35. Nós também não observamos efeito de ambos os peptídeos na fosforilação das proteínas PTEN e Akt; porém, de modo contrário, a percentagem de fosforilação da proteína GSK-3 β foi aumentada por ambos os peptídeos A β . Neste trabalho, nós também avaliamos o efeito do tratamento prévio das culturas com 25 μ M de resveratrol. O tratamento das culturas por 72h com resveratrol antes da exposição ao peptídeo A β 25-35 parece exercer efeito neuroprotetor. Embora mais estudos sejam necessários para entender os mecanismos da toxicidade do peptídeo A β , nossos resultados fornecem fortes evidências de que o peptídeo A β 1-42 e o fragmento sintético A β 25-35 induzem dano celular de maneira semelhante.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disorder. The clinical symptoms result from deterioration of selective cognitive domains, particularly those related to memory. It is estimated that 29 million people worldwide suffer from dementia like AD. The presence of intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) of the hyperphosphorylated protein *tau* and extracellular amyloid-beta ($A\beta$) protein into plaques are the hallmarks of AD. There is a plethora of genetic, physiological and biochemical evidences that supports the idea that $A\beta$ is at least one of the originating causes of the AD. Several synthetic $A\beta$ peptides have been used to study the mechanisms of toxicity involved in AD. Among the $A\beta$ fragments studied so far, the $A\beta_{25-35}$ peptide is considered the shorter toxic fragment exerting neurotoxic effects similar to those produced by $A\beta_{1-40}$ or $A\beta_{1-42}$ peptides, such as learning and memory impaired, neuronal apoptosis, cholinergic dysfunction, and oxidative stress. Therefore, this peptide exhibits significant levels of molecular aggregation, retaining the toxicity of the full-length peptide and representing the biologically active region of $A\beta_{1-42}$ peptide. Thus $A\beta_{25-35}$ peptide is commonly used to establish the AD model for the study of the neurotoxic properties of $A\beta$ peptide and drug screening. In this work, we sought to establish the comparison between two commonly used $A\beta$ peptides $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{25-35}$ on an *in vitro* model of $A\beta$ toxicity. For this purpose, we used organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to 25 μ M of both $A\beta$ peptides for 48h. Cell death was quantified by measuring propidium iodide (PI) uptake, a marker of necrotic dead cell. We observed that both $A\beta$ peptides caused about 39% of cell damage in hippocampus. There were no significant cell death differences between $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{25-35}$ peptides, indicating that both caused the similar toxic effect. Moreover, we evaluated the caspase-3 activation, a key executor in apoptosis, by Western blotting. The exposure to 25 μ M of $A\beta_{1-42}$ or $A\beta_{25-35}$ peptides for 48h significantly increased the amount of cleaved-caspase-3 when compared to control slice cultures not exposed to peptides. Besides, there were no statistical differences between cleaved-caspase-3 induced by $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{25-35}$ peptides. In addition, we did not observe any effect of both peptides on PTEN and Akt phosphorylation; otherwise the phosphorylation of GSK-3 β was increased by both $A\beta$ peptides. In this work, we also evaluated the effects of treatment with 25 μ M of resveratrol on cell death induced by 25 μ M of $A\beta_{25-35}$ peptide. The treatment of cultures for 72h with resveratrol before the $A\beta_{25-35}$ peptide exposure seems to exert neuroprotective effects. Although further studies are necessary for understanding the mechanisms underlying $A\beta$ peptide toxicity, our results provide strong evidence that $A\beta_{1-42}$ and the synthetic fragment $A\beta_{25-35}$ peptides induce neuronal injury in a similar pattern.

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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

ADAM – família de desintegrinas e metaloproteases (*Disintegrin and metalloprotease family*)

AICD – domínio APP intracelular (*APP intracellular domain*)

α 7nAChR – receptor nicotínico da acetilcolina 7α (*α 7 nicotinic acetylcholine receptor*)

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

APH-1 – *Anterior Pharynx defective*

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

APP_{Swe} – mutação Suíça da APP (*Swedish mutation*)

APP_{Arc} – mutação Ártica da APP (*Arctic mutation*)

Apo E – apolipoproteína E

sAPP α - forma secretada da APP α

sAPP β – forma secretada da APP β

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

C83 – fragmento de 83 aminoácidos

C99 – fragmento de 99 aminoácidos

COX – ciclooxigenase (*cyclooxygenase*)

COX-1 – ciclooxigenase-1 (*cyclooxygenase-1*)

COX-2 – ciclooxigenase-2 (*cyclooxygenase-2*)

DA – Doença de Alzheimer

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – Doença de Parkinson

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

FAD – Doença de Alzheimer Familiar (*Familial Alzheimer's Disease*)

GM1 - monosialotetrahexosilgangliosídeo (*monosialotetrahexosylganglioside*)

(gangliosídeo com um resíduo Ácido-N-acetilneuramínico - Neu5Ac)

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

IDE – enzima que degrada a insulina (*Insulin-Degrading Enzyme*)

IL – interleucina (*interleukin*)

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

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

IP – iodeto de propídeo (*Propidium iodide*)

JNK – Proteína cinase de C-Jun n-terminal (*Jun n-terminal kinase*)

LRP – proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor*)

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

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

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

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

NMDA – receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato

NO – óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

PEN-2 – intensificador de presenilina 2 (*Presenilin Enhancer 2*)

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

PKA – proteína cinase A (*Protein Kinase A*)

PKB – proteína cinase B (*Protein Kinase B*)

PKC – proteína cinase C (*Protein Kinase C*)

PS – presenilina (*Presenilin*)

PTEN – homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossoma 10 (*Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10*)

RAGE – receptor para produtos finais de glicação avançada (*Receptor for Advanced Glycation End Products*)

SIRT1 – sirtuina 1 (histona deacetilase classe III) (*NAD-dependent class III histone deacetylase*)

SNC – sistema nervoso central

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Alzheimer	1
1.1.2 Fatores Genéticos	3
1.1.3 Aspectos fisiopatológicos e moleculares da Doença de Alzheimer	4
1.2. Modelos experimentais da Doença de Alzheimer	11
1.2.1 Animais transgênicos	12
1.2.2 Injeção intracerebral de peptídeos β amilóides sintéticos	12
1.2.3 Cultivo celular	13
1.2.4 Cultivo de tecidos cerebrais.....	14
1.3. Resveratrol e a Doença de Alzheimer.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Materiais.....	19
3.2. Modelo de lesão induzida pelo peptídeo $A\beta$	19
3.3. Análise Estatística	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Artigo Científico submetido ao periódico <i>Journal of Neuroscience Methods</i>	23
<i>A comparative study of beta-amyloid peptides $A\beta$1-42 and $A\beta$25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures</i>	23

4.2. Efeito do resveratrol sobre a lesão induzida pelo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de rato	54
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	66
7. PERSPECTIVAS.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9. ANEXOS	96
Normas do Periódico <i>Journal of Neuroscience Methods</i>, onde o artigo científico foi submetido	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

O espantoso aumento da expectativa de vida durante o século 20, de aproximadamente 49 anos para mais de 70 anos, têm resultado em um crescente número de indivíduos que alcançam a idade em que as doenças neurodegenerativas tornam-se comuns (SELKOE, 2001). Estas doenças caracterizam-se pela degeneração de sinapses e morte de certas populações de neurônios com conseqüente demência ou déficits nos movimentos (HAASS and KAHLE, 2000). Entre estas desordens, a Doença de Alzheimer (DA) tem emergido como uma das mais prevalentes formas de demência em humanos. A DA é uma demência com alta incidência, distinta da demência associada ao acidente vascular cerebral, e sua prevalência aumenta acentuadamente com o avanço da idade (AISEN and DAVIS, 1997).

Aproximadamente 10% da população acima dos 65 anos e 48% com mais de 85 anos de idade são afetados pela DA (HAMDANE et al., 2003). Atualmente, estima-se que, mundialmente, 29 milhões de pessoas sofram de demência (SCHWAN et al., 2007; WIMO et al., 2007). Sob o ponto de vista da saúde pública, as demências constituem um dos grandes desafios atuais e futuros. Isso se deve à sua elevada freqüência e à enorme repercussão econômica que provocam, transformando-se na terceira enfermidade de maior custo, depois das doenças cardiovasculares e do câncer (DARTIGUES et al., 2002; LEIFER, 2003). Estima-se que mundialmente US\$ 210 bilhões foram gastos diretamente com cuidados à demência em 2005 (WIMO et al., 2007) e têm-se questionado se será possível tratar e cuidar do crescente número de pessoas com demência (LOVESTONE, 2002). Em

função do envelhecimento da população, o número de portadores da DA aumentará dramaticamente, sendo que 2/3 destes portadores serão de países em desenvolvimento (<http://www.alzheimermed.com.br>). No Brasil, espera-se que em 2025 o número de pessoas com 60 anos ou mais atinja 31,8 milhões. Dessa forma, estima-se que o número de pacientes que desenvolverão a DA seja em torno de um milhão e 200 mil.

A idade de início das manifestações clínicas características desta demência é mais precoce e sua progressão mais acelerada em pacientes com história familiar desse transtorno (MATTSON and CHAN, 2003). Caracterizada pela perda de memória, mudanças comportamentais, déficits de julgamento e fluência verbal, que aumentam em frequência e severidade com a evolução da doença, acompanhada pela progressiva perda da habilidade em realizar atividades cotidianas simples, a DA tem um grande impacto no ambiente familiar, devido à necessidade de cuidados contínuos ao paciente (CITRON, 2002; RODRIGUEZ et al., 2003; BLESA, 2004). Os sintomas psicóticos são crônicos e estão associados à longa duração da doença e à rápida progressão do seu curso clínico (PAULSEN et al., 2000). Desordens na linguagem em pessoas com DA são frequentes e incluem dificuldades de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras, podendo levar à afasia. Desorganização no controle motor (apraxia) também pode ser percebida, além do não conhecimento de objetos e/ou familiares (agnosia) (HELMES and OSTBYE, 2000).

A maioria dos casos de DA são esporádicos, onde o maior fator de risco é o envelhecimento. Raros são os casos de DA ocasionados por mutações genéticas, nas quais o início da doença ocorre a partir dos 30 anos de idade (MATTSON, 2004).

1.1.2. Fatores Genéticos

A DA é caracterizada pela presença de duas alterações moleculares características: os depósitos extracelulares do peptídeo A β , denominados placas neuríticas ou placas senis, constituídas por agregados de um fragmento de 38 a 43 aminoácidos gerados pelo processamento proteolítico da proteína precursora amilóide (APP – *Amyloid Precursor Protein*); e os emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos pela proteína *tau* (τ) hiperfosforilada (KANG et al., 1987; ARRIGADA et al., 1992; HAMDAME et al., 2003; SELKOE, 2004).

A patologia da DA constitui um quadro complexo envolvendo a combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. Estudos genéticos demonstram que mutações nas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e na APP, localizadas nos cromossomos 14, 1 e 21 respectivamente, estão associadas a forma familiar da DA de início precoce (FAD – *Familial Alzheimer's Disease*) (PUGLIELLI et al., 2003; KOO and KOPAN, 2004; PARIHAR and HEMNANI, 2004). As presenilinas são proteínas localizadas na membrana celular com sítio ativo voltado para o espaço transmembrana, presentes também em membranas de organelas como na membrana mitocondrial interna, no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. As presenilinas possuem diversos substratos, os quais devem primeiramente sofrer processamento proteolítico para perder seu ectodomínio para subseqüentemente serem clivados no espaço transmembrana, o que pode explicar porque mutações nessas proteínas podem levar ao desenvolvimento da DA (SELKOE, 2004). A APP é uma glicoproteína transmembrana expressa por células neurais e não-neurais que se localiza na membrana citoplasmática e postula-se que possua funções na adesão e nos movimentos celulares (SABO et al., 2001). Além disso, a APP, assim como as presenilinas, também pode estar localizada nas membranas do complexo de Golgi,

retículo endoplasmático e da mitocôndria (LAFERLA et al., 2007) e alterações nessa proteína ou no seu processamento podem ter como consequência a produção do peptídeo A β e o surgimento da DA.

Outro fator de risco para o desenvolvimento da DA, o qual pode afetar possivelmente a deposição do peptídeo A β e a formação dos emaranhados neurofibrilares, é o gene da apolipoproteína E (ApoE), localizado no cromossomo 19 (BOSSY-WETZEL et al., 2004; KOO and KOPAN, 2004; PARIHAR and HEMNANI, 2004). Há três isoformas conhecidas de ApoE codificadas por genes ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4. O alelo ϵ 4 do gene da ApoE aumenta o risco para a DA. A principal hipótese do envolvimento da ApoE é a formação de um complexo ApoE/A β promovendo a retirada do peptídeo A β via proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade – 1 (LRP-1). Entretanto, a ApoE ϵ 4 liga-se fracamente ao peptídeo A β (quando comparado à ApoE ϵ 2 ou ϵ 3), reduzindo a capacidade de remoção do peptídeo A β e promovendo, dessa maneira, a acumulação e a formação das placas senis (MARTINS et al., 2006).

A associação dessas alterações gera diversas respostas moleculares e celulares levando às principais alterações encontradas no tecido cerebral de indivíduos portadores da DA.

1.1.3. Aspectos fisiopatológicos e moleculares da Doença de Alzheimer

A DA foi primeiramente descrita pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1906, quando examinou o cérebro de uma paciente de 50 anos de idade vítima de uma doença mental incomum (ALZHEIMER, 1907). Alois Alzheimer observou que o tecido cerebral desta paciente apresentava alterações como perda de células em áreas do cérebro que são essenciais para a memória e outras habilidades mentais.

Entre as alterações histopatológicas encontradas por Alois Alzheimer destacam-se os emaranhados neurofibrilares e as placas senis (amilóides) como apresentados na Figura 1.

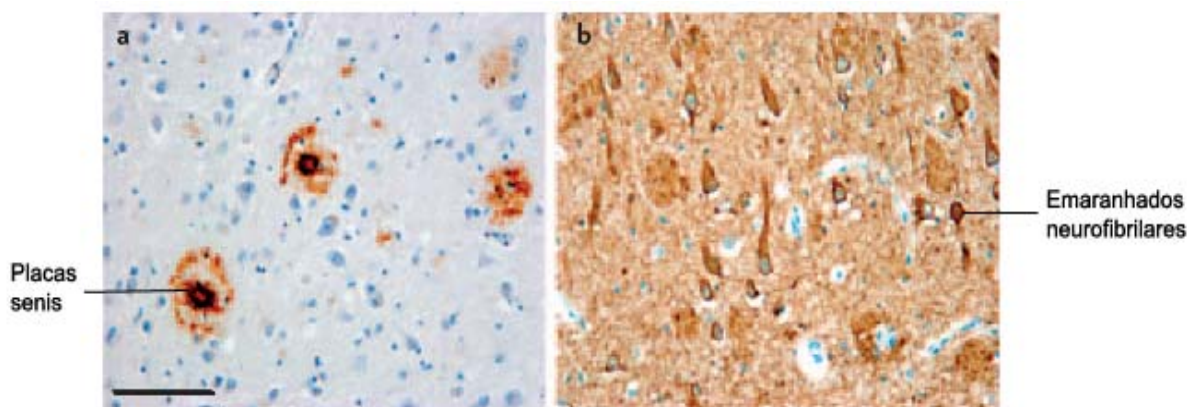


Figura 1. Alterações morfológicas características da DA. **a.** Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do peptídeo A β cercados por neuritos distróficos, astrócitos reativos e pela microglia. **b.** Emaranhados neurofibrilares constituídos por agregados intracelulares compostos pela forma hiperfosforilada da proteína *tau*. Escala 100 μ m (adaptada de HAASS and SELKOE, 2007).

Os emaranhados neurofibrilares são formados pela deposição da proteína *tau* (τ), uma fosfoproteína constituinte da família das proteínas associadas a microtúbulos (*Microtubule Associated Proteins family* – MAPs) e apresenta múltiplos sítios de fosforilação (MANDELKOW et al., 2003; FORMAN et al., 2004; GONG et al., 2006). A proteína *tau* é altamente expressa no cérebro, principalmente em neurônios (PARIHAR and HEMNANI, 2004). Sua principal função é manter os monômeros de tubulina unidos, estabilizando os microtúbulos que modulam a organização funcional do neurônio, importante para a manutenção da sua forma estrutural, influenciando desse modo o transporte neuronal (HAMDANE et al., 2003; FORMAN et al., 2004). Na doença de Alzheimer, a proteína *tau* hiperfosforilada desprende-se dos microtúbulos, acumulando-se no soma e desestruturando o citoesqueleto neuronal (PHIEL et al., 2003).

O peptídeo A β é produzido por endoproteólise a partir da APP através da clivagem seqüencial por complexos enzimáticos denominados α -, β - e γ -secretases (HAASS et al., 1992; SHOJI et al., 1992; SELKOE, 1996) (Figura 2). A APP é amplamente expressa por todos os tipos celulares e em diferentes isoformas, alcançando um tamanho de 695 a 770 aminoácidos. A APP constituída de 695 (APP695) é a isoforma mais abundante no SNC e produzida principalmente por neurônios (MATTSON, 2004).

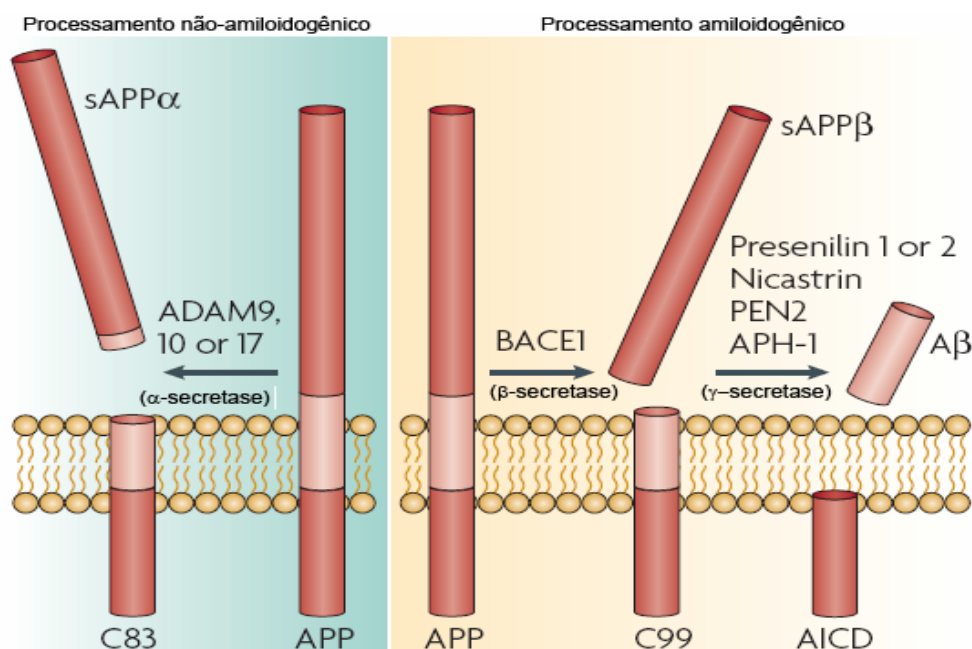


Figura 2. Processamento proteolítico da APP. O processamento não-amiloidogênico mediado pela α -secretase ocorre dentro do domínio A β prevenindo, dessa maneira, a geração e a liberação do peptídeo A β . O processamento amiloidogênico mediado β -secretase, seguido pela γ -secretase, gera o peptídeo A β (adaptado de LAFERLA et al., 2007).

No processamento não amiloidogênico a clivagem da APP ocorre na região central do domínio do peptídeo A β (entre os resíduos 10 e 17) pela α -secretase, liberando uma forma secretada da APP α (sAPP α) da superfície celular e deixando um fragmento de 83 aminoácidos (C83) que é clivado pelo complexo γ -secretase (constituído por PS1, nicastrina, APH-1 e PEN-2), gerando um pequeno fragmento

hidrofóbico conhecido como p3, com funções ainda não compreendidas (HAASS et al., 1992; KIMBERLY et al., 2003; MATTSON, 2004; SELKOE, 2004). Diversas atividades biológicas *in vitro* têm sido descritas para a sAPP α , desde fator trófico ou neuroprotetor até inibidor de serina proteases e molécula de adesão. Além disso, o processamento seqüencial por α - e γ -secretases também libera um domínio APP intracelular (AICD), que pode se ligar à proteína adaptadora citoplasmática Fe65 e mediar sinalização nuclear (CAO and SUDHOF, 2001; KIMBERLY et al, 2001).

O processamento amiloidogênico envolve a clivagem seqüencial da APP pela β -secretase ou BACE-1 (*β -site of beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), enzima expressa quase que exclusivamente no SNC particularmente em neurônios, e pelo complexo γ -secretase (MATTSON, 2004; SELKOE, 2004). Nesse processo, a BACE-1 cliva a APP no aminoácido 99 da região C-terminal, liberando a forma β -secretada da APP (sAPP β) no espaço extracelular, deixando um fragmento de 99 aminoácidos (C99) preso a membrana citoplasmática. A subsequente clivagem do C99, entre os resíduos 38 e 43, pelo complexo γ -secretase libera o peptídeo A β (SELKOE, 2004, LAFERLA et al., 2007). A maior quantidade de peptídeo A β produzido possui 40 aminoácidos (A β 1-40), enquanto uma pequena porção, aproximadamente 10%, contém 42 aminoácidos (A β 1-42). O peptídeo A β 1-42 é a forma mais hidrofóbica e mais propensa à formação de fibrilas, além de ser a isoforma predominante encontrada nas placas senis (JARRETT et al., 1993; MATTSOM, 1997; YOUNKIN, 1998; SELKOE, 2001).

O peptídeo A β pode existir em múltiplos estados – monômeros, oligômeros, protofibrilas e fibrilas. A propriedade de ser produzido na forma monomérica e possuir capacidade de formar fibrilas e outros estados intermediários é uma característica exclusiva que define a fisiopatologia da DA (KLEIN et al., 2001;

LAFERLA et al., 2007). No seu estado monomérico, o peptídeo A β parece não ser neurotóxico, entretanto, espécies oligoméricas e protofibrilares são consideradas potentes bloqueadores de potenciais de longa duração (LTP) (LAMBERT et al, 1998; LAFERLA et al., 2007). Ainda na forma monomérica, o peptídeo A β pode sofrer degradação proteolítica por ação de peptidases como a gelatinase A (YAMADA et al., 1995), gelatinase B (HOWELL et al., 1995), enzima que degrada insulina (IDE – *insulin-degradin enzyme*) (KUROCHKIN and GOTO, 1994; CARRO and TORRES-ALEMAN, 2004), neprilisina (HOWELL et al., 1995) entre outras. Entre estas peptidases, a neprilisina parece ser a maior responsável pela degradação do peptídeo A β no SNC (TAKAKI et al., 2000; IWATA et al., 2001). Entretanto, quando o peptídeo A β não sofre esta degradação ele pode ser oligomerizado, gerando o peptídeo A β oligômero, solúvel que se transforma em protofibrilas, ainda solúvel, e que por fim, forma fibrilas, insolúveis e que se agregam formando a placa neurítica ou senil (IWATA et al., 2005). A formação de fibrilas é um processo bastante complexo. O mecanismo que dirige este processo, particularmente no cérebro idoso, ainda não é conhecido, mas parece estar relacionado ao dobramento protéico. A oligomerização do peptídeo A β também envolve as interações com a bicamada lipídica, em particular com microdomínios conhecidos como *rafts* de lipídios ricos em colesterol e glicosfingolipídios (KAWARABAYASHI et al, 2004; KIM et al., 2006). Como lipídios de membrana podem modular ambos, a dinâmica de dobramento e a velocidade de agregação protéica, diferentes composições lipídicas em membranas de diferentes compartimentos subcelulares podem influenciar a agregação do peptídeo A β . Estudos recentes apontam que a oligomerização do peptídeo A β é acelerada através da interação deste com agrupamentos (*clusters*) de monosialogangliosídios em *rafts* de lipídios, resultando na geração de peptídeo A β

ligado ao gangliosídeo GM1, o qual pode então atuar como um agente de nucleação para facilitar a agregação do peptídeo A β (WAKABAYASHI et al., 2005; MATSUAZAKI et al., 2007).

Os mecanismos da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo A β permanecem incertos. Até recentemente acreditava-se que o peptídeo A β induzia toxicidade somente quando na forma fibrilar, de modo que ratos transgênicos que apresentavam anormalidades comportamentais características do modelo animal de DA mesmo na ausência da deposição de placas senis não eram considerados bons modelos para o estudo da DA (KLEIN et al., 2001). Entretanto, foi observado que a perda sináptica, analisada pela imunorreatividade para sinaptofisina tanto em modelos animais quanto em análise *post mortem* do cérebro de pacientes, correlacionava-se diretamente com os altos níveis de pequenas formas oligoméricas solúveis do peptídeo A β (HSIA et al., 1999; LUE et al., 1999). Além disso, os depósitos do peptídeo A β na forma de placas freqüentemente localizam-se distantes dos sítios de perda neuronal (KLEIN et al., 2001), sugerindo que formas oligoméricas solúveis do peptídeo A β difundem-se pelo parênquima cerebral modulando diversas funções cerebrais antes da sua autoagregação e deposição.

O peptídeo A β no espaço extracelular pode se ligar a uma variedade de biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e proteoglicanos. A ligação do peptídeo A β a receptores de membrana como receptor nicotínico da acetilcolina 7 α (α 7nAChR), ao receptor glutamatérgico N-Metil-D-Aspartato (NMDA), à proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) e aos receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGEs) desencadeia uma cascata de eventos celulares modulando diversas vias de sinalização levando a um dano celular com marcante resposta inflamatória (YAN et al., 1996; WANG et al., 2000; SNYDER

et al., 2005; BU et al., 2006;). Entre as diversas vias de sinalização moduladas 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*) e Wnt (família de proteínas glicosiladas ricas em cisteína derivadas do gene *Wingless* de *Drosophila* e do gene *Int-1* de camundongo), além da ativação de caspases e da fosforilação da proteína *tau* (JORDAN et al., 1997; CAMANDOLA and MATTSON, 2000; DE FERRARI and INESTROSA, 2000; TROY et al., 2000; MATTSON and CAMANDOLA, 2001; CARICASOLE et al., 2003; RYDER et al., 2004; TONG et al., 2004; CHONG et al., 2006). O peptídeo A β pode, também, danificar neurônios, indiretamente, através da ativação da microglia e de astrócitos, os quais produzem mediadores tóxicos e inflamatórios, tais como óxido nítrico (NO), interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (KLEGERIS et al., 1994; GOODWIN et al., 1995; MEDA et al., 1995; MEDEIROS et al., 2007).

Resumidamente, as alterações bioquímicas e celulares que o peptídeo A β desencadeia no tecido nervoso são graduais. Iniciam com mudanças no metabolismo da APP com acúmulo acentuado do peptídeo A β , quer por um aumento na produção total do peptídeo A β , quer por um aumento na relação A β 1-42/A β 1-40 ou uma redução na degradação do peptídeo A β , levando a oligomerização do peptídeo A β 1-42 com seu conseqüente depósito. Os oligômeros do peptídeo A β 1-42 desencadeiam alterações na função sináptica e na sinalização celular. A progressão da doença ocorre gerando respostas inflamatórias, pela ativação microglial e astrocitária, e a formação das placas senis com conseqüente dano sináptico e neuronal progressivo, acompanhados por modificações na homeostasia neuronal e por injúria oxidativa. A oligomerização aberrante do peptídeo A β é acompanhada

pela hiperfosforilação da proteína *tau* e pela disfunção neuronal difusa. A perda celular é associada principalmente com déficits no sistema de neurotransmissão colinérgica gerando demência com placas e emaranhados.

Devido a essa complexidade dos mecanismos envolvidos na DA, apesar do grande avanço no entendimento da fisiopatologia da doença na última década, a terapia atual mostra-se limitada a benefícios sintomáticos, sem a capacidade de alterar o curso natural da doença. Por essa razão, torna-se urgente a necessidade de desenvolvimento de drogas que atuem nos múltiplos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DA.

1.2. Modelos experimentais de Doença de Alzheimer

Com o objetivo de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, diversos modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos. Além disso, devido ao alto custo desses modelos, diversos peptídeos A β sintéticos têm surgido como importantes ferramentas para o estudo da DA. A exposição de culturas primárias, de linhagens celulares e de cultura de tecido a fragmentos sintéticos do peptídeo A β leva à morte celular (YANKNER et al., 1990; LOO et al., 1993; ABE and SAITO, 2000; JANG and SURH, 2005 a, b; ISHIGE et al., 2007). Entre estes fragmentos, o peptídeo sintético de 11 aminoácidos (A β 25-35) representa o mais curto fragmento originado do peptídeo A β 1-42 (KUBO et al., 2002) exibindo significantes níveis de agregação, embora não possua o sítio para ligação de metais. Por essa razão, tem sido proposto que o peptídeo A β 25-35 representa a região biologicamente ativa do peptídeo A β 1-42 (IVERSEN et al., 1995; PIKE et al., 1995), exercendo toxicidade similar ao peptídeo A β 1-42, tais como danos no aprendizado e memória, apoptose neuronal, disfunção colinérgica e estresse

oxidativo (YANKNER et al., 1989; COTMAN and SU, 1996; GUNN-MORE and TAVARÉ, 1998; OLARIU et al., 2001; TOHDA et al., 2003). Assim, o peptídeo A β 25-35 tem sido rotineiramente utilizado para estabelecer modelos *in vitro* e *in vivo* de DA para estudar as propriedades neurotóxicas do peptídeo A β 1-42 e para o “*screening*” de drogas com potencial atividade terapêutica contra a DA (MISITI et al., 2005; KOSUGE et al., 2006; NASSIF et al., 2007).

1.2.1. Animais transgênicos

Os animais transgênicos empregados na pesquisa da DA são principalmente ratos e camundongos que apresentam mutações em três genes – APP, PS1 e PS2 – conhecidos por causar formas familiares da DA (FAD), as quais geralmente iniciam por volta dos 30 anos de idade. Uma mutação comumente empregada neste modelo é a mutação na APP conhecida com mutação Suiça (APP_{Swe}), a qual leva a um aumento da clivagem da APP pela β -secretase (HAASS et al., 1995). Outra mutação, conhecida como mutação Ártica (APP_{Arc}), aumenta a agregação do peptídeo A β levando ao início de uma forma agressiva da doença (NILSBERTH et al., 2001). Mutações nas presenilinas, tais como a mutação PS1M146V, aumentam os níveis do peptídeo A β 1-42 (GUO et al., 1999; JANKOWSKY et al., 2004). Aumento na expressão do gene da APP também resulta na DA (CABREJO et al., 2006; ROVELET-LECRUX et al., 2006). De maneira semelhante, na Síndrome de Down, onde ocorre trissomia do cromossomo 21 (gene que expressa a APP), também ocorre acumulação do peptídeo A β (GYURE et al., 2001; MORI et al., 2002).

1.2.2. Injeção intracerebral de peptídeos β amilóide sintéticos

A injeção intracerebral de peptídeos sintéticos tem sido utilizada como um modelo para o estudo de alterações comportamentais, eletrofisiológicas e morfológicas induzidos pelo peptídeo A β , além de um modelo para o teste de substâncias possivelmente terapêuticas. São administrados o peptídeo A β 1-40 (MINOGUE et al., 2003; PREDIGER et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007), A β 1-42 (BOYD-KIMBALL et al., 2005) e também fragmentos deste, como o peptídeo A β 25-35 (FREIR et al., 2003; HERVAS-AGUILAR et al., 2005; STEPANICHEV et al., 2006).

1.2.3. Cultivo celular

Os modelos de cultivo primário envolvem a exposição ao peptídeo A β de diversos tipos celulares, como neurônios corticais e cerebelares (MOVSESYAN et al., 2004; VAUDRY et al., 2004; INESTROSA et al., 2005; LEE et al., 2005; LIU and HONG, 2005; QUINTANILLA et al., 2005), astrócitos corticais (HU and VAN ELDIK , 1999; ABE et al., 2003; RODRIGUEZ-KERN et al., 2003; MONNERIE et al., 2005), microglia (NAKAI et al., 1999; WU et al., 2004; HASHIOKA et al., 2005) e oligodendrócitos (ZENG et al., 2005). Além dos diversos tipos celulares utilizados como modelo de DA, linhagens celulares como neuroblastoma (TAMAGNO et al., 2003) e células PC12 (MARTÍN et al., 2001; JANG and SURH., 2005 a) também podem ser expostas ao peptídeo A β para o estudo das alterações bioquímicas encontradas na DA.

Apesar da facilidade em trabalhar com cultivo primário de células e linhagens celulares, os efeitos induzidos pela exposição ao peptídeo A β não são completos, já que demonstram a resposta em um conjunto de células isoladas, enquanto que o SNC compreende vários tipos celulares que atuam de forma interdependente.

1.2.4. Cultivo de tecidos cerebrais

Uma alternativa para o modelo *in vitro* de estudos moleculares é o cultivo de tecidos. Nestes estudos, são utilizadas principalmente cultura organotípica de hipocampo (BASKYS and ADAMCHIK, 2001; DINELEY et al., 2001; VINCENT et al., 2002; HOLOPAINEN, 2005) exposta ao peptídeo A β . A cultura organotípica combina a acessibilidade e a manutenção *in vitro* de um sistema de cultura, preservando a anatomia e a citoarquitetura sináptica hipocampal intacta (STOPPINI et al., 1991; BRUCE et al., 1996; HOLOPAINEN, 2005; NORABERG et al., 2005). Este sistema *ex vivo* proporciona um excelente modelo para estudar fatores fisiológicos e compostos farmacológicos que possam contribuir para a plasticidade sináptica e a sobrevivência neuronal, bem como, para o entendimento das cascatas de sinalização celular envolvidas nas doenças neurodegenerativas e que possam ser alvo de agentes terapêuticos (HOLOPAINEN, 2005). Este sistema é amplamente empregado para o estudo da morte celular associada à excitotoxinas (ABDEL-HAMID and TYMIANSKI, 1997), à privação de oxigênio e glicose (PRINGLE et al., 1997; VALENTIM et al., 2003; CIMAROSTI et al., 2005; HORN et al., 2005) e da toxicidade induzida pelo peptídeo A β (ITO et al., 2003; CHONG et al., 2006; NASSIF et al., 2007).

Devido as características deste modelo experimental, particularmente mantendo a interação entre os diferentes tipos celulares do tecido neural, este torna-se um modelo muito atraente para o estudo de alterações moleculares associadas às doenças neurodegenerativas tais como a DA.

1.3. Resveratrol e a Doença de Alzheimer

Tratamentos farmacológicos para a DA são limitados (XIANG et al., 2002). O conhecimento incompleto dos processos moleculares que causam a DA dificulta o desenvolvimento de novas drogas (DOMINGUEZ and DE STROOPER, 2002). Muitas tentativas têm sido feitas na busca de soluções para retardar o processo neurodegenerativo e, conseqüentemente, a evolução da doença, atenuando assim a sintomatologia. A maioria das estratégias terapêuticas em estudo está voltada à prevenção da toxicidade mediada pelo peptídeo A β . Infelizmente a terapia atual visa apenas controlar os sintomas clínicos através do uso de anticolinesterásicos (ex. tacrina e galantamina) aumentando, dessa maneira, a transmissão colinérgica.

A enorme diversidade de funções químicas encontrada em compostos naturais pode proporcionar uma nova geração de drogas para o tratamento da DA (HOWES and HOUGHTON, 2003; HOWES et al., 2003; BASTIANETTO and QUIRION, 2004; ANEKONDA and REDDY, 2005). O consumo regular de vinho tinto está, freqüentemente, associado à explicação pelo Paradoxo Francês, onde foi observado que a população francesa apresentava baixo risco para doenças cardiovasculares apesar da dieta rica em gorduras saturadas (RICHARD, 1987; RENAUD and LORGERIL, 1992). Desde então, diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de compostos polifenólicos presentes em frutas, vegetais e bebidas derivadas de vegetais podem reduzir o risco de doenças neurológicas relacionadas à idade, tais como a DA, DP e isquemia (ORGOGOZO et al., 1997; PAN et al., 2003; WEINREB et al., 2004; DAUCHET et al., 2005; DAI et al., 2006).

Polifenóis são substâncias naturais presentes em óleos e bebidas obtidas de partes de plantas, frutas e vegetais tais como o óleo de oliva, o vinho tinto e o chá verde. Dentre os polifenóis, o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), uma fitoalexina

presente particularmente nas sementes e na casca da uva, é sintetizado naturalmente em resposta ao ataque de fungos à planta (FREMONT et al., 1999; PERVAIZ, 2003; DE LA LASTRA and VILLEGAS, 2005). Esta substância pode ser considerada muito promissora na neuroproteção contra doenças neurológicas como a DA e a DP (RUSSO et al., 2003). Nas plantas, o resveratrol se encontra nas formas *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* a responsável pelos seus efeitos biológicos (SOLEAS et al., 1997). O resveratrol possui um amplo espectro de propriedades tais como efeitos antioxidantes (SHARMA and GUPTA, 2002; JANG and SURH, 2003), prevenindo várias doenças como câncer (JANG et al., 1997), as doenças cardiovasculares (BRADAMANTE et al., 2004), a isquemia (SINHA et al., 2002; WANG et al., 2002; ZAMIN et al., 2006), a DA (ANEKONDA, 2006) e a DP (RUSSO et al., 2003). Além disso, aumenta a resistência ao estresse e o período de vida de vários organismos, desde fungos (HOWITZ et al., 2003) até vertebrados (VALENZANO et al., 2006).

Recentes estudos sugerem que o resveratrol pode modular diversas vias de sinalização celular, tais como as vias mediadas pela PI3K e pelas MAPKs (MILOSO et al., 1999; DAS et al., 2005; KLINGE et al., 2005). E modelos *in vitro* da DA foi observado que o resveratrol pode inibir a ativação da via mediada pelo NFκB e diminuir a resposta inflamatória (CHEN et al., 2005), modular a atividade da proteína cinase C (PKC – *Protein Kinase C*) (HAN et al., 2004) e promover a degradação do peptídeo Aβ via proteassoma (MARAMBAUD et al., 2005). Além disso, é atribuída ao resveratrol a capacidade de mimetizar uma situação de restrição calórica e induzir a ativação de sirtuínas, histonas deacetilase classe III, proteínas que podem promover sobrevivência e resistência ao estresse induzido por diferentes

adversidades (GUARENTE and PICARD, 2005; SINCLAIR, 2005; BAUR and SINCLAIR, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

a) Comparar a toxicidade induzida pelo peptídeo A β 1-42 e pelo fragmento de 11 aminoácidos, A β 25-35, em um modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos.

b) Investigar o possível efeito neuroprotetor do Resveratrol no modelo de cultura organotípica de hipocampo exposta ao peptídeo A β .

2.2. Objetivos específicos:

a) Avaliar a morte celular induzida pelo peptídeo A β 1-42 e pelo fragmento A β 25-35 em cultura organotípica;

b) Comparar o efeito de ambos os peptídeos sobre proteínas envolvidas com vias apoptóticas tais como caspase 3, PTEN, Akt e GSK-3 β ;

c) Avaliar o efeito do tratamento crônico com resveratrol sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo A β .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os peptídeos A β 1-42, A β 42-1, A β 25-35 e A β 35-25 foram obtidos da American Peptide Co. (Sunnyvale, CA, USA). Os reagentes para o meio de cultivo foram obtidos da Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). As membranas Millicell (Millicell[®]-CM, 0.4 μ m) para o cultivo do tecido foram obtidas da Millipore (Millipore[®], Bedford, MA, USA) e as placas de 6 poços da TPP (Tissue culture test plates TPP[®], Switzerland). Iodeto de Propídio (IP), acrilamida, bisacrilamida SDS e β -mercaptoetanol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os anticorpos primários utilizados para contemplar o primeiro objetivo deste trabalho foram comprados da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) e o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase, bem como os reagentes para o ensaio de quimioluminescência (ECL) foram comprados da Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). A membrana de nitrocelulose Hybond-C foi obtida da Hybond[™] ECL[™] (Hybond[™] ECL[™] nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) e os filmes de raio-X foram da Kodak (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). Todos os outros reagentes foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) ou Merck (Darmstadt, Germany). O Resveratrol utilizado na segunda fase deste trabalho foi obtido da Calbiochem (San Diego, CA, USA).

3.2. Modelo de lesão induzida pelo peptídeo A β

As culturas organotípicas de hipocampo de ratos foram preparadas e mantidas de acordo com o método de interface, originalmente apresentado por Stoppini e colaboradores (1991) com algumas modificações. Todos os procedimentos usados seguiram os princípios de “Cuidados com Animais de Laboratório” do Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health* – NIH) e foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brevemente, os hipocampus de ratos de 6-8 dias de idade foram fatiados em 400 µm através de um fatiador de tecido *Mcllwain chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co), as fatias transferidas às membranas Millicell e estas para placas de cultivo de 6 poços sob condições estéreis. As culturas foram mantidas por um período de maturação *in vitro* de 28 dias a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio de cultivo trocado a cada três dias. Após este período de maturação, na primeira parte deste trabalho, as culturas foram expostas a 25 µM dos peptídeos Aβ1-42, Aβ42-1, Aβ25-35 e Aβ35-25 por um período de 48h. Na segunda parte deste trabalho, as culturas foram expostas somente a 25 µM do peptídeo Aβ35-25. A intensidade de morte celular foi analisada pela avaliação da incorporação do corante Iodeto de Propídeo (IP) (Noraberg et al., 1999). O IP é um componente polar impermeável à membrana celular íntegra, entretanto quando a célula perde a integridade da membrana citoplasmática o IP permeia a membrana celular e liga-se ao DNA gerando fluorescência. Após 46h de exposição aos peptídeos, 5 µM do IP foram adicionados ao meio de cultivo e incubado por 2h. As culturas foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando um filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas através do programa de análise de imagens Scion Image (<http://www.scioncorp.com>).

Para a análise das cascatas de sinalização celular envolvidas na citotoxicidade mediada pelos peptídeos A β que serão apresentadas no Item 4.1 foi realizado o ensaio de *Western blotting*. Após a obtenção das imagens, as fatias foram homogeneizadas em solução de lise (4% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM Tris) e uma alíquota foi retirada para a determinação da quantidade de proteínas (Peterson, 1983). As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (14%). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato de transferência semi-seco (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). As membranas foram incubadas por 60 min a 4°C numa solução de bloqueio (Tampão Tris contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween-20, pH 7,4) seguido pela incubação durante 18h com os anticorpos para as proteínas de interesse dissolvidos na solução de bloqueio conforme descrito no Item 4.1. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase, por duas horas. O ensaio de quimioluminescência foi detectado utilizando filmes de raio-X. Estes filmes foram escaneados e a percentagem da intensidade das bandas foi analisado usando o programa Optiquant (Packard Instrument).

3.3. Análise Estatística

Os dados obtidos nestes experimentos foram analisados estatisticamente pela Análise da Variância de uma via (ANOVA - one-way analysis of variance), seguido pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados em Itens.

No **Item 4.1** serão apresentados os resultados obtidos a partir do estudo de comparação da citotoxicidade mediada pelos peptídeos A β 1-42 e A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de ratos, contemplando o primeiro objetivo geral desta dissertação e dois objetivos específicos. Esses resultados serão apresentados na forma de artigo científico submetido ao Periódico *Journal of Neuroscience Methods*.

No **Item 4.2** serão apresentados resultados parciais, uma vez que este estudo ainda se encontra em andamento, do efeito do resveratrol sobre a lesão induzida pelo peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de rato. Estes dados contemplam o segundo objetivo geral e o terceiro objetivo específico desta dissertação. Após a conclusão deste estudo, os resultados obtidos farão parte de um manuscrito que será submetido a um periódico.

4.1. Artigo Científico submetido ao periódico *Journal of Neuroscience Methods*

A comparative study of beta-amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures

Rudimar Luiz Frozza, Ana Paula Horn, Juliana Bender Hoppe, Fabrício Simão, Daniéli Gerhardt, Ricardo Argenta Comiran, and Christianne Gazzana Salbego*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Number of text pages: 31

Number of figures: 5

* Corresponding author:

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Ramiro Barcelos, 2600 - anexo, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5570; fax: +55 51 3308 5535.

E-mail address: salbego@terra.com.br (C. Salbego).

Abstract

Accumulation of the neurotoxic amyloid β -peptide ($A\beta$) in the brain is a hallmark of Alzheimer's disease (AD). There is a plethora of genetic, physiological and biochemical evidence that supports the idea that $A\beta$ is at least one of the originating causes of the AD. Several synthetic $A\beta$ peptides have been used to study the mechanisms of toxicity. Here, we sought to establish comparability between two commonly used $A\beta$ peptides $A\beta$ 1-42 and $A\beta$ 25-35 on an *in vitro* model of $A\beta$ toxicity. For this purpose we used organotypic slice cultures of rat hippocampus and observed that both $A\beta$ peptides caused similar toxic effects regarding to propidium iodide uptake and caspase-3 activation. In addition, we also did not observe any effect of both peptides on PTEN and Akt phosphorylation; otherwise the phosphorylation of GSK-3 β was increased. Although further studies are necessary for understanding mechanisms underlying $A\beta$ peptide toxicity, our results provide strong evidence that $A\beta$ 1-42 and the $A\beta$ 25-35 synthetic peptides induce neuronal injury in a similar pattern.

Keywords: Alzheimer's disease; amyloid β -peptide; organotypic culture; caspase-3

1. Introduction

Degenerative diseases of the human brain have long been viewed as one of the most enigmatic and intractable problems in biomedicine (Haass and Selkoe, 2007). Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive neurodegenerative disorder that occurs gradually and results in memory loss, unusual behavior, personality changes and a decline in thinking abilities (Parihar and Hemnani, 2004). The disease process involves the degeneration of synapses and neurons in brain regions that play fundamental roles in learning and memory including hippocampus, entorhinal cortex, basal forebrain, amygdale, frontal cortex, and inferior parietal cortex (Mattson and Chan, 2003). AD neuropathology is characterized by key features that include formation of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated *tau* protein and the fibrillar amyloid β -peptide ($A\beta$) deposition into dense senile plaques (Selkoe and Schenk, 2003).

The $A\beta$ is a hydrophobic polypeptide consisting of 39-43 amino acid residues, and has been implicated in neuronal and vascular degeneration, potentially contributing to progressive dementia (Selkoe, 2000). The $A\beta$ peptide is proteolytically produced by β - and γ -secretases from a single transmembrane Amyloid Precursor Protein (APP), which is expressed normally throughout life by virtually all mammalian cells (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992; Selkoe, 1996). There is a plethora of genetic, physiological and biochemical evidence that supports the idea that $A\beta$ is at least one of the originating causes of the AD (Loo et al., 1993; Selkoe, 1999; Bateman and Chakrabarty, 2004). Experimental data from both *in vitro* and *in vivo* studies indicate that different molecular forms of $A\beta$ affect a wide array of neuronal and glial functions, thereby leading to neural cell death (Yankner et al., 1989).

Several synthetic A β peptides have been used to study the mechanisms of their toxicity in cell lines (Jang and Surh, 2005) and primary neuronal cell cultures (Abe and Saito, 2000). Among the A β fragments studied so far, the A β 25-35 peptide represents the shortest fragment of A β processed in *vivo* by brain proteases (Kubo et al., 2002). Therefore, this peptide exhibits significant levels of molecular aggregation, retaining the toxicity of the full-length peptide, although it is lacking of the metal binding sites (Clementi et al., 2005). It has been proposed that A β 25-35 peptide represents the biologically active region of A β 1-42 (Pike et al., 1995). Thus, this fragment is widely used in both in *vitro* and in *vivo* by neuroscience researches to establish the AD model (Misiti et al., 2005; Kosuge et al., 2006; Nassif et al., 2007). In *vitro* studies, conducted on various cell models, indicate that A β -induced cell death is an apoptotic process (Yankner et al., 1989; Cotman and Su, 1996). Particularly, the A β 25-35 has been shown to stimulate the activity of several caspases, including caspase-2, -3 and -6 in rat cerebellar granule cells (Gunn-More and Tavaré, 1998). Nevertheless, we can not find in the literature any study comparing the effects of A β 1-42 and A β 25-35 peptides in organotypic hippocampal slices culture.

The access to the central nervous system is one limiting factor to study neurodegenerative diseases. Organotypic cultures combine the accessibility and maintenance of in *vitro* culture systems while preserving intact the hippocampal synaptic circuitry and anatomy (Stoppini et al., 1991; Bruce et al., 1996). This *ex vivo* system provides an excellent model to study physiological factors and pharmacological compounds contributing to neuronal survival and synaptic plasticity, as well as on the role of specific proteins and cascades involved (Holopainen, 2005). This culture system has been used quite extensively to study neuronal death associated with excitotoxins (Abdel-Hamid and Tymianski, 1997), oxygen and

glucose deprivation (Pringle et al., 1997; Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2005) and A β toxicity (Ito et al., 2003; Chong et al., 2006; Nassif et al., 2007).

We sought to establish comparability between two commonly used A β peptides (A β 1-42 and A β 25-35) on an *in vitro* model of A β toxicity. Here we compared the effects of A β 1-42 and A β 25-35 on the extent of cell death, assessed by propidium iodide (PI) uptake and by caspase-3 activation using organotypic slice cultures of rat hippocampus. We also compared the effect of these peptides on the signaling mechanism through analysis of immunoprecipitation and phosphorylation of PTEN, Akt and GSK-3 β proteins. This study reinforces that the synthetic peptide A β 25-35 is a convenient tool for the investigation of neurotoxic effect of pathological A β on this *in vitro* model of AD.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A β 1-42, A β 42-1, A β 25-35 and A β 35-25 peptides were purchased from American Peptide Co. (Sunnyvale, CA, USA). Culture medium, HBSS, fungizone (Amphotericin B) and horse serum heat inactivated were purchased from Gibco-Invitrogen (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).

Polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated and reagents to detect chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Hybond-C nitrocellulose membrane 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). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991), with modifications (Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2005). Briefly, 400 µm 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% minimum essential medium, 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 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.

2.3. Peptide preparation and culture treatments

One milligram of A β peptides was dissolved in sterilized bidistilled water and stock solutions of A β 1-42 and A β 42-1 (0.2 mM) and of A β 25-35 and A β 35-25 (0.5 mM) were stored at -20°C. Prior to use, A β peptides were aggregated at 37°C for 72h (Han et al., 2004). To establish the A β induced neurotoxicity, on the 28th day *in vitro* the medium was replaced by a serum free medium and slices were treated with 25 μ M (final concentration) of A β 1-42, A β 42-1, A β 25-35 or A β 35-25. To assure full contact between A β and the culture, 300 μ l of treatment media containing A β peptides were applied upon the slices and 700 μ l under the slices. Control slices received only serum free medium without A β peptides.

2.4. Quantification of cellular death

Cell damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Norberg et al., 1999). 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 the treatments (A β peptides 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). Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was detectable above background was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of damage (Valentim et al., 2003).

2.5. Western blotting assay

After obtaining the fluorescent images, slices were homogenized in lyses buffer (4% sodium dodecylsulfate -SDS-, 2 mM EDTA, 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination (Peterson, 1983) and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Proteins were resolved (50 μ g per lane) on 14% 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 with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution overnight at 4°C. The primary antibodies against the following proteins were used: anti-cleaved-caspase-3 (Asp175) (1:700); anti-caspase-3 (1:1000), anti-phospho PTEN (Ser380) (pPTEN, 1:1000), anti-PTEN (1:1000), anti-phospho Akt (Ser473) (pAkt, 1:1000), anti-Akt (1:1000), anti-phospho GSK-3 β (Ser9) (pGSK-3 β , 1:1000), anti-GSK-3 β (1:1000), and anti- β -actin (1:1000). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1000). Chemiluminescence was detected using X-ray films. Films were scanned and the

percentage of band intensity was analyzed using Optiquant software (Packard Instrument). For each experiment, the test groups were compared to control cultures not exposed to A β peptides. Data are expressed as percentage of phosphorylated protein, which was obtained by ratio of the immunocontent of phosphoprotein (pPTEN, pAkt or pGSK-3 β) to the whole amount of the protein (PTEN, Akt or GSK-3 β) or by cleaved-caspase-3, which was obtained by ratio of cleaved-caspase-3 to its whole amount of protein (caspase-3) provided by the immunodetection assay with the total antibodies.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.D.M. and analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons were performed with Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cell damage induced by A β 1-42 and A β 25-35 peptides

To investigate whether A β 1-42 and A β 25-35 peptides cause a significant and similar cell death, we used organotypic hippocampal slices culture as model. The exposure of cultures to A β 1-42 (25 μ M) or A β 25-35 (25 μ M) for 48h caused a marked increase in fluorescence in hippocampal slices (Fig. 1A). Quantification of PI fluorescence showed that both A β 1-42 and A β 25-35 peptides caused about 39% of

cell damage in hippocampus after 48h of exposure, a significant increase when compared to control slice cultures with a basal PI incorporation of 5% (Fig. 1B). There were no significant cell death differences between A β 1-42 and A β 25-35 peptides, indicating that both caused similar toxic effects (Fig. 1B). We did not observe any increase in fluorescence in hippocampal slices treated with the reverse sequence of both peptides (A β 42-1 and A β 35-25) at 25 μ M (data not shown).

3.2. A β 1-42 and A β 25-35-induced cell death was accompanied by caspase-3 activation

To further clarify and compare the mechanism by which A β 1-42 and A β 25-35 cause cell death in hippocampal slices, we evaluated the activation of caspase-3, a key executor in apoptosis. For that we performed Western blotting assays using antibodies against the active form of caspase-3 (cleaved-caspase-3) as well as against its total immunocontent (Fig. 2A). The exposure to 25 μ M of A β 1-42 or A β 25-35 peptides for 48h significantly increased the amount of cleaved-caspase-3 when compared to control slice cultures not exposed to peptides (Fig. 2B). In addition, there were no statistical differences between cleaved-caspase-3 induced by A β 1-42 and A β 25-35 (Fig. 2B).

3.3. A β 1-42 and A β 25-35 peptides had no effect on PTEN phosphorylation

In order to determine whether the PI3-K signaling pathway was involved in the toxic effect of both A β peptides, we investigated the status of phosphorylation of PTEN (PI3-K phosphatase). PTEN phosphorylation was examined 48h after

exposure of slice cultures to 25 μ M of A β 1-42 or A β 25-35 peptides by Western blotting with antibodies against the active form of PTEN, phosphorylated at Ser380, as well as its total immunocontent (Fig. 3A). As presented in Fig. 3B, there were no statistical differences in pPTEN intensity among controls and A β peptides treated slices neither between both peptides.

3.4. A β 1-42 and A β 25-35 peptides had no effect on Akt phosphorylation

Considering that there were no significant differences in the pPTEN intensity and that Akt is a downstream protein in PI3-K pathway, we decided to investigate the status of Akt phosphorylation. Western blotting was performed with antibodies against the active form of Akt, phosphorylated at Ser473, as well as against its total immunocontent (Fig. 4A). As presented in Fig. 4B, exposure of cultures to 25 μ M of A β 1-42 or A β 25-35 peptides for 48h did not cause any difference in pAkt intensity.

3.5. A β 1-42 and A β 25-35 peptides increased the phosphorylation of GSK-3 β protein

Following the PI3K pathway, we also analyzed GSK-3 β phosphorylation by Western blotting after 48h exposure of cultures to A β peptides. We used antibodies against the inactive form of GSK-3 β , phosphorylated at Ser9, as well as against its total immunocontent (Fig 5A). Surprisingly, we found that both A β peptides increased GSK-3 β phosphorylation/inactivation after 48h of exposure to A β peptides (Fig. 5B). No statistical differences were detected in the level of pGSK-3 β between cultures exposed to A β 1-42 or A β 25-35 (Fig. 5B).

4. Discussion

The accumulation of the neurotoxic β -amyloid peptide ($A\beta$) in the brain is a hallmark of Alzheimer's disease (AD), and deposition of this peptide is thought to be involved in the development of neuropathological lesions observed in AD (Mattson, 1997). While the molecular basis for the disease is far from established, several lines of evidence indicate that elevated levels of $A\beta$ peptide trigger the events that lead to impaired memory (Hardy and Selkoe, 2002). $A\beta$ peptide is the major component of senile plaques, which have been considered to play a causal role in the development and progress of AD. Several synthetic $A\beta$ peptides have been used in numerous models of AD, either in *vitro* or in *vivo*. Among these synthetic peptides, $A\beta_{25-35}$ is the most used by researchers. $A\beta_{25-35}$ is considered the shorter fragment exerting neurotoxic effects in a similar way to those produced by $A\beta_{1-40}$ or $A\beta_{1-42}$, such as learning and memory impairment, neuronal apoptosis, cholinergic dysfunction, and oxidative stress (Olariu et al., 2001; Tohda et al., 2003). Thus, $A\beta_{25-35}$ is usually used to establish the AD model for study of the neurotoxic properties of $A\beta$ and drug screening.

The main purpose of the present study was to compare the toxicity of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{25-35}$ peptides by propidium iodide incorporation and by Western blotting to some proteins that could be involved in cell death in organotypic hippocampal slices culture. $A\beta$ -induced neurotoxicity has been correlated to extent of β -sheet structure present in a sample of peptide. We prepared $A\beta$ samples at 0.2 mM ($A\beta_{1-42}$) and 0.5 mM ($A\beta_{25-35}$) concentrations, aggregated them for 72h, add to the culture at 25 μ M (final concentration) and then measured cell response. Therefore, we studied the effect of both $A\beta$ peptides on caspase-3 activation (a marker of apoptotic cell death),

on PI3-K substrates (Akt and GSK-3 β) and on PTEN, an indirect Akt downregulating protein.

Initially, we observed a reliable pattern of cellular damage when A β peptides were added under serum free medium conditions. Our results have shown that 25 μ M of the A β 1-42 or A β 25-35 peptides induced similar cell death pattern after a 48h exposure. This long period of exposure was required to A β peptides exert significant toxic effects *in vitro* and is in accordance to others studies (Baskys and Adamchik, 2001; Lu et al., 2004; Nassif et al., 2007).

In the attempt to better establish a comparison between the cell death induced by A β 1-42 and A β 25-35 exposure, we evaluated the activation of caspase-3, a key executor protein in apoptosis. Both A β peptides, at 25 μ M after 48h, were able to activate caspase-3 in a similar pattern. Several studies have reported that both apoptosis and necrosis may occur in parallel during neurodegeneration (Lee et al., 1999). In addition, biphasic cell death, beginning with acute necrosis followed by a delayed apoptosis, the hybrid forms of neuronal death, and/or switch from apoptosis to necrosis strongly support this view (Papucci et al., 2004). Beyond necrotic cell death, there is now strong evidence that the neurotoxic effect of A β peptides is mediated through activation of caspases (Cotman and Su, 1996; Troy et al., 2000). Neuronal apoptosis is also seen in human AD brain (Stadelmann et al., 1999). Activation of the apoptotic cascade induced by A β could also explain many of the features of the disease and its progression (Jin et al., 2005). The caspase-3 activation may be accompanied to *tau* cleavage, promoting pathological *tau* filament assembly in neurons, generating a proteolytic product that assembles more rapidly and more extensively into *tau* filaments *in vitro* than wild-type *tau* (Rissman et al.,

2004; Fasulo et al., 2005). This supports the hypothesis that amyloid deposition, neurofibrillary tangles, and caspase activation could share a common pathway.

In order to investigate a molecular mechanism that could be involved in A β toxicity, and compare the effect of both peptides (A β 1-42 and A β 25-35) on it, we analyzed the PI3K-Akt pathway by Western blotting of phosphoPTEN/PTEN, phosphoAkt/Akt and phosphoGSK-3 β /GSK-3 β . Disturbance of PTEN/Akt signaling has been recently implicated in the pathogenesis of AD, but the effects on the molecular processes underlying AD pathology have not yet been fully described. The main regulatory mechanism of these enzymes is by phosphorylation: Akt is activated while GSK-3 β is inhibited by phosphorylation (Li et al., 2000). Activation of GSK-3 β promotes pro-apoptotic signaling (Li et al., 2000). On other hand, PTEN is a negative regulator of PI3-K signaling and alters *tau* phosphorylation in cells by mechanisms independent of GSK-3 β (Kerr et al., 2006). Our results show that both A β 1-42 and A β 25-35 peptides induce neither PTEN phosphorylation nor Akt phosphorylation after 48h of exposure.

Besides, we observed an increase on GSK-3 β phosphorylation despite our results have shown that both A β peptides induced cell death and activated caspase 3. This could be explained because other intracellular signal transduction pathway than Akt negatively regulate GSK-3 β activity, such as the Wnt pathway and protein kinase C (PKC) (Cook et al., 1996; Inestrosa et al., 2002; Hüll et al., 2006). More studies are necessary to elucidate this question. It is important to emphasize that even in this parameter both peptides had a similar effect, suggesting that they act by the same signaling pathway.

In conclusion, our results provide strong evidence supporting that both peptides induce neuronal injury in a similar pattern, reinforcing that the synthetic

peptide A β 25-35 is a convenient tool for the investigation of neurotoxic mechanisms involved in AD. Although further studies are necessary for understanding the precise mechanism of both A β 1-42 and A β 25-35 peptides toxicity, the data generated in this study add some evidences that help to elucidate how A β peptide impinges upon second messenger signals in hippocampus.

Acknowledgements

This work was supported by 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). The authors thank to Alessandra Heizelmann for excellent technical assistance.

References

Abdel-Hamid KM, Tymianski M. Mechanisms and effects of intra-cellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. *J. Neurosci.*, 1997;17:3538-3553.

Abe K, Saito H. Amyloid β neurotoxicity not mediated the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neurosci. Lett.*, 2000;292:1-4.

Baskys A, Adamchik Y. Neuroprotective effects of extracellular glutamate are absent in organotypic cultures treated with the amyloid peptide A β (25-35). *Brain Res.*, 2001;13:188-194.

Bateman DA, Chakrabarty A. Interactions of Alzheimer amyloid peptides with cultured cells and brain tissue, and their biological consequences. *Biopolymers (Peptide Science)*, 2004;76:4-14.

Bruce AJ, Malfroy B, Baudry M. β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a syntetic catalytic free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996;93:2312-2316.

Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kayed R, Glabes CG, Tenner AJ. 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.*, 2006;281:20315-20325.

Cimarosti H, Zamin LL, Frozza R, Nassif M, Horn AP, Tavares A, Netto CA, Salbego C. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochem. Res.*, 2005;30:191-199.

Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsini F, Giardina B, Misiti F. A β (31–35) and A β (25–35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett.*, 2005;579:2913-2918.

Cook D, Fry MJ, Hughes K, Sumathipala R, Woodgett JR, Dale TC. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signaling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.*, 1996;15:4526-4536.

Cotman CW, Su JH. Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*;1996;6:493-506.

Fasulo L, Ugolini G, Cattaneo A. Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K. *J. Alzheimers dis.*, 2005;7:3-13.

Gunn-Moore FJ, Tavaré JM. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by serum withdrawal, glutamate or β -amyloid, is independent of Jun kinase or p38 mitogen activated protein kinase activation. *Neurosci. Lett.*, 1998;250:53-56.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenck D, Teplow DB, Selkoe DJ. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 1992;359:322-325.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Mol. Cell Biol.*, 2007;8:101-112.

Han Y-S, Zheng W-H, Bastianetto S, Chabot J-G, Quirion R. Neuroprotective effects of resveratrol against β -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *British J. Pharm.*, 2004;141:997-1005.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002;297:353-356.

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

Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C. Cellular death in hippocampus in response to PI-3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem. Res.*, 2005;30:355-361.

Hüll M, Muksch B, Akundi RS, Waschbisch A, Hoozemans JJ, Veerhuis R, Fiebich BL. Amyloid beta peptide (25–35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem. Int.*, 2006;48:663–672.

Inestrosa NC, De Ferrari GV, Garrido JL, Alvarez A, Olivares GH, Barría MI, Bronfman M, Chacón MA. Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, 2002;41:341-344.

Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K. Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptides and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cystine, a garlic compound. *Brain Res.*, 2003;985:98-107.

Jang J-H, Surh Y-J. β -Amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase – NF- κ B signaling pathway. *Free Rad. Biol. & Med.*, 2005;38:1604-1613.

Jin Y, Yan E, Fan Y, Zong Z, Qi Z, Li Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005;8:943-951.

Kerr F, Rickle A, Nayeem N, Brandner S, Cowburn RF, Lovestone S. PTEN, a negative regulator of PI3 kinase signalling, alters tau phosphorylation in cells by mechanisms independent of GSK-3. *FEBS Lett.*, 2006;580:3121–3128.

Kosuge Y, Sakikubo T, Ishige K, Ito Y. Comparative study of endoplasmatic reticulum stress-induced neuronal death in rat cultured hippocampal and cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.*, 2006;49:285-293.

Kubo T, Nishimura S, Kumagae Y, Kaneko I. *In vivo* conversion of Racemized₋ Amyloid([D-Ser26]A₁₋₄₀) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A_{25-35/40}) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.*, 2002;70:474–483.

Lee JN, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature*, 1999;399:A7-A14.

Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidereich KA. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol. Cell. Biol.*, 2000;20:9356–9363.

Loo DT, Copani AC, Pike CJ, Whitmore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993;90:7951-5.

Lu XH, Bradley RJ, Dwyer DS. Olanzapine produces trophic effects *in vitro* and stimulates phosphorylation of Akt/PKB, ERK1/2, and the mitogen-activated protein kinase p38. *Brain*, 2004;1011:58-68.

Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Method.*, 1990;31:43-46.

Mattson MP. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Phys. Rev.*, 1997;77:1081– 132.

Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 2003;34:385-397.

Misiti F, Sampaolese B, Pezzotti M, Marini S, Coletta M, Ceccarelli L, Giardina B, Clementi ME. $A\beta(31-35)$ peptide induce apoptosis in PC 12 cells: contrast with $A\beta(25-35)$ peptide and examination of underlying mechanisms. *Neurochem. Int.*, 2005;46:575-583.

Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, Horn, AP, Salbego C. β -Amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 β , and PTEN. *Neurochem. Int.*, 2007;50:229-235.

Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Prot.*, 1999;3:278-290.

Olariu A, Tran MH, Yamada K, Mizuno M, Hefco V, Nabeshima T. Memory deficits and increase emotionality induced β -amyloid (25–35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural. Transm.*, 2001;108:1065-1079.

Papucci L, Formigli L, Schiavone N, Tani A, Donnini M, Lapucci A, Perna F, Tempestini A, Witort E, Morganti M, Nosi D, Orlandini GE, Orlandini SZ, Capaccioli S. Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. *Cell Tissue Res.*, 2004;316:197-209.

Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J. Clin. Neurosci.*, 2004;11:456-467.

Peterson GL. Determination of total protein. *Meth. Enzym.*, 1983;91:95-119.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.*, 1995;64:253-265.

Pringle, A.K., Angunawela, R., Wilde, G.J.C., Mephram, J.A., Sundstrom, L.E., Iannotti F. Induction of 72 KDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1997;23:289-298.

Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Investig.*, 2004;14:121-130.

Selkoe DJ. Amyloid beta-protein and genetics of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.*, 1996;271:18295-18298.

Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutics advances in Alzheimer's disease. *Nat. Alerts.*, 1999;399:A23-31.

Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000;924:17-25.

Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Ann. Rev. Pharm. and Toxic.*, 2003;43:545-584.

Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X., Mckay DM, Tintner R, Frangione B, Younkin SG. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 1992;258:126-129.

Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Brück W, Jellinger K, Lassmann H. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of

granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am. J. Pathol.*, 1999;155:1459-1466.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosc. Method.*, 1991;37:173-182.

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

Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, Frappier TF, Brown C, Shelanski ML. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amyloid. *J. Neurosci.*, 2000;20:1386-1392.

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares AA, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neurosci.*, 2003;118:379-386.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 1989;245:417-420.

Legends to figures

Fig. 1. PI uptake after exposure of organotypic hippocampal slices cultures to A β 1-42 and A β 25-35 peptides. PI fluorescence was observed as described under “Experimental Procedures”. **(A)** Representative photomicrographs of PI uptake in hippocampal slices 48h after exposure to 25 μ M of A β peptides (Magnification: 40X). **(B)** Quantification of PI uptake in response to A β . Values are expressed as % cell death in hippocampus. Bars represent the mean \pm SDM, n=7 (A β 1-42) and n=15 (A β 25-35). ***Significantly different from control culture. (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, p <0.001). A β , amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance; PI, propidium iodide

Fig. 2. Caspase-3 activation in response to A β 1-42 and A β 25-35 peptides in hippocampal slice cultures. **(A)** Representative Western blots showing cleaved-caspase-3 and caspase-3 48h after A β peptides (25 μ M) exposure. **(B)** Quantification of caspase-3 activation 48h after exposure to the 25 μ M of A β peptides normalized to the total amount of caspase-3. Uniformity of gel loading was confirmed with β -actin as the standard. Data are expressed as a ratio of the normalized cleaved-caspase-3 and caspase-3. Bars represent the mean \pm SDM, n=3. ***Significantly different from control culture (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls, p <0.001). A β , amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance

Fig. 3. A β 1-42 and A β 25-35 had no effect on PTEN phosphorylation in hippocampal slices cultures. **(A)** Representative Western blots showing pPTEN and PTEN 48h after A β peptides (25 μ M) exposure. **(B)** Quantification of pPTEN 48h

after exposure to 25 μ M of A β peptides normalized to the total amount of PTEN. Uniformity of gel loading was confirmed with β -actin as the standard. Data are expressed as a ratio of the normalized pPTEN and PTEN. Bars represent the mean \pm SDM, n=3. (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

A β , amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance; pPTEN, phospho-PTEN

Fig. 4. A β 1-42 and A β 25-35 had no effect on Akt phosphorylation in hippocampal slices cultures. (A) Representative Western blots showing pAkt and Akt 48h after A β peptides (25 μ M) exposure. **(B)** Quantification of pAkt 48h after exposure to the 25 μ M of A β peptides normalized to the total amount of Akt. Uniformity of gel loading was confirmed with β -actin as the standard. Data are expressed as a ratio of the normalized pAkt and Akt. Bars represent the mean \pm SDM, n=3. (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls). A β , amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance; pAkt, phospho-Akt

Fig. 5. GSK-3 β inactivation in response to A β 1-42 and A β 25-35 peptides in hippocampal slices cultures. (A) Representative Western blots showing pGSK-3 β and GSK-3 β 48h after A β peptides (25 μ M) exposure. **(B)** Quantification of GSK-3 β inactivation after 48h of exposure to 25 μ M of A β peptides normalized to the total amount of GSK-3 β . Uniformity of gel loading was confirmed with β -actin as the standard. Data are expressed as a ratio of the normalized pGSK-3 β and GSK-3 β . Bars represent the mean \pm SDM, n=3. *Significantly different from control culture, P <0.05; **significantly different from control culture, p <0.01 (One-way ANOVA

followed by Student-Newman-Keuls). A β , amyloid beta-peptide; ANOVA, analysis of variance; pGSK-3 β , phospho-GSK-3 β

Figure 1

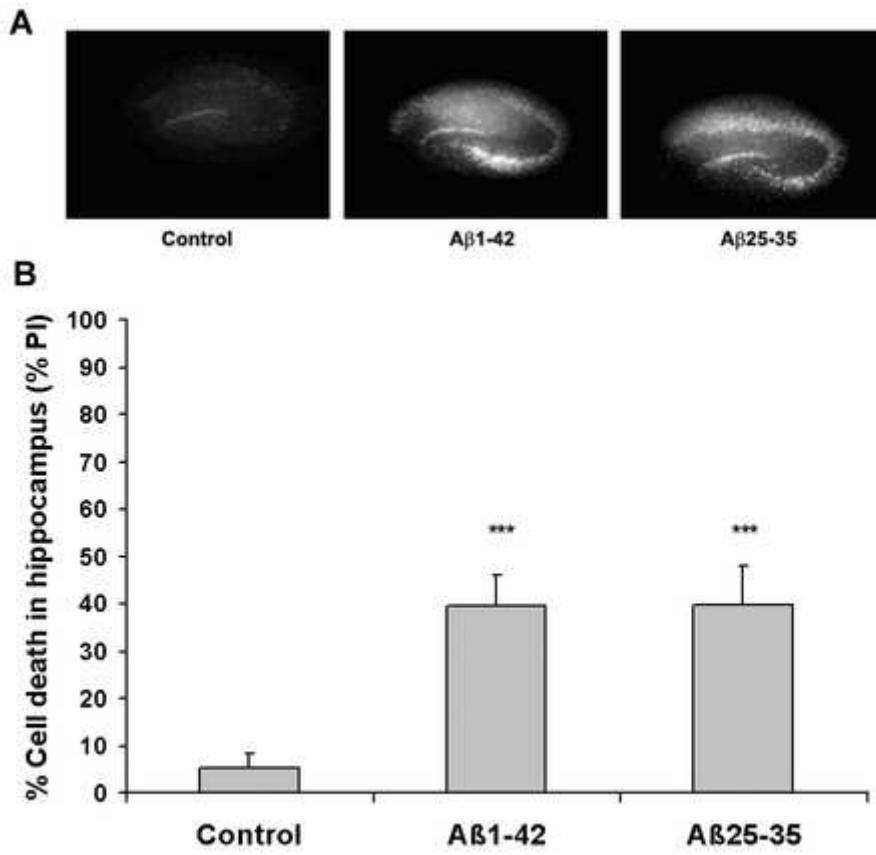


Figure 2

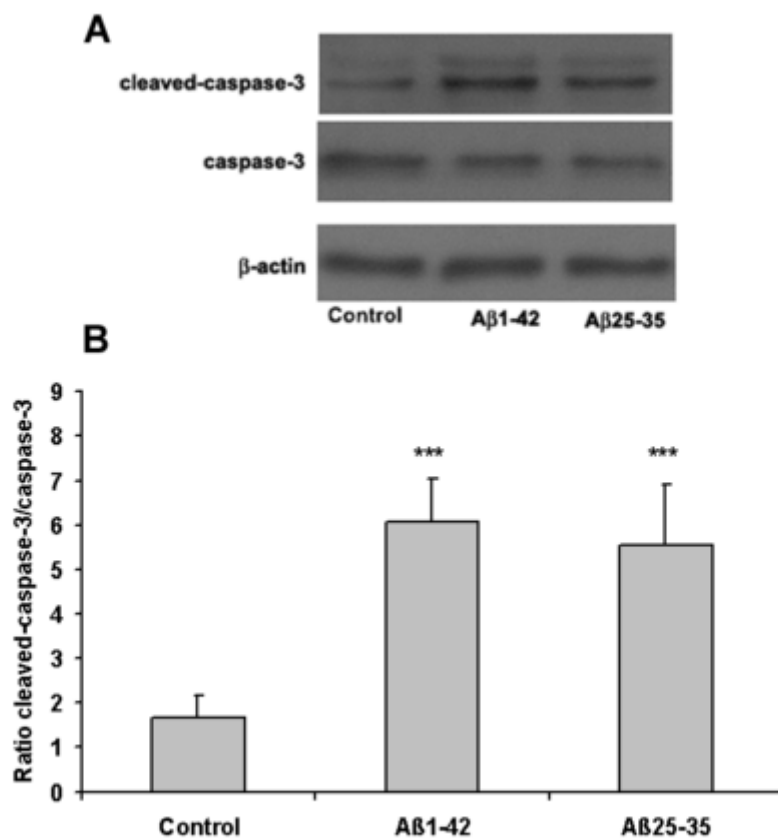


Figure 3

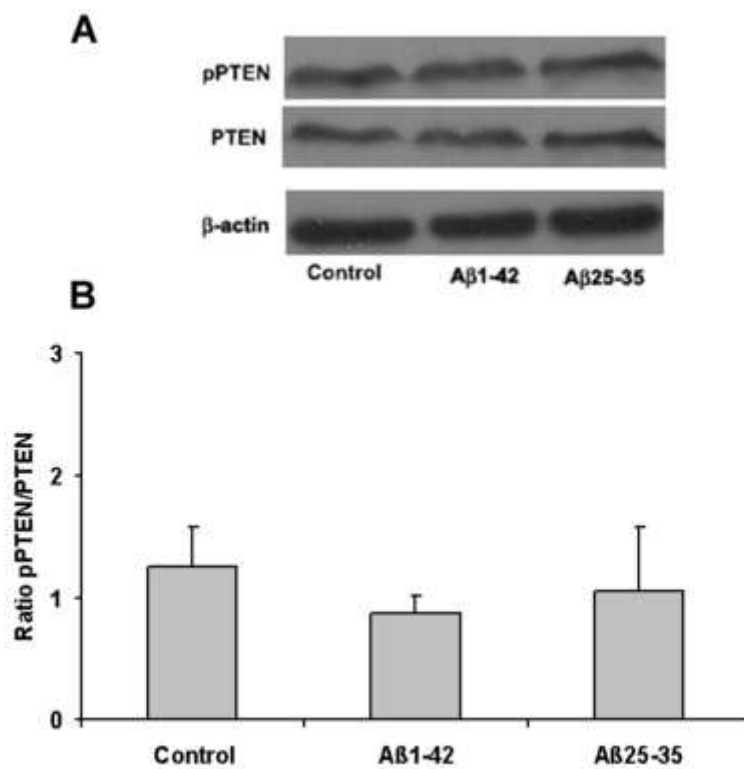


Figure 4

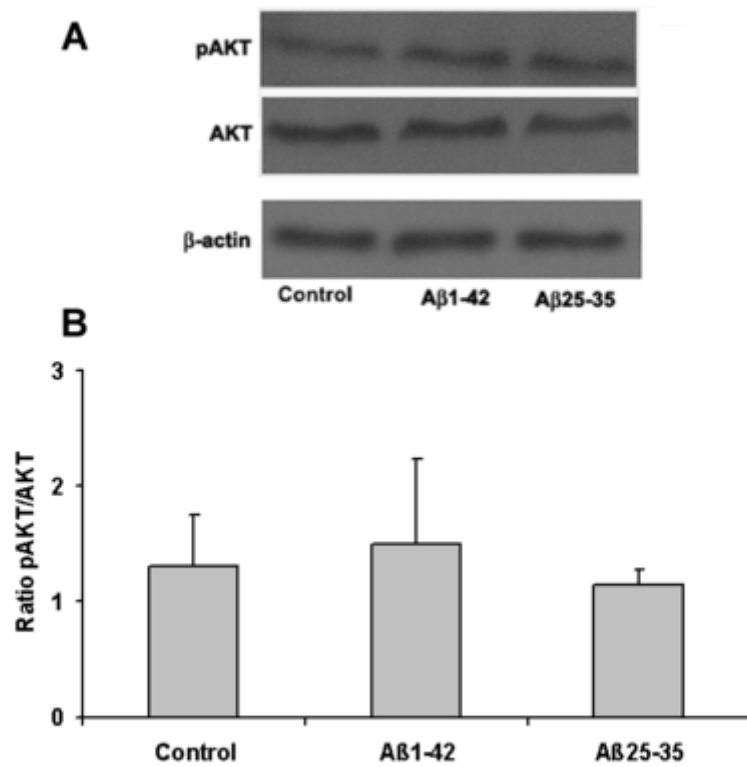
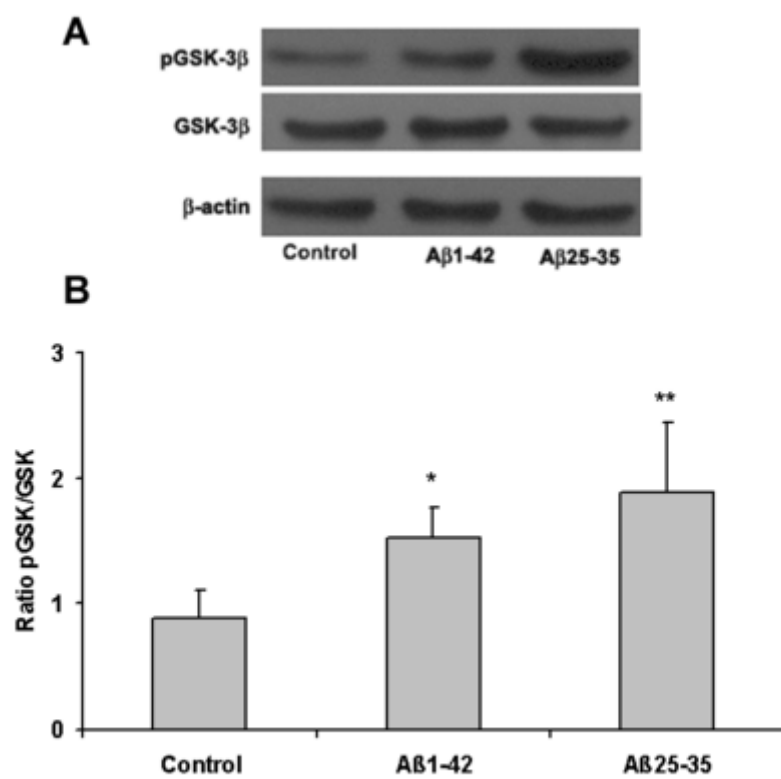


Figure 5



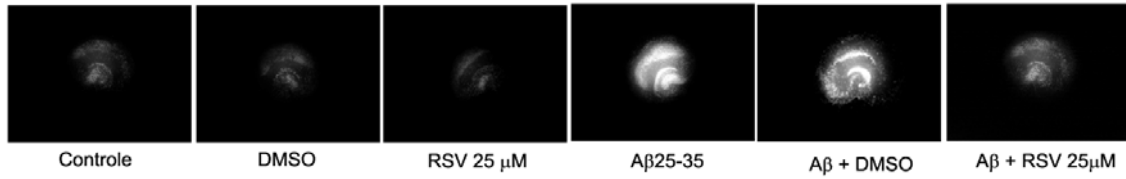
4.2. Efeito do resveratrol sobre a lesão induzida pelo peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de rato.

Em virtude de diversos estudos epidemiológicos indicarem que o consumo moderado de vinho tinto diminui o risco de desenvolvimento de demência como a DA (DARTIGUES et al., 1993; DOROZYNSKI, 1997; ORGOGOZZO et al., 1997; LAU et al., 2005) e que o resveratrol encontrado no vinho proteger neurônios em cultura contra a lesão induzida pelo peptídeo A β (JANG and SURH, 2003; HAN et al., 2004), conforme apresentado na introdução, neste Item da dissertação, nós buscamos avaliar o efeito do resveratrol sobre a citotoxicidade induzida pelo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de ratos. Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas culturas organotípicas de hipocampo de ratos de acordo com o método de Stoppini e colaboradores (1991), conforme metodologia descrita em Materiais e Métodos.

Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa foi observado o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre um modelo *in vitro* de isquemia em concentrações de 10, 25 e 50 μ M de resveratrol (ZAMIN et al., 2006). Para o presente estudo, nós escolhemos a concentração intermediária do resveratrol (25 μ M). Após um período de maturação *in vitro* de 28 dias, as culturas foram expostas a 25 μ M do peptídeo A β 25-35 por um período de 48h. Para avaliarmos um possível efeito neuroprotetor deste polifenol, 25 μ M de resveratrol ou 0,01% do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados ao meio de cultivo por 72h antes da exposição ao peptídeo A β 25-35, sendo estes mantidos durante as 48h de exposição a 25 μ M do peptídeo A β 25-35, mimetizando um tratamento crônico. A intensidade de morte celular foi analisada pela avaliação incorporação do corante Iodeto de Propídeo (IP). Como pode ser

observado na Figura 1 deste Item, o resveratrol, embora ainda não significativo estatisticamente, parece exercer atividade neuroprotetora frente a lesão induzida por 25 μ M do A β 25-35 sem causar efeito tóxico às fatias controle. Mais experimentos serão realizados para a confirmação desta hipótese. Após a conclusão deste estudo, conforme apresentado nas Perspectivas desta dissertação, os resultados obtidos farão parte de um manuscrito a ser submetido a um periódico científico.

A



B

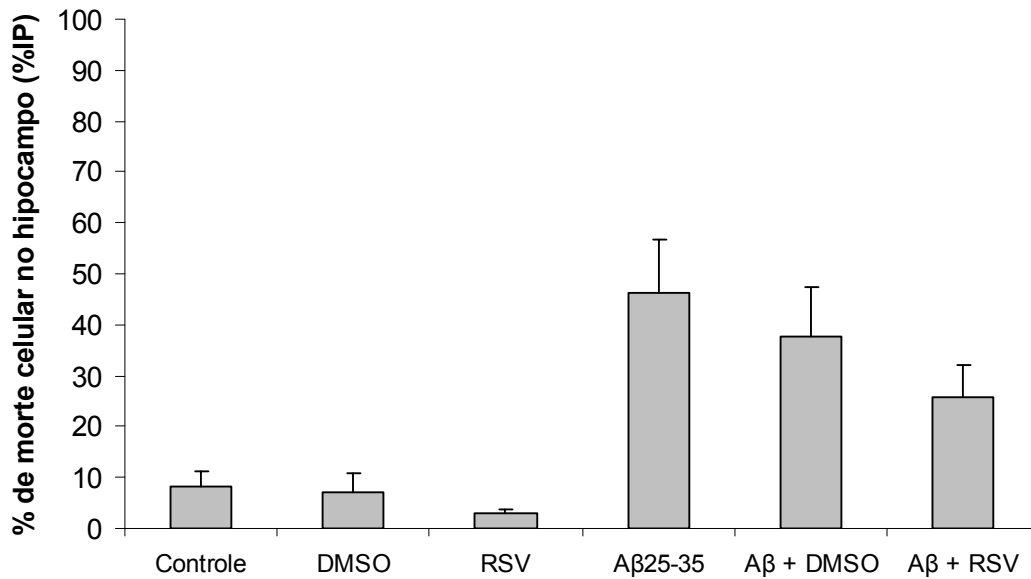


Figura 1. Efeito do tratamento crônico com resveratrol sobre a morte celular induzida pelo Aβ25-35. Setenta e duas horas antes da exposição a 25 µM do peptídeo Aβ25-35 as culturas receberam 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou 25 µM de resveratrol (RSV). **(A)** Microfotografias das culturas marcadas com IP após 48h de exposição a 25 µM do peptídeo Aβ25-35. **(B)** Análise quantitativa da morte celular induzida pelo peptídeo Aβ25-35 (25 µM) após 48h de exposição. O resveratrol (25 µM) foi adicionado ao meio de cultivo 72h antes da lesão e mantido durante as 48h de exposição ao peptídeo Aβ25-35. As barras representam a média ± DP, n=3.

5. DISCUSSÃO

As doenças neurodegenerativas estão entre os problemas mais enigmáticos da medicina. Há pouco mais de 100 anos atrás, em 1906, o psiquiatra alemão Alois Alzheimer apresentou o primeiro caso clínico-patológico de uma doença incomum, a qual atualmente carrega o seu nome, caracterizada pela deposição de placas senis e pela formação de emaranhados neurofibrilares (ALZHEIMER, 1907). Desde então, a DA tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade médica e científica. Na década de 80, pesquisadores estiveram focados no isolamento das placas senis para identificar seu componente principal (HAASS and SELKOE, 2007, LAFERLA et al., 2007). Dessa maneira foi purificado, a partir de depósitos senis na microvasculatura de meninges do cérebro de pacientes com DA, uma subunidade protéica de aproximadamente 4kDa denominada proteína β -amilóide (GLENNER and WONG, 1984; MASTERS et al., 1985). No final dos anos 80 também foi descoberto que os emaranhados neurofibrilares descritos por Alzheimer são compostos de agregados intracelulares da proteína *tau*, a qual torna-se anormalmente hiperfosforilada (IHARA et al., 1986; KOSIK et al., 1986; GOEDEERT et al., 1988).

Embora placas senis e emaranhados neurofibrilares sejam características da DA, estas não são as únicas alterações que ocorrem. Numerosas alterações funcionais e estruturais acontecem, incluindo resposta inflamatória e estresse oxidativo. A combinação de todas essas alterações patológicas, incluindo os efeitos do peptídeo A β e da hiperfosforilação da proteína *tau*, resulta na severa perda neuronal e na perda e/ou disfunção sináptica, a ponto que quando um paciente com DA morre, seu cérebro pode pesar cerca de um terço a menos que o cérebro de uma pessoa sem demência (LAFERLA et al., 2007).

Isolado a mais de 20 anos, o peptídeo A β é reconhecido pela sua capacidade de se auto-agregar e se depositar na forma de placas extracelulares. As placas senis consistem de extensas fibrilas de estrutura secundária em β -conformação caracterizada pela marcação com vermelho Congo ou com tioflavina S (KLEIN et al., 2001). O peptídeo A β exerce uma complexidade de atividades biológicas de modo que seus efeitos não são completamente conhecidos. Na análise *post mortem* do cérebro de pacientes com DA observa-se que o peptídeo A β com 42 aminoácidos (A β 1-42) é o principal componente das placas senis (JARRETT et al., 1993; MATTSOM, 1997; YOUNKIN, 1998; SELKOE, 2001).

Na tentativa de melhor entender os mecanismos tóxicos desencadeados pelo peptídeo A β , diversos modelos experimentais foram desenvolvidos, tais como o uso de animais transgênicos (HAASS et al., 1995; JANKOWSKY et al., 2004; ROVELET-LECRUX et al., 2006), a injeção intracerebral do peptídeo A β (MINOGUE et al., 2003; BOYD-KIMBALL et al., 2005), modelos utilizando cultura de células primárias (MOVSESYAN et al., 2004; HASHIOKA et al., 2005; INESTROSA et al., 2005; ZENG et al., 2005) ou linhagens celulares (MARTÍN et al., 2001; TAMAGNO et al., 2003; JANG and SURH., 2005 a, b) e modelos que utilizam cultivo tecidos cerebrais (BRUCE et al., 1996; BASKYS and ADAMCHIK, 2001; DINELEY et al., 2001; NORABERG et al., 2005; CHONG et al., 2006; NASSIF et al., 2007). Além disso, nos últimos anos tem crescido exponencialmente o uso de um fragmento com 11 aminoácidos (A β 25-35) originário do peptídeo A β 1-42 (YANKNER et al., 1990; LOO et al., 1993; ABE and SAITO, 2000; FREIR et al., 2003; HERVAS-AGUILAR et al., 2005; JANG and SURH, 2005 a; STEPANICHEV et al., 2006; ISHIGE et al., 2007) como uma alternativa mais econômica no desenvolvimento de modelos experimentais da DA.

O peptídeo A β 25-35 representa a região biologicamente ativa do peptídeo A β 1-42 (IVERSEN et al., 1995; PIKE et al., 1995), exercendo atividades similares sobre o sistema colinérgico e cognitivo (OLARIU et al., 2001; TOHDA et al., 2003). Diversos trabalhos na literatura utilizam este fragmento no modelo de lesão em cultura organotípica de hipocampo de rato, entretanto nenhum estudo comparativo entre a toxicidade exercida pelos peptídeos A β 1-42 e pelo A β 25-35 foi encontrado. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo comparar o efeito tóxico induzido por ambos peptídeos em um modelo *in vitro* de DA utilizando cultura organotípica de hipocampo de ratos.

Diversos grupos de pesquisa utilizam cultura organotípica de rato adulto-jovem como modelo experimental para estudar doenças neurodegenerativas (XIANG et al., 2000; LEUTGEB et al., 2003; HASSEN et al., 2004; LI et al., 2004). Considerando que a DA é uma doença característica de pessoas idosas, utilizar um modelo com tecido maduro seria mais relevante para explorar os mecanismos tóxicos induzidos pelo peptídeo A β . Entretanto, nosso grupo de pesquisa não conseguiu manter viáveis culturas a partir de ratos de 25-30 dias de idade. Em virtude disso, inicialmente, estabelecemos um modelo de lesão com o tecido amadurecido *in vitro* a partir de cultura realizada com ratos de 6-8 dias de idade, uma vez que dados da literatura indicam que cultura organotípica de hipocampo madura (4 semanas *in vitro*) são mais sensíveis ao peptídeo A β (BRUCE et al., 1996; ISHIGE et al., 2007). Assim, após um período de cultivo de 28 dias as culturas foram expostas à concentração de 25 μ M do peptídeo A β 1-42 ou 25 μ M do peptídeo A β 25-35 por 48h, totalizando 30 dias de cultivo. Os resultados mostraram uma significativa morte celular após 48h de exposição a ambos peptídeos em relação aos controles. O mais importante resultado encontrado foi que ambos os peptídeos apresentaram um perfil

de toxicidade muito similar, ou seja, a morte celular por necrose, analisada pela incorporação do corante Iodeto de Propídeo (IP) não foi diferente entre os dois peptídeos (Item 4.1, Figura 1). O longo tempo de exposição aos peptídeos (48h) necessário para observar esta toxicidade está de acordo com outros estudos que também relatam a necessidade deste prolongado tempo de exposição (BASKYS and ADAMCHIK, 2001; LU et al., 2004; ISHIGE et al., 2007; NASSIF et al., 2007; PATEL and GOOD, 2007).

Além da morte celular necrótica, há fortes evidências que o efeito neurotóxico do peptídeo A β também seja mediado através da ativação de caspases (COTMAN and SU, 1996; TROY et al., 2000), de modo que apoptose neuronal também é observada no SNC de pacientes com DA (STADELMANN et al., 1999). A ativação das cascatas apoptóticas induzida pelo peptídeo A β pode explicar muitas das características da doença e de sua progressão (JIN et al., 2005). Na tentativa de comparar a toxicidade de ambos os peptídeos sobre outros parâmetros, ainda no Item 4.1, nós analisamos a ativação da caspase 3, uma proteína chave na execução da morte celular apoptótica. Através da análise do imunoconteúdo da caspase 3 clivada nós observamos que 25 μ M do peptídeo A β 1-42 ou do peptídeo A β 25-35 induziram um significativo aumento na forma ativa da caspase 3 (caspase 3 clivada) (Item 4.1, Figura 2). Esse resultado, associado ao aumento da incorporação o IP indicam que ambos os peptídeos induziram morte por apoptose e por necrose de maneira muito similar, sustentando a hipótese que o peptídeo A β 25-35 é uma boa ferramenta para a análise de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DA.

Diversos estudos têm relatado que apoptose e necrose podem ocorrer, paralelamente, durante a neurodegeneração (LEE et al., 1999). Além disso, a morte

celular bifásica, apresentando necrose aguda seguida por apoptose tardia, representa a forma híbrida ou a mudança entre apoptose e necrose na morte neural, suportando a hipótese das duas formas de morte encontradas na neurodegeneração e explicando a necessidade de um longo período de exposição aos peptídeos A β para desencadeamento da neurotoxicidade (PAPUCCI et al., 2004; PATEL and GOOD, 2007). A ativação da caspase 3 pode ser acompanhada pela clivagem da proteína *tau* gerando um produto proteolítico que promove a reunião de filamentos nos neurônios com conseqüente formação de emaranhados neurofibrilares (RISSMAN et al., 2004; FASULO et al., 2005). A interligação dessas cascatas de transdução (apoptose, clivagem e fosforilação da *tau*) fornecem suporte a idéia de que a deposição do peptídeo A β , de que a formação dos emaranhados neurofibrilares e que a ativação de caspases podem compartilhar vias de sinalização comuns.

Seguindo o estudo comparativo entre os peptídeos A β 1-42 e A β 25-35, nós avaliamos o efeito de ambos sobre a via de sinalização de sobrevivência celular mediada pela PI3K/Akt. A via mediada pela PI3K é uma importante via de sinalização neuronal anti-apoptótica (YUAN and YANKER, 2000) e distúrbios na sinalização da Akt (proteína cinase B) tem 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). Ativação da GSK-3 β promove o desencadeamento da sinalização pró-apoptótica (LI et al., 2000). Por outro lado, a PTEN é uma proteína que modula negativamente a via da PI3K/Akt e altera a fosforilação da *tau* por mecanismos independentes da GSK-3 β (KERR et al., 2006). Ainda que outros estudos, utilizando cultivo celular com mutações na APP e injeção intracerebroventricular de

estreptozotocina como modelos experimentais de DA, mostraram desregulação nesta via na DA (RYDER et al., 2004; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006), nós observamos que os peptídeos A β 1-42 e A β 25-35 não alteraram os níveis de fosforilação da PTEN nem da Akt após 48h de exposição (Item 4.1, Figuras 3 e 4). Embora não tenhamos detectado alterações nos níveis de fosforilação da PTEN e da Akt, verificamos que ambos peptídeos aumentaram a fosforilação e a conseqüente inativação da GSK-3 β (Item 4.1, Figura 5). Esse resultado parece contraditório, uma vez que observamos uma ativação da caspase 3 e que, entre as diversas proteínas que modulam esta ativação, encontra-se a GSK-3 β (LI et al., 2000; BALARAMAN et al., 2006). Além disso, a GSK-3 β também participa na formação dos emaranhados neurofibrilares através da fosforilação da *tau* e na modulação negativa da via de sobrevivência mediada pela via canônica Wnt/ β -catenina (INESTROSA et al., 2002; MOON et al., 2004; BALARAMAN et al., 2006; TAKAHASHI-YANAGA and SASAGURI, 2007). Ainda que não haja ativação da Akt, outras vias de sinalização podem convergir na inibição da GSK-3 β (INESTROSA et al., 2002; HÜLL et al., 2006). Contudo, nós não conseguimos explicar o aumento nos níveis de fosforilação da GSK-3 β encontrado nesse trabalho, o que nos estimula a estudarmos ainda mais os efeitos desencadeados pelo peptídeo A β . Entretanto, a principal interpretação dos dados obtidos no Item 4.1 foi a similaridade no efeito neurotóxico induzido por ambos peptídios A β 1-42 e A β 25-35 no modelo de cultura organotípica de hipocampo de rato após um período de maturação *in vitro* de 30 dias. Esses resultados, tanto na morte celular quanto na sinalização celular avaliada, reforçam o uso do peptídeo A β 25-35 como uma alternativa mais econômica para o desenvolvimento e o estudo de modelos de DA.

Cientistas do mundo inteiro têm juntado esforços por décadas na busca de tratamentos contra a DA, mas o sucesso desse esforço ainda é bastante limitado. Compostos polifenólicos encontrados, particularmente, no suco de uva e no vinho tinto têm demonstrado atividade neuroprotetora em vários modelos animais de neurodegeneração tanto *in vitro* como *in vivo* (SINHA et al., 2002; WANG et al., 2002; RUSSO et al., 2003; MARAMBAUD et al., 2005; ZAMIN et al., 2006; BAUR and SINCLAIR 2007). Dentre estes compostos, o resveratrol pode ser considerado uma das mais promissoras moléculas na neuroproteção contra doenças como DA, DP e isquemia (RUSSO et al., 2003; ANEKONDA, 2006). Dentre as principais propriedades do resveratrol destaca-se a capacidade de interagir com peptídeos e proteínas (RICHARD et al., 2001; VERGE et al., 2002). Tais interações podem ser importantes a nível biológico em geral e particularmente na DA (RIVIÈRE et al., 2007).

Em virtude dos inúmeros benefícios atribuídos ao resveratrol, no Item 4.2 desta dissertação são apresentados alguns resultados de experimentos que visam analisar o efeito do resveratrol sobre a morte celular induzida pelo peptídeo A β 25-35. Como no Item 4.1 nós apresentamos resultados comparando o efeito tóxico dos peptídeos A β 1-42 e A β 25-35 e observamos um perfil muito similar, os dados relatados no Item 4.2 foram obtidos a partir de culturas organotípica de hipocampo de ratos previamente tratadas com resveratrol (25 μ M por 72h) expostas ao peptídeo A β 25-35 (25 μ M). Como observado na Figura 1 do Item 4.2, embora ainda não significativo estatisticamente, o resveratrol parece apresentar efeito neuroprotetor.

Ainda que este estudo esteja em andamento e que os resultados apresentados no Item 4.2 ainda não sejam conclusivos, os mesmos sugerem que o resveratrol possua atividade neuroprotetora contra a lesão induzida pelo peptídeo A β 25-35.

Estes dados estão de acordo com diversos trabalhos que avaliaram o efeito do resveratrol frente a lesão induzida pelo peptídeo A β em outros modelos experimentais (JANG and SURH, 2003; HAN et al., 2004; CHEN et al., 2005; MARAMBAUD et al., 2005). Nessa fase do estudo nós verificamos apenas a morte celular através da incorporação do corante IP, entretanto, seguiremos avaliando as possíveis vias de sinalização que o resveratrol possa estar modulando para proteger as células neurais da lesão induzida pelo peptídeo A β 25-35.

O quadro inflamatório em resposta ao peptídeo A β já está bem descrito na literatura. Além da atividade antiinflamatória característica do resveratrol determinado através da inibição das enzimas Ciclooxygenase 1 e 2 (COX 1 e 2) (KIMURA et al., 1985; SUBBARAMAIAH et al., 1998), sabe-se também que este polifenol pode modular outra via de sinalização envolvida na resposta inflamatória mediada pelo fator de transcrição NF κ B (YEUNG et al., 2004; CHEN et al., 2005). O resveratrol pode ativar sirtuina 1 (SIRT1) a qual deacetila o resíduo serina 310 da subunidade p65 levando a inibição dessa via com conseqüente diminuição da atividade inflamatória mediada pela produção de óxido nítrico (NO) e do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) (YEUNG et al., 2004), promovendo atividade neuroprotetora. O resveratrol, também, pode levar a degradação do A β pelo complexo proteassoma (MARAMBAUD et al, 2005), aumentar a atividade da PKC (HAN et al., 2004) e da via de sobrevivência mediada pela PI3K/Akt (DAS et al., 2005), sendo esta última modulada negativamente pelo peptídeo A β (RYDER et al., 2004; NASSIF et al., 2007).

Os resultados obtidos nesta dissertação somam-se aos de outros grupos que buscam entender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na DA e reforçam a visão de que o fragmento de 11 aminoácidos (A β 25-35), o qual

representa a região ativa do peptídeo A β 1-42, é uma boa ferramenta para o desenvolvimento de modelos experimentais e para o estudo de alterações características da DA. Além disso, embora ainda em andamento, os dados obtidos através do tratamento com resveratrol podem guiar novas linhas de pesquisa que busquem prevenir ou minimizar os efeitos envolvidos em doenças neurodegenerativas como a DA.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que:

- a) A cultura organotípica mantida por longo período de maturação é um bom modelo para estudar a toxicidade e as cascatas de sinalização desencadeadas pelos peptídeos A β 1-42 e A β 25-35;
- b) Os peptídeos A β 1-42 e A β 25-35 exibem perfil similar de toxicidade em cultura organotípica de hipocampo de rato quanto à morte celular e a sinalização desencadeada;
- c) O peptídeo A β 25-35 apresenta características tóxicas semelhantes as do peptídeo A β 1-42, além de ser uma alternativa mais econômica para modelos animais de DA;
- d) Embora experimentos adicionais sejam necessários para confirmar esta observação, o resveratrol parece diminuir a incorporação do iodeto de propídeo frente a lesão induzida pelo peptídeo A β 25-35.

7. PERSPECTIVAS

- Concluir o estudo do efeito neuroprotetor do resveratrol frente a lesão induzida pelo A β 25-35 e avaliar possíveis vias de sinalização moduladas pelo resveratrol;
- Estabelecer um modelo *in vivo* da Doença de Alzheimer através da injeção intracerebroventricular do peptídeo A β 25-35;
- Comparar as alterações morfológicas desencadeadas pelo peptídeo A β 25-35 nos modelos *in vitro* e *in vivo* da DA;
- Avaliar o efeito do resveratrol em uma formulação nanoestruturada na possível prevenção ou no tratamento da DA;
- Avaliar o efeito do resveratrol nanoestruturado sobre parâmetros comportamentais;
- Estudar o envolvimento das vias de sinalização intracelulares mediadas pelo fator de transcrição NF κ B e pela via canônica Wnt/ β -catenina em resposta ao peptídeo A β 25-35 e ao tratamento com resveratrol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, K.M. and TYMIANSKI, M. Mechanisms and effects of intra-cellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. **J Neurosc**, v. 17. p. 3538-3553, 1997.
- ABE, K. and SAITO, H. Amyloid β neurotoxicity not mediated the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat hippocampal and cortical neurons. **Neurosci Lett**, v. 292, p. 1-4, 2000.
- ABE, K.; HISATOMI, R.; MISAWA, M. Amyloid β -peptide specifically promotes phosphorylation and nuclear translocation of the extracellular signal-regulated kinase in cultured rat cortical astrocytes. **J Pharmacol Sci**, v. 93, p. 272-8, 2003.
- AISEN, O.S.; DAVIS, K.L. The search for disease-modifying treatment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 48, p. 35-41, 1997.
- ALZHEIMER, A. Ube reine eijenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allg Z Psychiatr**, v. 64, p. 146-148, 1907.
- ANEKONDA, T.S. and REDDY, P.H. Can plants provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 50, p. 361-376, 2005.
- ANEKONDA, T.S. Resveratrol – A boon for treating Alzheimer's disease? **Brain Res Reviews**, v. 52, p. 316-326, 2006.
- 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**, v. 42, p. 631-639, 1992.

- BALARAMAN, Y.; LIMAYE, A.R.; LEVY, A.I.; SRINIVASAN, S. Glycogen syntase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, p. 1226-1235, 2006.
- BASTIANETTO, S. and QUIRION, R. Natural antioxidants and neurodegenerative diseases. **Front Biosci**, v. 9, p. 3447-3452, 2004.
- BASKYS, A. and ADAMCHIK, Y. Neuroprotective effects of extracellular glutamate are absent in organotypic cultures treated with the amyloid peptide A β (25-35). **Brain Res**, v. 13, p. 188-194, 2001.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature**, v. 5, p. 493-506, 2006.
- BLESA, R. Noncognitive Symptoms and Long-Term Treatment Expectations for Alzheimer Disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v.18, p. S 9-S16, 2004.
- BOSSY-WETZEL, E.; SCHWARZENBACHER, R.; LIPTON, A.S. Molecular pathways to neurodegeneration. **Nature Medicine**, v. 13, p. 52-59, 2004.
- BOYD-KIMBALL, D.; SULTANA, R.; POON, H.F.; LYNN, B.C.; CASAMENTI, F.; PEPEU, G.; KLEIN, J.B.; BUTTERFIELD, D.A. Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid β -peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 2, p. 313-24, 2005.
- BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovasc. Drug Rev**, v. 22, p. 169–188, 2004.
- BRUCE, A.J.; MALFROY, B.; BAUDRY, M. β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a syntetic catalytic free radical scavenger. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 2312-2316, 1996.

- BU, G.; CAM, J.; ZERBINATTI, C. LRP in amyloid- β production and metabolism. **Ann NY Acad Sci**, v. 1086, p. 35-53, 2006.
- CABREJO, L.; GUYANT-MARÉCHAL, L.; LAQUERRIÈRE, A.; VERCELLETTO, M.; DE LA FOUNIÈRE, F.; THOMAS-ANTÉRION, C.; VERNY, C.; LETOURNEL, F.; PASQUIER, F.; VITAL, A.; CHECLER, F.; FREBOURG, T.; CAMPION, D.; HANNEQUIN, D. Phenotype associated with APP duplication in five families. **Brain**, v. 129, p. 2966-2976, 2006.
- 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**, v. 61, p. 134-139, 2000.
- CAO, X.; SUDHOF, T.C. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. **Science**, v. 293, p. 115–120, 2001.
- CARICASOLE, A.; COPANI, A.; CARUSO, A.; CARACI, F.; IACOVELLI, L.; SORTINO, M.A.; TERSTAPPEN, G.C.; NICOLETTI, F. The Wnt pathway, cell-cycle activation and β -amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? **TRENDS in Pharm Sci**, v. 24, p. 233-238, 2003.
- CARRO, E.; TORRES-ALEMAN, I. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. **Eur J Pharm**, v. 490, p. 127-133, 2004.
- CHEN, J.; ZHOU, Y.; MUELLER-STEINER, S.; CHEN, L.F.; KWON, H.; YI, S.; MUCKE, L.; GAN, L. SIRT1 protects against microglia-dependent beta amyloid toxicity through inhibiting NF-kappa B signaling. **J Biol Chem**, v. 280, p. 10364-40374, 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**, v. 281, p. 20315-20325, 2006.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. **Nature Neurosci Sup**, v. 5, p. 1055-1057, 2002.
- CIMAROSTI, H.; ZAMIN, L.L.; FROZZA, R.; NASSIF, M.; HORN, A.P.; TAVARES, A.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . **Neurochem Res**, v. 30, p. 191-199, 2005.
- COTMAN, C.W. and SU, J.H. Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. **Brain Pathol**, v. 6, p. 493-506, 1996.
- DAI, Q.; BORENSTEIN, A.R.; WU, Y.; JACKSON, J.C.; LARSON, E.B. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. **Am J Med**, v. 119, p. 751-759, 2006.
- DARTIGUES, J.F.; ORGOGOZO, J.M.; LETENNEUR, L.; BARBERGER-GATEAU, P. Epidemiologic basis for the treatment of dementia and cognitive impairment in France. **Therapie**, v. 48, p. 185-187, 1993.
- DARTIGUES, J.F.; HELMER, C.; DUBOIS, B.; DUYCKAERTS, C.; LAURENT, B.; PASQUIER, F.; TOUCHON, J. Alzheimer's disease: a public health problem: yes, but a priority? **Rev Neurol**, v. 158, p. 311-315, 2002.
- DAS, S.; TOSAKI, A.; BAGCHI, D.; MAULIK, N.; DAS, D.K. Resveratrol-mediated activation of cAMP response element-binding protein through adenosine A3 receptor by Akt-dependent and independent pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, p. 762-769, 2005.

- DAUCHET, L.; AMOUYEL, P.; DALLONGEVILLE, J. Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. **Neurology**, v. 65, p. 1193–1197, 2005.
- DE FERRARI, G.V.; INESTROSA, N.C. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 33, p. 1-12, 2000.
- DE LA LASTRA, C.A. and VILLEGAS, L. R-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, p. 405-430, 2005.
- DINELEY, K.T.; WESTERMAN, M.; BUI, D.; BELL, K.; ASHE, K.H.; SWEATT, J.D. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: *In vitro* and *in vivo* mechanisms related to Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 15, p. 4125-4133, 2001.
- DOMINGUEZ, D.I.; DE STROOPER, B. Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. **TRENDS in Pharm Sci**, v. 23, p. 324-30, 2002.
- DOROZYNSKI, A. Wine may prevent dementia. **Br Med J**, v. 314, p. 997, 1997.
- FASULO, L.; UGOLINI, G.; CATTANEO, A. Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K. **J Alzheimers dis**, v. 7, p. 3-13, 2005.
- FORMAN, M.S.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M.Y. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine**, v. 10, p. 1055-1063, 2004.

- FREIR, D.B.; COSTELLO, D.A.; HERRON, C.E. A β 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 *in vivo* and *in vitro* is attenuated by verapamil. **J Neurophysiol**, v. 89, p. 3061-3069, 2003.
- FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidante activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sci**, v. 64, p. 2511-2521, 1999.
- GLENNER, G.G. and WONG, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 120, p. 885-890, 1984.
- GOEDERT, M.; WISCHIK, C.M.; CROWTHER, R.A.; WALKER, J.E.; KLUG, A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer's disease: identification as the microtubule-associated protein tau. **Proc Acad Sci USA**, v. 84, p. 4051-4055, 1988.
- GONG, C.-X.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Dysregulation of protein phosphorylation/desphosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. **J Biomed Biotech**, v. 2006, p. 1-11, 2006.
- GOODWIN, J.L.; UEMURA, E.; CUNNICK, J.E. Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of beta-amyloid and IFN-gamma. **Brain Res**, v. 692, p. 207-214, 1995.
- GUARENTE, L.; PICARD, F. Calorie restriction — the SIR2 connection. **Cell**, v. 120, p. 473–482, 2005.
- GUNN-MOORE, F.J. and TAVARÉ, J.M. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by serum withdrawal, glutamate or β -amyloid, is independent of Jun kinase or p38 mitogen activated protein kinase activation. **Neurosci Lett**, v. 250, p. 53-56, 1998.

- GUO, Q.; FU, W.; SOPHER, B.L.; MILLER M.W.; WARE, C.M.; MARTIN, G.M.; MATTSON, M.P. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. **Nature Med**, v. 5, p. 101-106, 1999.
- GYURE, K.A.; DURHAM, R.; STEWART, W.F.; SMIALEK, J.E.; TRONCOSO, J.C. Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. **Arch Pathol Lab Med**, v. 125, p. 489-492, 2001.
- HAASS, C.; LEMERE, C.A.; CAPELL, A.; CITRON, M.; SEUBERT, P.; SCHENK, D.; LANNFELT, L.; SELKOE, D.J. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. **Nature Med**, v. 1, p. 1291-1296, 1995.
- HAASS, C.; SCHLOSSMANCHER, M.G.; HUNG, A.Y.; VIGO-PELFREY, C.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B.L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E.H.; SCHENCK, D.; TEPLow, D.B.; SELKOE, D.J. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, v. 359, p. 322-325, 1992.
- HAASS, C.; KAHLE, P.J. Parkinson's pathology in a fly. **Nature**, v. 404, p. 341- 43, 2000.
- HAASS, C. and SELKOE, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. **Nature**, v. 8, p. 101-112, 2007.
- HAMDANE, M.; DELOBEL, P.; SAMBO, A.V.; SMET, C.; BÉGAR, S.; VIOLLEAU A.; LANDRIEU, I.; DELACOURTE, A.; LIPPENS, G.; FLAMENT, S.; BUÉE, L. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1619-25, 2003.
- HAN, Y.-S.; ZHENG, W.-H.; BASTIANETTO, S.; CHABOT, J.-G.; QUIRION ,R. Neuroprotective effects of resveratrol against β -amyloid-induced neurotoxicity in

- rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. **British J Pharm**, v. 141, p. 997-1005, 2004.
- HASHIOKA, S.; MONJI, A.; UEDA, T.; KANBA, S.; NAKANISHI, H. Amyloid- β fibril formation is not necessarily required for microglial activation by the peptides. **Neurochem Int**, v. 47, p. 369-376, 2005.
- HASSEN, G.W.; TIAN, D.; DING, D.; BERGOLD, P.J. A new model of ischemic preconditioning using young adult hippocampal slice cultures. **Brain Res Prot**, v. 13, p. 135-143, 2004.
- HELMES, E.; OSTBYE, T. Beyond memory impairment Cognitive changes in Alzheimer's disease. **Arch of Clinical Neuropsychology**, v.17, p. 179–193, 2002.
- HERVAS-AGUILAR, A.; PUEBLA-JIMENEZ, L.; BURGOS-RAMOS, E.; AGUADOLLERA, D.; ARILLA-FERREIRO, E. Effects of single and continuous administration of amyloid β -peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex. **Neuroscience**, v. 135, p. 181-90, 2005.
- HOLOPAINEN IE. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. **Neurochem Res**, v. 30, p. 1521-1528, 2005.
- HORN, A.P.; GERHARDT, D.; GEYER, A.B.; VALENTIM, L.; CIMAROSTI, H.; TAVARES, A.; HORN, F.; LENZ, G.; SALBEGO, C. Cellular death in hippocampus in response to PI-3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. **Neurochem Res**, v. 30, p. 355-361, 2005.

- HOWELL, S.; NALBANTOGLU, J.; CRINE, P. Neutral endopeptidase can hydrolyse β -amyloid (1-40) but shows no effect on β -amyloid precursor protein metabolism. **Peptides**, v. 16, p. 647-652, 1995.
- HOWES, M.J. and HOUGHTON, P.J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, 513-527, 2003.
- HOWES, M.J.; PERRY, N.S.; HOUGHTON, P.J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. **Phytother Res**, v. 17, p. 1-18, 2003.
- HOWITZ, K.T.; BITTERMAN, K.J.; COHEN, H.Y.; LAMMING, D.W.; LAVU, S.; WOOD, J.G.; ZIPKIN, R.E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, a.; ZHANG, L.L.; SCHERER, B.; SINCLAIR, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191–196, 2003.
- HSIA, A.Y.; MASLIAH, E.; MCCONLOGUE, L.; YU, G.Q.; TATSUNO, G.; HU, K.; KHOLODENKO, D.; MALENKA, R.C.; NICOLL, R.A.; MUCKE, L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 3228-3233, 1999.
- HU, J.; VAN ELDIK, L.J. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance β amyloid-induced glial activation. **Brain Res**, v. 18, p. 46-54, 1999.
- HÜLL, M.; MUKSCH, B.; AKUNDI, R.S.; WASCHBISCH, A.; HOOZEMANS, J.J.; VEERHUIS, R.; FIEBICH, B.L. Amyloid beta peptide (25–35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. **Neurochem Int**, v. 48, p. 663–672, 2006.

- IHARA, Y.; NUKINA, N.; MIURA, R.; OGAWARA, M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. **J Biochem (Tokyo)**, v. 99, p. 1807-1810, 1986.
- INESTROSA, N.C.; DE FERRARI, G.V.; GARRIDO, J.L.; ALVAREZ, A.; OLIVARES, G.H.; BARRÍA, M.I.; BRONFMAN, M.; CHACÓN, M.A. Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration. **Neurochem Int**, v. 41, p. 341-344, 2002.
- INESTROSA, N.C.; GODOY, J.A.; QUINTANILLA, R.A.; KOENIG, C.S.; BRONFMAN, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents β -amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. **Exp Cell Res**, v. 304, p. 91-104, 2005.
- ISHIGE, K.; TAKAGI, N.; IMAI, T.; RAUSCH, W.D.; KOSUGE, Y.; KIHARA, T.; KUSAMA-EGUCHI, K.; IKEDA, H.; COOLS, A.R.; WADDINGTON, J.L.; KOSHIKAWA, N.; ITO, Y. Role of Caspase-12 in Amyloid β -Peptide-Induced Toxicity in Organotypic Hippocampal Slices Cultured for Long Periods. **J Pharmacol Sci**, v. 104, p. 46-55, 2007.
- ITO, Y.; ITO, M.; TAKAGI, N.; SAITO, H.; ISHIGE, K. Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptides and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cystine, a garlic compound. **Brain Res**, v. 985, p. 98-107, 2003.
- IVERSEN, L.L.; MORTISHIRE-SMITH, R.J.; POLLACK, S.J.; SHEARMAN, M.S. The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. **Biochem. J**, v. 311, p. 1-16, 1995.

- IWATA, N.; TSUBUKI, S.; TAKAKI, Y.; SHIROTANI, K.; LU, B.; GERARD, N.P.; GERARD, C.; HAMA, E.; LEE, H.J.; SAIDO, T.C. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. **Science**, v. 292, p. 1550-1552, 2001.
- IWATA, N.; HIGUCHI, M.; SAIDO, T.C. Metabolism of amyloid β -protein and Alzheimer's disease. **Pharmacol Therap**, v. 108, p. 129-148, 2005.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218–220, 1997.
- JANG, J.H. and SURH, Y.J. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free Radical Biol Med**, v. 34, p. 1100-1110, 2003.
- JANG, J.H. and SURH, Y.J. AP-1 mediates β -amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, p. 1421-8, 2005 a.
- JANG, J.-H. and SURH, Y.-J. β -Amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase – NF- κ B signaling pathway. **Free Rad Biol & Med**, v. 38, p. 1604-1613, 2005 b.
- JANKOWSKY, J.L.; FADALE, D.J.; ANDERSON, J.; XU, G.M.; GONZALES, V.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G.; LEE, M.K.; YOUNKIN, L.H.; WAGNER, S.L.; YOUNKIN, S.G.; BORCHELT, D.R. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ -secretase. **Hum Mol Genet**, v. 13, 159-170, 2004.
- JARRETT, J.T.; BERGER, E.P.; LANSBURY, P.T.Jr. The carboxy terminus of the β -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for

- the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, p. 4693-4697, 1993.
- JIN, Y.; YAN, E.; FAN, Y.; ZONG, Z.; QI, Z.; LI, Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. **Acta Pharmacol Sin**, v. 8, p. 943-951, 2005.
- JORDAN, J.; GALINDO, M.F.; MILLER, R.J. Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. **J Neurochem**, v. 68, p. 1612-1621, 1997.
- 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**, v. 325, p. 733-736, 1987.
- KAWARABAYASHI, T.; SHOJI, M.; YOUNKIN, L.H.; WEN-LANG, L.; DICKSON, D.W.; MURAKAMI, T.; MATSUBARA, E.; ABE, K.; ASHE, K.H.; YOUNKIN, S.G. Dimeric amyloid β protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 24, p. 3801-3809, 2004.
- KERR, F.; RICKLE, A.; NAYEEM, N.; BRANDNER, S.; COWBURN, R.F.; LOVESTONE, S. PTEN, a negative regulator of PI3 kinase signalling, alters tau phosphorylation in cells by mechanisms independent of GSK-3. **FEBS Lett**, v. 580, p. 3121-3128, 2006.
- KIM, S.I.; YI, J.S.; KO, Y.G. Amyloid β oligomerization is induced by brain lipid rafts. **J Cell Biochem**, v. 99, p. 878-889, 2006.

- KIMBERLY, W.T.; ZHENG, J.B.; GUENETTE, S.Y.; SELKOE, D.J. The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. **J Biol Chem**, v. 276, p. 40288–40292, 2001.
- KIMBERLY, W.T.; LAVOIE, M.J.; OSTASZEWSKI, B.L.; YE, W.; WOLFE, M.S.; SELKOE, D.J. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 6382-6387, 2003.
- KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S. Effects of stilbene on arachinodate metabolism in leukocytes. **Biochem Biophys Acta**, v. 834, p. 275-278, 1985.
- KLEGERIS, A.; WLAKER, D.G.; MCGEER, P.L. Activation of macrophages by Alzheimer beta-amyloid peptide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 199, p. 984-991, 1994.
- KLEIN, W.L.; KRAFFT, C.A.; FINCH, C.E. Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? **TRENDS in Neurisci**, v. 24, p. 219-224, 2001.
- KLINGE, C.M.; BLANKENSHIP, K.A.; RISINGER, K.E.; BHATNAGAR, S.; NOISIN, E.L.; SUMANASEKERA, W.K.; ZHAO, L.; BREY, D.M.; KEYTON, R.S. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptor α and β in endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 280, p. 7460-7468, 2005.
- KOO, E.H.; KOPAN, R. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. **Nature Medicine**, v. , p. 526-533, 2004.
- KOSIK, K.S.; JOACHIM, C.L.; SELKOE, D.J. Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. **Proc Acad Sci USA**, v. 83, p. 1044-1048, 1986.

- KOSUGE, Y.; SAKIKUBO, T.; ISHIGE, K.; ITO, Y. Comparative study of endoplasmatic reticulum stress-induced neuronal death in rat cultured hippocampal and cerebellar granule neurons. **Neurochem Int**, v. 49, p. 285-293, 2006.
- KUBO, T.; NISHIMURA, S.; KUMAGAE, Y.; KANEKO, I. In *vivo* conversion of Racemized β -Amyloid([D-Ser26]A₁₋₄₀) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A_{25-35/40}) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. **J Neurosci Res**, v. 70, p. 474-483, 2002.
- KUROCHKIN, I.V.; GOTO, S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and its degraded by insulin degrading enzyme. **FEBS Lett**, v. 345, p. 33-37, 1994.
- LAFERLA, F.M.; GREEN, K.N.; ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nature Neurosci**, v. 8, p. 499-509, 2007.
- LAMBERT, M.P.; BARLOW, A.K.; CHROMY, B.A.; EDWARDS, C.; FREED, R.; LIOSATOS, M.; MORGAN, T.E.; ROZOVSKY, I.; TROMMER, B.; VIOLA, K.L.; WALS, P.; ZHANG, C.; FINCH, C.E.; KRAFFT, G.A.; KLEIN, W.L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 6448-6453, 1998.
- LAU, F.C.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 128-132, 2005.
- LEE, J.N.; ZIPFEL, G.J.; CHOI, D.W. The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. **Nature**, v. 399, p. A7-A14, 1999.
- LEE, B.Y.; BAN, J.Y.; SEONG, Y.H. Chronic stimulation of GABA_A receptor with muscimol reduces amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. **Neurosci Res**, v. 52, p. 347-56, 2005.

- LEIFER, B.P. Early diagnosis of Alzheimer's disease: clinical and economic benefits. **J Am Geriatr Soc**, v. 51, p. S281-8, 2003.
- LEUTGEB, J.K.; FREY, J.U.; BEHNISCH, T. LTP in cultured hippocampal-entorhinal cortex slices from young adult (P25-30) rats. **J Neurosci Meth**, v. 130, p. 19-32, 2003.
- 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**, v. 20, p. 9356-9363, 2000.
- LI, L.; SENGUPTA, A.; HAQUE, N.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. **FEBS Lett**, v. 566, p. 261-269, 2004.
- LIU, M.L.; HONG, S.T. Early phase of amyloid β 42-induced cytotoxicity in neuronal cells is associated with vacuole formation and enhancement of exocytosis. **Exp Mol Med**, v. 31, p. 559-66, 2005.
- LOO, D.T.; COPANI, A.; PIKE, C.J.; WHITTEMORE, E.R.; WALENCEWICZ, A.J.; COTMAN, C.W. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 7951-7955, 1993.
- LOVESTONE, S. Can we afford to develop treatments for dementia? **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 72, p. 685, 2002.
- LU, X.H.; BRADLEY, R.J.; DWYER, D.S. Olanzapine produces trophic effects *in vitro* and stimulates phosphorylation of Akt/PKB, ERK1/2, and the mitogen-activated protein kinase p38. **Brain**, v. 1011, p 58-68, 2004.
- LUE, L.F.; KUO, Y.M.; ROHER, A.E.; BRACHOVA, L.; SHEN, Y.; SUE, L.; BEACH, T.; KURTH, J.H.; RYDEL, R.E.; ROGERS, J. Soluble amyloid beta peptide

concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 155, p. 853-862, 1999.

MANDELKOW, E.M.; STAMER, K.; VOGEL, R.; THIES, E.; MANDELKOW, E.
Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. **Neurobiol of Aging**, v. 24, p. 1079-1085, 2003.

MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **J Biol Chem**, v. 280, p. 37377-37382, 2005.

MARTÍN, D.; SALINAS, M.; LOPEZ-VALDALISO, R.; SERRANO, E.; RECUERO, M.; CUADRADO, A. Effect of the Alzheimer amyloid fragment A β (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. **J Neurochem**, v. 78, p. 1000-1008, 2001.

MARTINS, I.J.; HONE, E.; FOSTER, J.K.; SÜNRAM-LEA, S.I.; GNJEC, A.; FULLER, S.J.; NOLAN, D.; GANDY, S.E.; MARTINS, R.N. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. **Mol Psychiatry**, v. 11, p. 721-736, 2006.

MASTERS, C.L.; SIMMS, G.; WEINMAN, N.A.; MULTHAUP, G.; MCDONALD, B.L.; BEYREUTHER, K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down Syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 4245-4249, 1985.

MATSUZAKI, K.; NOUGUCH, T.; WKABAYAYASHI, M.; IKEDA, K.; OHASHI, Y.; HOSHINO, M.; NAIKI, H. Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, p. 122-130, 2007.

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

- MATTSON, M.P.; CAMANDOLA, S. NF κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **J Clin Invest**, v. 107, p. 247-254, 2001.
- MATTSON, M.P.; CHAN, S.L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. **Cell Calcium**, v. 34, p. 385-97, 2003.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.
- MEDA, L.; CASSATELLA, M.A.; SZENDREI, G.I.; OTVOS, L.; BARON, P.; VILLALBA, M.; FERRARI, D.; ROSSI, F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. **Nature**, v. 374, p. 647-650, 1995.
- MEDEIROS, R.; PREDIGER, R.D.S.; PASSOS, G.F.; PANDOLFO, P.; DUARTE, F.S.; FRANCO, J.L.; DAFRE, A.L.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C.P.; TAKAHASHI, R.N.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's Disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid β protein. **J Neurosci**, v.27, p. 5394-5404, 2007.
- MILOSO, M.; BERTELLI, A.A.; NICOLINI, G.; TREDICI, G. Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neurosci Lett**, v.264, p. 141-144, 1999.
- MINOGUE, A.M.; SCHMID, A.W.; FOGARTY, M.P.; MOORE, A.C.; CAMPBELL, V.A.; HERRON, C.E.; LYNCH, M.A. Activation of the c-Jun N-terminal kinase signaling cascade mediates the effect of amyloid- β on long term potentiation and cell death in hippocampus: a role for interleukin-1 β ? **J Biol Chem**, v. 30, p. 27971-80, 2003.

- MISITI, F.; SAMPAOLESE, B.; PEZZOTTI, M.; MARINI, S.; COLETTA, M.; CECCARELLI, L.; GIARDINA, B.; CLEMENTI, M.E. A β (31-35) peptide induce apoptosis in PC 12 cells: contrast with A β (25-35) peptide and examination of underlying mechanisms. **Neurochem Int**, v. 46, p. 575-583, 2005.
- MONNERIE, H.; ESQUENAZI, S.; SHASHIDHARA, S.; LE ROUX P.D. β -amyloid-induced reactive astrocytes display altered ability to support dendrite and axon growth from mouse cerebral cortical neurons in vitro. **Neurol Res**, v. 27, p. 525-32, 2005.
- MOON, R.T.; KOHN, A.D.; DE FERRARI, G.V.; KAYKAS, A. Wnt and β -catenin signalling: diseases and therapies. **Nature Genetics**, v. 5, p. 689-699, 2004.
- MORI, C.; SPOONER, E.T.; WISNIEWSKI, K.E.; WISNIEWSKI, T.M.; YAMAGUCHI, H.; TOLAN, D.R.; SELKOE, D.J.; LEMERE, C.A. Intraneuronal A β 42 accumulation in Down syndrome brain. **Amyloid**, v. 9, p. 88-102, 2002.
- MOVSESYAN, V.A.; STOICA, B.A.; FADEN, A.I. MGLuR5 activation reduces β -amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor. **J Neurochem**, v. 89, p. 528-36, 2004.
- NAKAI, M.; HOJO, K.; YAGI, K.; SAITO, N.; TANIGUCHI, T.; TERASHIMA, A.; KAWAMATA, T.; HASHIMOTO, T.; MAEDA, K.; GSCHWENDT, M.; YAMAMOTO, H.; MIYAMOTO, E.; TANAKA, C. Amyloid β protein (25-35) phosphorylates MARCKS through tyrosine kinase-activated protein kinase C signaling pathway in microglia. **J Neurochem**, v. 72, p. 1179-86, 1999.
- 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**, v. 50, p. 229-235, 2007.

NILSBERTH, C.; WESTLIND-DANIELSSON, A.; ECKMAN, C.B.; CONDRON, M.M.; AXELMAN, K.; FORSELL, C.; STENH, C.; LUTHMANN, J.; TEFLOW, D.B.; YOUNKIN, S.G.; NÄSLUND, J.; LANNFELT, L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. **Nature Neurosci**, v. 4, p. 887-983, 2001.

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

OLARIU, A.; TRAN, M.H.; YAMADA, K.; MIZUNO, M.; HEFCO, V.; NABESHIMA, T. Memory deficits and increase emotionality induced β -amyloid (25–35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. **J Neural Transm**, v.108, p. 1065–1079, 2001.

ORGOGOZO, J.M.; DARTIGUES, J.F.; LAFONT, S.; LETENNEUR, L.; COMMENGES, D.; SALOMON, R.; RENAUD, S.; BRETELER, M.B. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. **Revue Neurologique**, v. 153, 185–192, 1997.

PALMER, A.M. Neurochemical Studies of Alzheimer's Disease. **Neurodegeneration**, v. 5, p. 381-91, 1996.

PAN, T.; JANKOVIC, J.; LE, W. Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. **Drugs Aging**, v. 20, p. 711–721, 2003.

- PAPUCCI, L.; FORMIGLI, L.; SCHIAVONE, N.; TANI, A.; DONNINI, M.; LAPUCCI, A.; PERNA, F.; TEMPESTINI, A.; WITORT, E.; MORGANTI, M.; NOSI, D.; ORLANDINI, G.E.; ORLANDINI, S.Z.; CAPACCIOLI, S. Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. **Cell Tissue Res**, v. 316, p. 197-209, 2004.
- PARIHAR, M.S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **J Clinical Neurosci**, v. 5, p. 456-467, 2004.
- PATEL, D. and GOOD, T. A rapid method to measure beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro. **J Neurosci Methods**, v. 161, p. 1-10, 2007.
- PAULSEN, J.S.; READY, R.E.; STOUT, J.C.; SALMON, D.P.; THAL, L.J.; GRANT, I.; JESTE, D.V. Neurobehaviors and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. **J Inter Neuropsych Society**, v. 6, p. 815-820, 2000.
- PERVAIZ, S. Resveratrol: from grapes to mammalian biology. **FASEB J**, v. 17, p. 1975-1985, 2003.
- 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**, v. 422, p. 435-439, 2003.
- PIKE, C.J.; WALENCEWICZ-WASSERMAN, A.J.; KOSMOSKI, J.; CRIBBS, D.H.; GLABE, C.G.; COTMAN, C.W. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. **J Neurochem**, v. 64, p. 253-265, 1995.
- PREDIGER, R.D.S.; FRANCO, J.L.; PANDOLFO, P.; MEDEIROS, R.; DUARTE, F.S.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C.P.; FARINA, M.; CALIXTO, J.B.; TAKAHASHI, R.N.; DAFRE, A.L. Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: evidence for a

dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response.

Behav Brain Res, v.177, p. 205-213, 2007.

PRINGLE, A.K.; ANGUNAWELA, R.; WILDE, G.J.C.; MEPHAM, J.A.; SUNDSTROM, L.E.; IANNOTTI, F. Induction of 72 KDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 23, p. 289-298, 1997.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R.E.; KOVACS, D.M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. **Nature Neurosci**, v. 4, p. 345-351, 2003.

QUINTANILLA, R.A.; MUNOZ, F.J.; METCALFE, M.J.; HITSCHFELD, M.; OLIVARES, G.; GODOY, J.A.; INESTROSA, N.C. Trolox and 17 β -estradiol protect against amyloid β -peptide neurotoxicity by a mechanism that involves modulation of the Wnt signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 25, p. 11615-25, 2005.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523–1526, 1992.

RICHARD, J. L. Coronary risk factors. The French paradox. **Arch Ma Coeur Vaiss**, v. 80, p. 17–21, 1987.

RICHARD, T.; VERGÉ, S.; BERKE, B.; VERCAUTEREN, J.; MONTI, JP. NMR and simulated annealing investigations of bradykinin in presence of polyphenols. **J Biomol struct dyn**, v. 18, 627, 2001.

RISSMAN, R.A.; POON, W.W.; BLURTON-JONES, M.; ODDO, S.; TORP, R.; VITEK, M.P.; LAFERLA, F.M.; ROHN, T.T.; COTMAN, C.W. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. **J Clin Investig**, v. 14, p. 121-130, 2004.

- RIVIÈRE, C.; RICHARD, T.; QUENTIN, L.; KRISA, S.; MÉRILLON, J.M.; MONTI, J.P.
Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*.
Bioorganic & Med Chem, v. 15, p. 1160-1167, 2007.
- RODRIGUEZ, G.; DE LEO, C.; GIRTLER, N.; VITALI, P.; GROSSI, E. AND NOBILI,
F. Psychological and social aspects in management of Alzheimer's patients: an
inquiry among caregivers. **Neurol Sci**, v. 24, p. 329–335, 2003.
- RODRIGUEZ-KERN, A.; GEGELASHVILI, M.; SCHOUSBOE, A.; ZHANG, J.; SUNG,
L.; GEGELASHVILI, G. Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor,
BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via
different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB.
Neurochem Int, v. 43, p. 363-370, 2003.
- ROVELET-LECRUX, A.; HANNEQUIN, D.; RAUX, G.; LE MEUR, N.;
LAQUERRIÈRE, A.; VITAL, A.; DUNANCHIN, C.; FEUILLETTE, S.; BRICE, A.;
VERCELLETTO, M.; DUBAS, F.; FREBOURG, T.; CAMPION, D. APP locus
duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer's disease with
cerebral amyloid angiopathy. **Nature Genet**, v. 38, p. 24-26, 2006.
- RUSSO, A.; PALUMBO, M.; ALIANO, A.; LEMPEREUR, L.; SCOTO, G.; RENIS, M.
Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult.
Life Sci, v. 72, p. 2369-2379, 2003.
- 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**, v. 16, p. 187-200, 2004.
- SABO, S.L.; IKIN, A.F.; BUXBAUM, J.D.; GREGGARD, P. The Alzheimer amyloid
precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell
movement. **J Cell Biol**, v. 153, p. 1403-1414, 2001.

- SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHIMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P.
Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen syntase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem**, v. 96, p. 1005-1015, 2006.
- SCHWAM, E.M.; ABU-SHAKRA, S.; DEL VALLE, M.; TOWNSEND, R.J.; CARRILLO, M.C.; FILLIT, H. Health economics and the value of therapy in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 143-151, 2007.
- SELKOE, D.J. Amyloid beta-protein and genetics of Alzheimer's disease. **Biol Chem**, v. 271, p. 18295-18298, 1996.
- SELKOE, D.J. Alzheimer's Disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Reviews**, v. 81, p. 741-766, 2001.
- SELKOE, D.J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 1054-1061, 2004.
- SHARMA, M. and GUPTA, Y.K. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Life Sci**, v. 71, p. 2489-2498, 2002.
- SHOJI, M.; GOLDE, T.E.; 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**, v. 258, p. 126-129, 1992.
- SINCLAIR, D.A. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. **Mech Ageing Dev**, v. 126, p. 987-1002, 2005.
- SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sci**, v. 71, p. 655-665, 2002.

- 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, p. 1051-1058, 2005.
- SOLEAS, G.J.; DIAMANDES, E.P.; GOLDEBERG, D.M. Resveratrol: a molecule
whose time has come? And gone? **Clin Biochem**, v. 30, p. 91-113, 1997.
- STADELMANN, C.; DECKWERTH, T.L.; SRINIVASAN, A.; BANCHER, C.; BRÜCK,
W.; JELLINGER, K.; LASSMANN, H. Activation of caspase-3 in single neurons
and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's
disease. Evidence for apoptotic cell death. **Am J Pathol**, v. 155, p. 1459-1466,
1999.
- STEPANICHEV, M.Y.; ZDOBNOVA, I.M.; ZARUBENKO, I.I.; LAZAREVA, N.A.;
GULYAEVA, N.V. Studies of the effects of central administration of β -amyloid
peptide (25-35): pathomorphological changes in the hippocampus and
impairment of spatial memory. **Neurosci Behav Physiol**, v. 36, p. 101-6, 2006.
- STOPPINI, L.; BUCHS, P.A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures
of nervous tissue. **J Neurosc Method**, v. 37, p. 173-182, 1991.
- SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W.J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.;
INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J.M.; DANNEN-BERG, A.J. Resveratrol
inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated
human mammary epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 273, p. 21875-21882, 1998.
- TAKAHASHI-YANAGA, F. AND SASAGURI, T. The Wnt/ β -Catenin signaling
pathway as a target in drug discovery. **J Pharmacol Sci**, v. 104, p. 293-302,
2007.

- TAKAKI, Y.; IWATA, N.; TSUBUKI, S.; TANIGUCHI, S.; TOYOSHIMA, S.; LU, B.; GERARD, N.P.; LEE, H.J.; SHIROTANI, K.; SAIDO, T.C. Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid β -peptide in the brain. **J Biochem (Tokyo)**, v. 128, p. 897-902, 2000.
- TAMAGNO, E.; PAROLA, M.; GUGLIELMOTTO, M.; SANTORO, G.; BARDINI, P.; MARRA, L.; TABATON, M.; DANNI, O. Multiple signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 35, p. 45-58, 2003.
- TOHDA, C.; TAMURA, T.; KONATSU, K. Repair of amyloid beta (25–35)-induced memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to. **Brain Res**, v.990, p.141-147, 2003.
- TONG, L.; BALAZS, R.; THORNTON, P.L.; COTMAN, C.W. B-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. **J Neurosci**, v. 24, p. 6799-6809, 2004.
- TROY, C.M.; RABACCHI, S.A.; FRIEDMAN, W.J.; FRAPPIER, T.F.; BROWN, K.; SHELANSKI, L.A. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. **J Neurosci**, v. 20, p. 1386-1392, 2000.
- VALENTIM, L.M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A.B.; HORN, A.P.; TAVARES, A.A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C.G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neurosci**, v. 118, p. 379-386, 2003.

- VALENZANO, D.R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A.; DOMENICI, L.; CELLERINO, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a shortlived vertebrate. **Curr Biol**, v.16, p. 296–300, 2006.
- VAUDRY, D.; COTTET-ROUSSELLE, C.; BASILLE, M.; FALLUEL-MOREL, A.; FOURNIER, A.; VAUDRY, H.; GONZALEZ, B.J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits caspase-3 activity but does not protect cerebellar granule neurons against A β (25-35)-induced apoptosis. **Regul Pept**, v. 123, p. 43-9, 2004.
- VERGE, S.; RICHARD, T.; MOREAU, S.; NURICH, A.; MERILLON, J.M.; VERCAUTEREN, J.; MONTI, J.P. First observation of solution structures of bradykinin-penta-O-galloyl-D-glucopyranose complexes as determined by NMR and simulated annealing. **Biochem Biophys Acta**, v. 1571, p. 89, 2002.
- VINCENT, V.A.; SELWOOD, S.P.; MURPHY, G.M. JR. Proinflammatory effects of M-CSF and A β in hippocampal organotypic cultures. **Neurobiol Aging**, v. 23, p. 349-62, 2002.
- WAKABAYASHI, M.; OKADA, T.; KOZUTSUMI, Y.; MATSUZAKI, K. GM1 ganglioside-mediated accumulation of β -protein on cell membranes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 328, p. 1019-1023, 2005.
- WANG, H.Y.; LEE, D.H.; D'ANDREA, M.R.; PETERSON, P.A.; SHANK, R.P.; REITZ, A.B. Beta-amyloid 1-42 binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. **J Biol Chem**, v. 275, p. 5626-5632, 2000.
- WANG, Q.; XU, J.; ROTTINGHAUS, G.E.; SIMONYI, A.; LUBAHN, D.; SUN, G.Y.; SUN, A.Y. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. **Brain Res**, v. 958, p. 439–447, 2002.

- WEINREB, O.; MANDEL, S.; AMIT, T.; YODIM, M.B. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem**, v. 15, 506–516, 2004.
- WIMO, A.; JONSSON, L.; WINBLAD, B. An estimative of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 81-91, 2007.
- WU, S.Z.; BODLES, A.M.; PORTER, M.M.; GRIFFIN, W.S.; BASILE, A.S.; BARGER, S.W. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid β -peptide. **J Neuroinflammation**, v. 20, p. 2, 2004.
- XIANG, Z.; HRABETOVA, S.; MOSKOWITZ, S.I.; CASACCIA-BONNFIL, P.; YOUNG, S.R.; NIMMICH, V.C.; TIEDGE, H.; EINHERBERT, S.; KARNUP, S.; BIANCHI, R.; BERGOLD, P.J. Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. **J Neurosci Meth**, v. 98, p. 145-154, 2000.
- XIANG, Z.; HO, L.; VALDELLON, J.; BORCHELT, D.; KELLEY, K.; SPIELMAN, L.; AISEN, P.S.; PASINETTI, G.A. Cyclooxygenase (COX)-2 and cycle activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease neuropathology. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 327-34, 2002.
- YAMADA, T.; MIYASAKI, K.; KOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, M.; AKATSU, H.; YAMAMOTO, T. Selective localization of gelatinase A, an enzyme degrading β -amyloid protein, in white matter microglia and Schwann cells. **Acta Neuropathol**, v. 89, p. 199-203, 1995.
- YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. **Pharmacol Ther**, v. 88, p. 93-113, 2000.
- YAN, S.D.; CHEN, X.; FU, J.; ZHU, H.; ROHER, A.; SLATTERY, T.; ZHAO, L.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; MIGHELI, A.; NAWROTH, P.; STERN, D.;

- SCHIMIDT, A.M. RAGE and Amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 382, p. 685-691, 1996.
- YANKNER, B.A.; DAWES, L.R.; FISHER, S.; VILLA-KOMAROFF, L.; OSTERGRANITE, M.L.; NEVE, R.L. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. **Science**, v. 245, p. 417-420, 1989.
- YANKNER, B.A.; DUFFY, L.K.; KIRSCHNER, D.A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid p protein: reversal by tachykinin neuropeptides. **Science**, v. 250, p. 279-282, 1990.
- YEUNG, F.; HOBERG, J.E.; RAMSEY, C.S.; KELLER, M.D.; JONES, D.R.; FRYE, R.A.; MAYO, M.W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. **EMBO J**, v. 23, p. 2369-2380, 2004.
- YOUNKIN, S.G. The role of A β 42 in Alzheimer's disease. **J Physiol Paris**, v. 92, p. 289-292, 1998.
- YUAN, J., YANKER, A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, p. 802-809, 2000.
- ZAMIN, L.L.; DILLENBURG-PILLA, P.; ARGENTA-COMIRAN, R.; HORN A.P.; SIMÃO, F.; NASSIF, M.; GERHARDT, D.; FROZZA, R.L.; SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. **Neurobiol dis**, v. 24, p. 170-182, 2006.
- ZENG, C.; LEE, J.T.; CHEN, H.; CHEN, S.; HSU, C.Y.; XU, J. Amyloid- β peptide enhances tumor necrosis factor- α -induced iNOS through neutral sphingomyelinase/ceramide pathway in oligodendrocytes. **J Neurochem**, v. 94, p. 703-712, 2005.

9. ANEXOS

Normas do Periódico *Journal of Neuroscience Methods*, onde o artigo científico foi submetido

<http://www.elsevier.com/locate/jneumeth>

JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS

Guide for Authors

SUBMISSION POLICY

Manuscripts should be addressed to one of the Editors-in-Chief. Submission of a paper to *Journal of Neuroscience Methods Research* is understood to imply that it has not previously been published (except in abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. Authors are invited to provide the Editors-in-Chief with the names (and addresses) of five potential reviewers whom they feel are especially qualified in the subject area of the manuscript.

Submission Procedure

1. Web Submission

Web submission is preferred. From 7 December 2004 papers for publication should be submitted online using the following guidelines. Visit the submission page of this journal at <http://ees.elsevier.com/jneumeth>, where you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files, text, tables and illustrations. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be by e-mail. If online submission is not possible, manuscripts may be submitted as per the instructions below.

2. Hard Copy Submission

In the case of hard copy submission three copies of the manuscript, written in English, should be submitted to one of the Editors-in-Chief. The manuscripts should be typed, double-spaced, with at least a 4 cm margin of uniform size, and accompanied by a list of 6-8 keywords and a summary of about 200 words on a separate page. Words to be printed in 'italics' should be underlined. The length of articles should be restricted to 10 printed pages; i.e., approximately 18 manuscript pages. Included also should be a set of the electronic files of the manuscript on

floppy-disk, Zip-disk or CD-ROM. For preparation of electronic files, see the instructions herein below.

Electronic manuscripts. Your disk and exactly matching printed version (as a printout) should be submitted together to the accepting Editor.

It is important that the file on disk and the printout are identical. Please specify the type of computer and word processing package used (do not convert your text file to plain ASCII). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g. α , @, #, etc., for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a 'justified' lay-out. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Tables will be handled conventionally. Illustrations should be submitted as original drawings or glossy prints. Further information may be obtained from the Publisher.

Preparation of Supplementary Material

Journal of Neuroscience Methods now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Corporate Website at <http://www.elsevier.com/authors>.

Files can be stored on 3½ inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). This journal offers electronic submission services and supplementary data files can be uploaded via the web page of this journal via <http://ees.elsevier.com/jneumeth>.

ORGANIZATION OF THE ARTICLE

As a rule, Full Length Reports and Review Articles should be divided into sections headed by a caption (Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figures and Legends). Acknowledgements for personal and technical assistance should follow the Discussion section. Financial support should be indicated in the Acknowledgements. The preferred medium of final submission to the accepting Editor is on disk with the accompanying reviewed and revised manuscript.

Title page. The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all

authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding author (as well as telephone number, facsimile number and E-mail address.)

Abstract. This should provide a concise description of the purpose of the report or review article and should not exceed 200 words. The abstract should include a maximum of 8 keywords, which reflect the entries the author(s) would like to see in an index.

Authors' full names, academic or professional affiliations, and complete addresses should be included on a separate title page. The name and address plus telephone and fax numbers as well as e-mail address of the author to whom proofs and correspondence are to be sent should be given.

Literature references.

References in the text should start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. Jones (1970) has shown the importance of. . ., or . . . has been described (Jones, 1970; Brown and Jones, 1971; Chin et al., 1972). . .; using date order. All references cited in the text should be listed at the end of the paper on a separate page (also double-spaced) arranged in alphabetical order of first author. All items in the list of references should be cited in the text and, conversely, all references cited in the text must be presented in the list. Literature references must be complete, including initials of the authors cited, title of paper referred to, abbreviated title, year, volume, and first and last page numbers of the article, in a periodical. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations, CIEPS/ISDS, Paris, 1985, ISBN 2-904-938-02-8. (See example 2.) The form of literature references of books should be: author, initials, title of book, publisher and city, year, and page number referred to. (See example 1.) References to authors contributing to multi-author books or to proceedings printed in book-form should be similar to those for books. (See example 3.)

Examples:-

Bureš J, Burešová O, Huston JP. Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior, second ed. Elsevier: Amsterdam, 1983: 326.

Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. The importance of the '4-5' double bond for neurotoxicity in primates of the pyridine derivative MPTP. *Neurosci. Lett.*, 1984;50:289-94.

Sofroniew MV. Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. In Cross BZ, Leng G, editors. *The Neurohypophysis: Structure, Function and Control*, Progress in Brain Research. Elsevier: Amsterdam, 1983;50:101-14.

ILLUSTRATIONS

All illustrations must be submitted in triplicate and reach the editors in a form and condition suitable for reproduction. Authors should consult the Elsevier website for guidelines for preparing (electronic) artwork:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

The illustrations should bear the author's name and be numbered in Arabic numerals according to the sequence of their appearance in the text, where they are to be referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc. Line drawings should be in Black ink on drawing or tracing paper or glossy sharp photographs of the same. Lettering should be clear and of adequate size to be legible after reduction. Professional labelling is preferable but, if this is not possible lettering should be in fine pencil. Photographs, including roentgenograms, electroencephalograms, and electron micrographs should be supplied as original clear black-and-white prints on glossy paper, rather than copies which reproduce detail badly, usually larger than the final size of reproduction, but not more than 20 by 25 cm. Micrographs should have a scale bar rather than a magnification factor in the legend.

Color reproduction. Reproduction in color will have to be approved by the Editor. The extra costs of color reproduction will be charged to the author(s).

Each illustration must have a legend. These should be typed with double-spacing on a separate page and begin with the number of the illustration they refer to.

If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to The Journal of Neuroscience Methods, the written permission of author and publisher concerned must be included in the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Tables. Tables of numerical data should each be typed (also with double-spacing) on a separate page, numbered sequence in Roman numerals (Tables I, II, etc.), provided with a heading, and referred to in the text as Table I, Table II, etc.

PROOFS

Authors should keep a copy of their manuscripts, as proofs will be sent to them without manuscript. Proofs will usually be drawn on lower-quality paper. Only printer's errors may be corrected; no change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. The corrected proofs must be returned within 48 hours after receipt. If the Publisher receives no reply, the assumption will be made that there are no errors to correct and the article can be published after in-house correction.

REPRINTS

A total of 25 reprints of each paper will be provided free of charge to the author(s). Additional copies can be ordered at prices shown on the reprint order form which will be sent to the author upon receipt of the accepted manuscript at Elsevier

AUTHOR ENQUIRIES

For enquires relating to the submission of articles (including electronic submission), the status of accepted articles and other enquiries relating to Elsevier, please consult author Frequently Asked Questions and any other enquires relating to Elsevier, please consult <http://www.elsevier.com/authors>

For specific enquires on the preparation of electronic artwork, consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.