

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

**EFEITOS DA NICOTINA EM MODELO *in vitro* DE TOXICIDADE DO
PEPTIDEO β -AMILÓIDE**

LEON DE MORAES LISBÔA

Porto Alegre

2016

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

**EFEITOS DA NICOTINA EM MODELO *in vitro* DE TOXICIDADE DO
PEPTÍDEO β -AMILÓIDE**

LEON DE MORAES LISBÔA

Orientadora: Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego

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

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Moraes Lisboa, Leon
EFEITOS DA NICOTINA EM MODELO in vitro DE
TOXICIDADE DO PEPTÍDEO β-AMILÓIDE / Leon Moraes
Lisboa. -- 2016.
52 f.

Orientadora: Christianne Gazzana Salbego.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. ALZHEIMER. 2. ORGANOTÍPICA. 3. β-AMILÓIDE.
4. NICOTINA. I. Gazzana Salbego, Christianne,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha Família, meu pai e minha mãe que em nenhum momento de nossas vidas mediram esforços para que possamos estudar e minha namorada por todo suporte ao longo de todos os anos de estudos que me foi propiciado. Ao suporte nos momentos mais difíceis, onde por hora achei que tudo que eu havia feito estava perdido e que em nenhum momento valeria continuar.

Agradeço em especial ao meu irmão por todos os anos que moramos juntos, por ter sido além de irmão, pai e mãe nas horas difíceis que passamos longe de aconchego da casa dos nossos pais.

Agradeço a todos os colegas da Bioquímica pelo sorriso dado, pelas palavras de incentivo, pela ajuda nas horas que mais se precisava. Aos colegas de Laboratório 23, Aline, Thaline, Patricia, Elisa, Juliana, especialmente ao meu grande colega e escudeiro em todos os experimentos André Meneghetti. A professora Dra. Christiane Salbego pela orientação e paciência em entender os momentos que passei, e a Professora Dra. Cristiane Matté pela parceria, sabedoria e incentivo nos experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Descrição da Doença.....	2
1.2 Incidência.....	3
1.3 Características patológicas e moleculares.....	4
1.4. Peptídeo Beta Amiloide e Hipótese Amiloidogênica.....	6
1.5. A Hipótese Colinérgica.....	9
1.6. Nicotina e receptores nicotínicos.....	10
1.6.1. Nicotina e Neuroproteção.....	11
1.7 Estresse oxidativo e mitocôndria.....	12
2. OBJETIVO.....	14
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivo Especifico.....	15
3. MATERIAIS E METODOS.....	16
3.1. Cultura Organitipica de Hipocampo.....	17
3.2. Preparação do peptídeo AB 25-35 e tratamento das culturas.....	18
3.3. Preparação da solução de nicotina e tratamento das culturas.....	18
3.4. Quantificação da morte celular.....	19
3.5. Análise por Western Blotting.....	19
3.6. Ensaio de Citometria de Fluxo.....	21
3.7. Analise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Efeito da nicotina sobre os danos celulares induzidos pelo peptídeo A β 25-35.....	23
4.2. A β 25-35 e nicotina não apresentam efeito sobre a fosforilação de AKT e GSK-3 β	24
4.3. Avaliação da produção de superóxido, da massa mitocondrial e do potencial de membrana.....	25
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÕES.....	34
7. PERSPECTIVAS.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

A β – peptídeo beta-amiloide

A β 25-35 – peptídeo beta-amiloide com 10 aminoácidos

A β 1-40 – peptídeo beta-amiloide com 40 aminoácidos

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

AICD – domínio APP intracelular

AKT – Proteína Cinase B

APP – proteína precursora amiloide

APO E – apolipoproteína E

sAPP $_{\alpha}$ – forma secretada da APP $_{\alpha}$

sAPP $_{\beta}$ – forma secretada da APP $_{\beta}$

DA – Doença de Alzheimer

GSK-3 β – Glicogênio Sintase Cinase-3 beta

NFTs – emaranhados neurofibrilares

PS – presinilina

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a mais comum desordem neurodegenerativa e a principal causa de demência relacionada a idade. Os números em crescimento de pessoas afetadas pela DA estão diretamente ligados ao aumento na expectativa de vida da população mundial. A DA, por se tratar de uma doença multifatorial, envolve fatores genéticos, moleculares e ambientais. As principais alterações fisiopatológicas, hoje alvos de estudos, são os emaranhados neurofibrilares, constituídos pela proteína tau hiperfosforilada e as placas senis, compostas pelo peptídeo beta-amilóide (A β). O peptídeo A β tem sido considerado o principal responsável pelos processos de disfunção sináptica, morte neuronal e conseqüente declínio cognitivo dos pacientes com DA. Diversos processos estão envolvidos na formação deste peptídeo, que uma vez formado desencadeia uma cascata de eventos que envolvem alterações na sinalização celular, ativação da neuroinflamação e geração de um desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio nas organelas presentes nos neurônios culminando na disfunção sináptica e morte celular. Apesar do intenso estudo sobre a fisiopatologia da DA observado nas últimas décadas, ainda não existe o conhecimento completo sobre as causas e sobre o mecanismo que levam a progressão da doença. Os receptores nicotínicos estão presentes no sistema nervoso e, de uma forma geral, são responsáveis pela liberação de neurotransmissores importantes para uma diversidade de processos cognitivos. O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão correlacionados a um ciclo vicioso de desequilíbrio que desempenha um importante papel na patogênese da DA. Por isto, neste trabalho procuramos avaliar o efeito da nicotina em um modelo *in vitro* de toxicidade do peptídeo A β em cultura organotípica de hipocampo de ratos, bem como avaliar os efeitos desta droga sobre as proteínas relacionadas com a neurodegeneração, AKT e GSK-3 β . Além disso, avaliamos as alterações mitocondriais que a nicotina ocasionou em culturas organotípicas. Para isso, as culturas foram expostas ao peptídeo A β e à nicotina concomitantemente por um período de 48h. A morte celular foi avaliada a partir da incorporação do iodeto de propídeo, um marcador de morte de células principalmente em processo de necrose. As culturas expostas ao peptídeo A β quando tratadas com nicotina não apresentaram prevenção da morte celular. A nicotina não teve efeito sobre a fosforilação das proteínas AKT e GSK-3 β , através da análise obtida por *Western blotting*. Entretanto, na análise realizada por citometria de fluxo, utilizando as sondas mitocondriais MitoTracker[®] e MitoSOX[®], observamos um aumento na produção do ânion superóxido, bem como uma diferença na massa mitocondrial nas culturas expostas ao peptídeo com nicotina.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and the leading cause of age-related dementia. The growing numbers of people affected by AD are directly linked to the increase in life expectancy of the world population. The AD, because it is a multifactorial disease, involving genetic, molecular and environmental factors. The main pathophysiological changes, today object of studies, are the neurofibrillary tangles formed by the hyperphosphorylated tau protein and the senile plaques, composed of the beta-amyloid peptide (A β). The A β peptide has been considered the main responsible for synaptic dysfunction processes, neuronal death and consequent cognitive decline in AD patients. Several processes are involved in the formation of this peptide, which once formed triggers a cascade of events that involve alterations in cell signaling, activation of neuroinflammation and generate an imbalance in the production of reactive oxygen species in the organelles present in neurons culminating in synaptic dysfunction and cell death. Despite the intense study of the pathophysiology of AD observed in recent decades, there is still no complete knowledge about the causes and the mechanisms that lead to disease progression. Nicotinic receptors are present in the nervous system and, in general, are responsible for the release of neurotransmitters important for a variety of cognitive processes. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction is correlated to a vicious circle of imbalance plays an important role in the pathogenesis of AD. Therefore, in this study we evaluated the effect of nicotine on a model in vitro toxicity of A β peptide in organotypic culture in rat hippocampus, and to evaluate the effects of this drug on proteins related to neurodegeneration, Akt and GSK-3 β . In addition, we evaluated the mitochondrial alterations that nicotine caused in organotypic cultures. For this, the cultures were exposed to the A β -peptide and nicotine concomitantly for a period of 48h. Cell death was evaluated from the incorporation of propidium iodide, a marker of cell death mainly in necrosis process. Cultures exposed to A β peptide when treated with nicotine did not show any preventing cell death. Nicotine had no effect on the phosphorylation of Akt and GSK-3 β protein, obtained through the analysis by Western blotting. However, the analysis performed by flow cytometry using the mitochondrial probe MitoTracker® and MitoSOX®, an increase in the production of superoxide anion as well as a difference in mitochondrial mass in peptide cultures exposed to nicotine.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Descrição da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência entre a população, correspondendo a 60-80% de todos os casos. Este transtorno neurodegenerativo progressivo se manifesta pela deterioração cognitiva e da memória, comprometendo progressivamente as atividades diárias e uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e de alterações de comportamento. (PHILIPSON et al., 2010).

Descrita em 1906 pelo médico alemão Alois Alzheimer, como uma doença peculiar do córtex cerebral que cursa com demência, observada em uma paciente que vinha acompanhando desde 1901. A paciente, Auguste D de 51 anos, apresentava déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Após sua morte seu cérebro foi analisado por Alzheimer, que observou uma acentuada atrofia cerebral acompanhada por densos depósitos extracelulares de diversas fibrilas e emaranhados intracelulares (BURNS, et al., 2002; BLENNOW, K. et al., 2006). Em 1910, o também médico alemão Emil Kraepelin, após estudar casos semelhantes aos relatos de Alzheimer, propôs o nome da doença em homenagem ao seu descobridor (MOLLER, H.J. e GRAEBER, M.J., 1998; GOEDERT, M. e SPILLANTINI, M.G. 2006).

1.2 Incidência

Os avanços na área médica proporcionaram um aumento na expectativa de vida para acima dos 70 anos. Dessa forma a incidência de relatos de doenças neurodegenerativas vem aumentando progressivamente. Entre estas, a demência vem crescendo em níveis alarmantes, sendo a Doença de Alzheimer (DA) o tipo mais comum de demência entre a população idosa, abrangendo entre 60 a 80% de todos os casos. De acordo com estudos epidemiológicos, entre cerca de 7 a 10% dos indivíduos com mais de 65 anos e 50 a 60% acima de 85 anos sofrem com a DA. Em torno de 35,6 milhões de pessoas apresentaram a DA no mundo em 2010, e estima-se que esse número duplique em 20 anos, passando para 65,7 milhões, podendo chegar a 115,4 milhões em 2050 (MIELKE, M.M; VEMURI,P. e ROCCA, W.AQ 2014; SILVA, T. et al., 2014). A maioria dos casos da DA são esporádicos, onde o maior fator de risco é o envelhecimento. Progressivamente incapacitante a DA pode progredir durante muitos anos, sendo a média de oito podendo chegar até vinte anos (Alzheimer's Association, 2011). Sob o ponto de vista econômico, foi projetado que o custo anual de mais de 180 bilhões de dólares no ano de 2011 ultrapasse 1,1 trilhão de dólares em 2050 apenas nos Estados Unidos (Alzheimer's Association, 2011). No Brasil, a incidência e a prevalência da DA segue as estimativas mundiais, estimando-se que até 2025 em torno de 1,2 milhões de pessoas desenvolverão a DA (LOPES, M.A., e BOTTINO, C.M 2002; APRAHAMIAN, I. et al. , 2009).

1.3 Características patológicas e moleculares

O quadro complexo que constitui a DA envolve fatores genéticos, moleculares e ambientais. As manifestações iniciais se apresentam na dificuldade de lembrar informações adquiridas recentemente, devido a uma deterioração de domínios cognitivos seletivos. No entanto, conforme a doença progride, as memórias novas e antigas vão desaparecendo gradualmente (LA FERLA et al., 2007).

A DA é uma doença multifatorial, sendo 90-95% dos casos a forma esporádica, de início tardio e está relacionada a diversos fatores de risco tais como envelhecimento, sexo feminino, baixo nível educacional, tabagismo, sedentarismo e doenças crônicas (diabete mellitus, hipertensão, isquemia cerebral, hipercolesterolemia). Cerca de 5% dos casos são de origem genética, sendo que, nesta situação, o início da doença é mais precoce e estão incluídas anormalidades em genes relacionados à proteína precursora amilóide (APP – do inglês Amyloid Precursor Protein), bem como àqueles relacionados ao seu processamento, tais como a presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) (CITRON, M. 2002; CASSERLY, I. e TOPOL, E. 2004). Além disso, níveis elevados da apolipoproteína E4 (ApoE ϵ 4) contribuem para o acúmulo do peptídeo β -amilóide (A β). A ApoE participa da remoção do peptídeo A β , via proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade – 1 (LRP-1– LDL-Receptor-related Protein-1), por meio da formação do complexo ApoE/A β . Como a ApoE ϵ 4 possui uma menor afinidade pelo A β , há uma menor remoção deste, promovendo a formação das placas senis (VERGHESE et al., 2011; BU, 2009; VAN DER FLIER et al., 2011).

Análise histopatológica *post-mortem* de cérebros de pacientes com DA revelam, como previamente descrito por Alois Alzheimer, a presença de alterações moleculares características as quais incluem os emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos por agregados fibrilares da proteína *tau* (τ) hiperfosforilada e oxidada; e as placas senis ou neuríticas, as quais são constituídas por depósitos extracelulares de fibrilas de agregados amorfos do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) (Figura 1) (HAMDAME, M. et al. , 2003; FORMAN, M.S. et al. 2004; MATTSON, M.P. 2004; SELKOE, D.J. e WALSH, D.M., 2004).

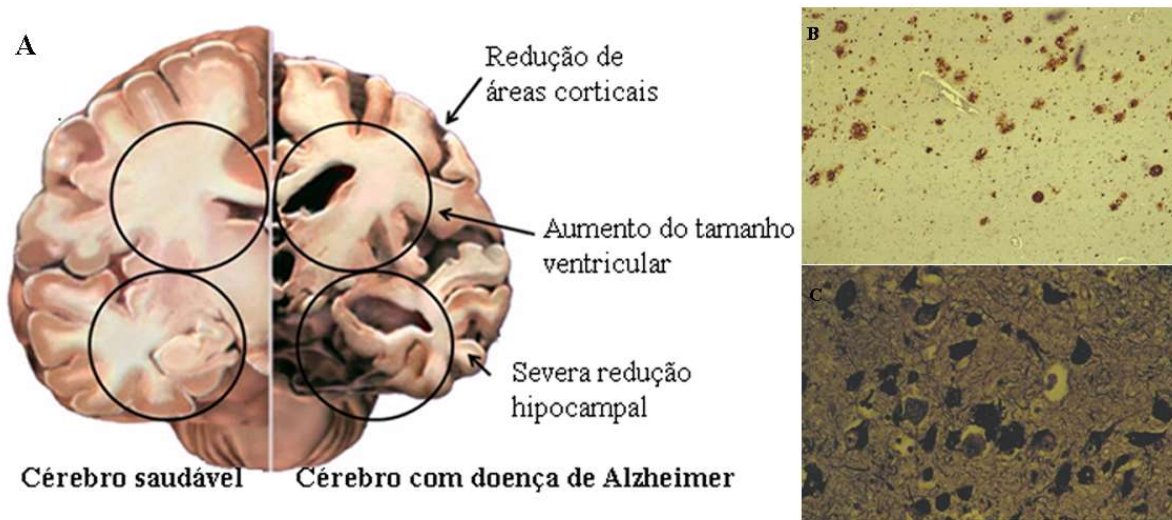


Figura 1. Alterações morfológicas observadas na doença de Alzheimer. (A) Comparação entre cérebro de paciente com DA (direita) e cérebro saudável (esquerda). É possível observar uma considerável redução cortical, aumento no tamanho dos ventrículos e redução hipocampal no cérebro com DA. (B) Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do $A\beta$. (C) Emaranhados intracelulares constituídos pela proteína *tau* hiperfosforilada. Adaptado de Lee e cols., 2010.

1.4. Peptídeo Beta Amiloide e Hipótese Amiloidogênica

A hipótese da cascata amilóide surgiu no final dos anos 80 (SELKOE, 1989) e foi formalizada em 1992 por Hardy e Higgins (HARDY, J. e HIGGINS, G.,1992). A hipótese original atribui que a deposição de grandes fibrilas insolúveis formadas a partir da agregação do A β , desencadeia diversas alterações celulares e moleculares levando à morte celular e ao estabelecimento da demência (KARRAN, E. et al., 2011).

Essencialmente, a hipótese da cascata amiloide propõe que a deposição do peptídeo A β é o evento patológico que dá início a doença, conduzindo à formação de redes neurofibrilares, a morte de células, e, finalmente, a demência. (ARMSTRONG, R. A., 2011).

O peptídeo A β é originado por endoproteólise a partir da APP, uma glicoproteína transmembrana altamente expressa em neurônios e células da glia. A APP sofre processamento por diversas secretases e proteases diferentes através de dois processos: o processamento amiloidogênico e o não-amiloidogênico. No processamento não amiloidogênico, a APP é sequencialmente clivada pela α -secretase e γ -secretase. A α -secretase cliva a APP no meio da sequência de aminoácidos no qual geraria o peptídeo A β (entre a Lis16-Leu17), liberando um grande ectodomínio solúvel chamado sAPP α e um fragmento C-terminal associado a membrana contendo 83 aminoácidos (CTF83). O fragmento CTF83 é posteriormente clivado pela γ -secretase para liberar o peptídeo P3 e o AICD (domínio intracelular da APP (APP intracelular domain), sendo ambos degradados rapidamente. Alternativamente, a geração do peptídeo A β ocorre pelo processamento

amiloidogênico através da clivagem da APP inicialmente pela enzima β -secretase ou BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1), formando um domínio extracelular chamado sAPP β e um fragmento C-terminal associado a membrana contendo 99 aminoácidos (CTF99), que contém a sequência do A β e o AICD. Em seguida, a enzima γ -secretase cliva o fragmento CTF99 entre os aminoácidos 38 e 43 liberando o peptídeo A β (Figura 2) (LAFERLA, F.M. et al. 2007; ZHANG Y. et al. 2011; ZHANG, H. et al. 2012).

O peptídeo A β produzido a partir do processamento da APP varia no tamanho, sendo a maior produção da sequência contendo 40 aminoácidos (A β 1-40), e em segundo, com um percentual de aproximadamente 10%, o peptídeo com 42 aminoácidos (A β 1-42). Este último é a forma mais hidrofóbica e a que apresenta maior facilidade de formar fibrilas, sendo por isso a predominante nas placas senis (ZHOU,Z.D. et al., 2011).

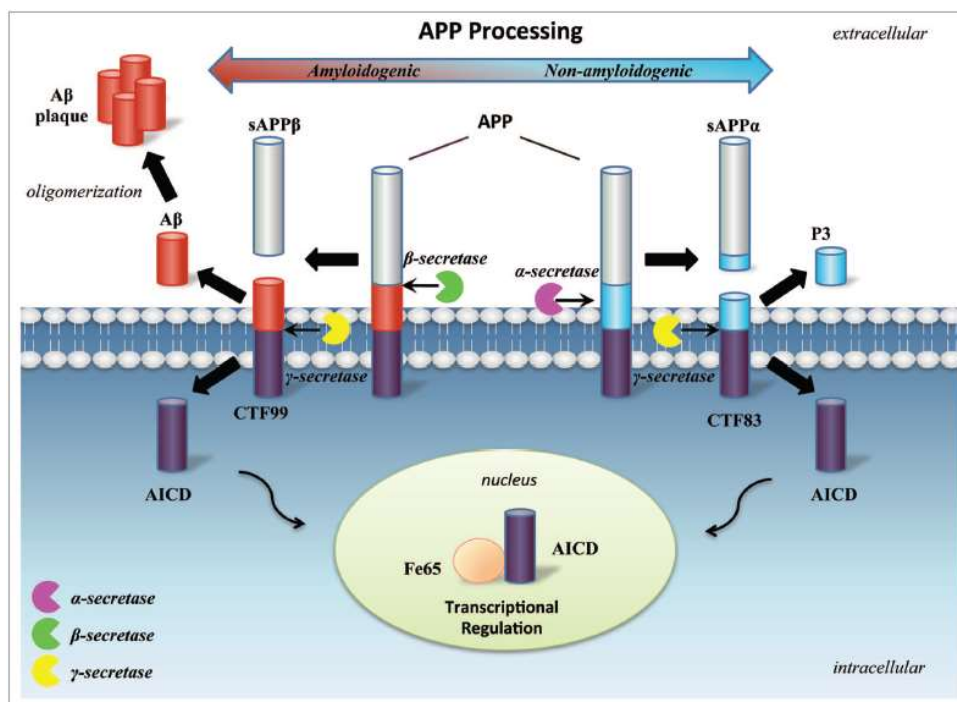


Figura 2: Processamento proteolítico da APP. Processamento não-amiloidogênico da APP pelas enzimas α - e γ -secretases, sem a geração do peptídeo A β (direita). Processamento amiloidogênico da APP pelas enzimas β - e γ -secretases, formando o peptídeo A β de 38 a 43 aminoácidos (esquerda) (adaptada de ZHOU et al., 2011).

Entre os fragmentos de A β utilizados em modelos experimentais da doença de Alzheimer, o peptídeo sintético com onze aminoácidos, o A β 25-35, representa o fragmento mais curto de A β processado *in vivo* por proteases cerebrais (KUBO, T. et al., 2002). Por isso, este peptídeo exibe níveis significativos de agregação molecular, mantendo a toxicidade de um peptídeo de comprimento completo. Em conformidade com esta constatação, tem sido proposto que A β (25-35) representa uma região de peptídeo biologicamente ativo de A β (PIKE, C.J. et al., 1995; CLEMENTI, M.E. et al., 2005).

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo, demonstramos que os peptídeos sintéticos A β 1-42 e A β 25-35 induzem o mesmo padrão de lesão neural em modelo experimental *in vitro*, utilizando cultura organotípica (FROZZA, R.L. et al. 2009). Além disso, a sequência de A β 25-35 é crítica dentro do A β 1-42, e é responsável pela diminuição da potenciação de longa duração, reforçando que o peptídeo sintético A β 25-35 pode ser utilizado para a investigação dos mecanismos neurotóxicos envolvidos na AD(LEE, C.C., et al. 2009.)

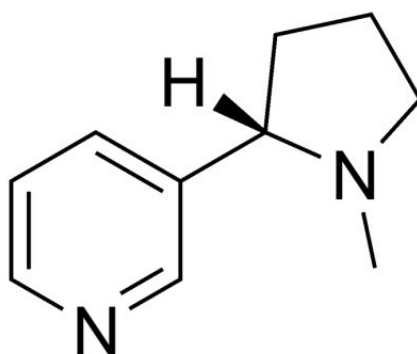
1.5. A Hipótese Colinérgica

Alguns estudos têm sugerido o envolvimento dos receptores Nicotina-Acetilcolina (nAChRs) e o desenvolvimento da DA. A análise bioquímica de cérebros de pacientes com AD mostrou uma diminuição nos nAChRs, um aumento da enzima butirilcolinesterase, uma redução de ACh, a atividade atenuada da atividade da enzima colina acetil transferase (ChAT) e inativação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (BARTUS, R.T. et al., 1982; FRANCIS P.T. et al, 1999). A butirilcolinesterase juntamente com a AChE são essenciais para a terminação da sinalização colinérgica, hidrolisando o neurotransmissor e, conseqüentemente, inativando-o. Por outro lado, os neurônios vulneráveis à DA parecem ser aqueles que expressam elevados níveis de nAChRs, particularmente aqueles contendo a subunidade α 7 (D'ANDREA, M.R. e NAGELE, R.G. 2006). Além disso, não apenas os α 7-nAChRs foram encontrados co-localizados com placas amiloides (WANG, H.Y. et al., 2000), mas também as subunidades α 7 e α 4 estão positivamente correlacionadas com neurônios nos quais se acumulam o peptídeo A β (WEVERS, A. et al., 1999). Os resultados destes estudos levaram a proposição da hipótese colinérgica da

DA, assim como para o desenvolvimento de terapias dirigidas ao sistema colinérgico, tendo como alvo principal hidrólise da ACh pela AChE (ARNERIC, S.P. et al., 2007). Dentre estas incluem-se drogas como o Donezepil® e a Galantamina®.

1.6. Nicotina e receptores nicotínicos

A nicotina é uma amina composta por anéis de piridina e pirrolidina [1-metil-2-(3-piridil-pirrolidina), C₁₀H₁₄N₂], tendo um centro ativo e ocorrendo como um estereoisômero (BORLOW, R.B. e HAMILTON, J.T. 1965).



A nicotina encontra-se em uma grande variedade de plantas, no entanto, a sua principal fonte de exposição é o uso de tabaco (DOOLITTLE, D.J. et al., 1995), no qual a nicotina foi isolada pela primeira vez e caracterizada como seu principal constituinte em 1828 (SCHEVELBEIN, H. 1982; DENIZ Y., 2004).

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) são canais catiônicos dependentes de ligantes para realizar a ligação a um receptor da super-família Cys-loop, tendo como forma uma roseta como homo ou heteropentâmeros e permeável a Na⁺, K⁺, Ca²⁺ (TSETLIN, V. et al. 2011). Estão presentes no sistema nervoso periférico, no sistema nervoso central e em células não neuronais (musculares, por exemplo). São conhecidas 17 subunidades na composição dos receptores, os subtipos α 1 a α 10, os β 1 a β 4, δ e γ , sendo

este último substituído por ϵ em fases posteriores de desenvolvimento. As subunidades $\alpha 7$ a $\alpha 9$ podem formar homo pentâmeros, enquanto que outras subunidades podem criar hetero pentâmeros. Já a subunidade $\alpha 10$ forma normalmente receptores heteroméricos com $\alpha 7$ e $\alpha 9$ (KARLIN, A. 2002). Seis subunidades α ($\alpha 2$ a $\alpha 7$) e três subunidades β são expressas em diferentes partes do cérebro que formam combinações múltiplas e, portanto, exibindo diversas propriedades farmacológicas e cinéticas. (GOTTI, C. et al., 2006). A ativação dos receptores nicotínicos cerebrais resulta na liberação de neurotransmissores, tais como, dopamina, serotonina, glutamato e GABA, caracterizando dessa forma, o envolvimento deste tipo de receptor com uma variedade de processos cognitivos complexos (DANI, J.A. e BERTRAND D. 2007). Dentre estes incluem-se a aprendizagem e a memória, os quais estão diretamente envolvidos a distúrbios do SNC, como a DA. A redução dos nAChRs no córtex cerebral está relacionada com os subtipos $\alpha 4\beta 2$, enquanto no hipocampo, o subtipo $\alpha 7$ é o mais afetado (GUAN, Z.Z. et al. 2000)

1.6.1 Nicotina e Neuroproteção

Foi descrito que a nicotina pode proteger os neurônios contra a toxicidade do A β (KIHARA, T. et al., 1998). Por outro lado, a observação de que a nicotina aumenta a cognição (RUSTED, J.M. et al., 2000), sugere o envolvimento dos receptores nicotínicos no efeito neuroprotetor da nicotina. Reforçando estas observações, foi demonstrado que esse efeito protetor é bloqueado pelos antagonistas nicotínicos, di-hidro- β -eritroidina e mecamilamina (KIHARA, T. et al, 2001;. TAKADA-TAKATORI, Y. et al., 2006).

Alguns estudos sugerem um possível mecanismo para este efeito neuroprotetor. A maioria deles descreve a relação entre a ativação dos nAChRs e os seus efeitos protetores, porém foi descrito, que neurônios corticais de ratos são protegidos pelometilcaconitina, um antagonista da subunidade $\alpha 7$ antagonista (MARTIN, S.E. et al., 2004), o que sugere a possibilidade de que a neuroproteção mediada pelos agonistas $\alpha 7$ pode na verdade ser devida à dessensibilização em vez da ativação deste receptor. Além destes mecanismos, a ação da nicotina pode também envolver o processo de superregulação da expressão do nAChR. Já foi descrito que a exposição à nicotina resulta no aumento da expressão de nAChRs em cérebro e em culturas celulares (GENTRY, C.L. e LUKAS, R.J. 2002 para revisão).

1.7 Estresse oxidativo e mitocôndria

O estresse oxidativo é o estado resultante de um desequilíbrio entre a geração e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). EROs e ERNs são subprodutos fisiológicos inevitáveis que atuam com ambiguidade no sistema biológico: eles podem servir para funções cruciais, como moléculas de sinalização em situações controladas, mas podem causar danos ao sistema biológico, quando presente em excesso, uma vez que são capazes de oxidar biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e RNA. O cérebro é altamente suscetível ao desequilíbrio oxidativo devido à sua alta demanda de energia, e ao alto consumo de oxigênio. (BUTTERFIELD, D.A. et al. 2007; WANG, X. et al. 2014)

A oxidação de proteínas pode levar a sua agregação ou dimerização e, além disso, também pode levar ao desdobramento ou a alteração

conformacional das moléculas proteicas, podendo expor resíduos hidrofóbicos a um meio aquoso. Esta exposição pode levar à perda da atividade funcional ou estrutural, a agregação e a subsequente acúmulo de proteínas oxidadas. Este tipo de alteração estrutural é observado na agregação da proteína *tau* na forma de emaranhados e na agregação do peptídeo A β nas placas senis, características da doença de Alzheimer (STADTMAN, ER e BERLETT, BS, 1997)

A mitocôndria é uma importante organela produtora de espécies reativa sendo, conseqüentemente, altamente suscetível ao dano oxidativo. A interação entre o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formam uma espécie de ciclo vicioso o qual parece estar envolvido na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (SWERDLOW, R.H; 2011).

Em células aeróbias, 90-95% da quantidade total de produção de ATP são provenientes do metabolismo aeróbico. A síntese do ATP através da cadeia respiratória mitocondrial é o resultado do transporte de elétrons acoplado a fosforilação oxidativa. Durante o envelhecimento normal e com o surgimento de algumas doenças neurodegenerativas como DA, as mitocôndrias danificadas são incapazes de manter a demanda de energia da célula. Isto pode levar a um aumento da produção de radicais livres, o que induz a interrupção da fosforilação oxidativa e resulta na diminuição dos níveis de ATP. O principal radical produzido por mitocôndrias é o anión superóxido; sistemas antioxidantes intramitocondrial sequestram este radical para evitar dano oxidativo, o que pode levar à uma produção diminuída de ATP (ALIEV, G. et al. 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da nicotina em um modelo *in vitro* de toxicidade do peptídeo β -amiloide, em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, como modelo experimental de neurodegeneração do tipo Alzheimer.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da nicotina sobre a morte celular induzida pelo peptídeo A β nas culturas organotípicas, através da medida da incorporação do corante iodeto de propídeo.
- b) Avaliar vias de sinalização celular que possam estar envolvidas com o possível efeito da nicotina no modelo de toxicidade estudado, focando na via da PI3K, especificamente analisando as proteínas AKT e GSK-3 β
- c) Avaliar o efeito da nicotina sobre os parâmetros de massa mitocondrial e potencial de membrana. bem como a produção mitocondrial de ânion superóxido

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Organotípica de Hipocampo

As culturas organotípicas do hipocampo foram preparadas de acordo com o método de Stoppini et al. (1991), com algumas modificações (VALENTIN, L. et al., 2003). Resumidamente, as culturas foram preparadas a partir de ratos Wistar machos entre 6 a 8 dias de idade, os hipocampus são isolados, foram fatias transversais de hipocampo com espessura 400 μM , utilizando um fatiador de tecido Mcllwain (Mickle Laboratory Engineering Co., Guildford, Reino Unido). As fatias são separadas e colocadas em solução salina balanceada e de Hanks (HBSS (Gibco) mg/mL): 6.5 glicose, 0.14 CaCl_2 , 0.4 KCl, 8 NaCl, 0.06 KH_2PO_4 , 0.048 Na_2HPO_4 , 0.1 MgCl_2 , 0.1 MgSO_4 , 25 mM HEPES, 1% fungizona e gentamicina 36 mL/100 mL (Schering®), pH 7,2. As fatias são colocadas sobre uma membrana de inserção de cultura (CM Millicell®, 0,4 μM) e as inserções são transferidas para uma placa de cultura de seis poços (Cell Culture Cluster, TPP). Cada poço contém 1 ml de meio de cultura, que consiste em 50% de Meio Essencial Mínimo (MEM) (Gibco), 25% de soro de equino inativado pelo calor (Gibco) e 25% de HBSS (Gibco), suplementado com glicose 36 mM, HEPES 25 mM e NaHCO_3 4 mM (concentrações finais). Fungizona 1% e gentamicina 36 mL/100 mL são adicionados ao meio e o pH final é ajustado para 7,3 sendo a solução imediatamente filtrada (Millex-GS, Millipore). As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37° C numa atmosfera com concentrações de 5% de CO_2 e 95% de O_2 a. O meio foi trocado a cada três dias e os experimentos foram realizados após 21 dias de cultivo.

Todos os procedimentos utilizando animais foram realizados de acordo com o Guia NIH para o cuidado e uso de animais de laboratório, sendo o

projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais-UFRGS (CEUA-UFRGS).

3.2. Preparação do peptídeo A β 25-35 e tratamento das culturas

Um miligrama do peptídeo β -amilóide (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água Milli-Q filtrada (0,2 μ M) e esta solução estoque foi armazenada a -20°C. Para obter o peptídeo em seu estado fibrilado, as alíquotas da solução estoque foram descongeladas e mantidas a temperatura de 37°C durante 72 horas. No 21º dia in vitro, o meio de cultura foi trocado por outro de igual composição, porém com redução na quantidade de soro para 5%, contendo o peptídeo A β 25-35 fibrilado, na concentração de 50 μ M (concentração final). Os controles também tiveram o meio de cultivo trocado por um com soro reduzido, e receberam apenas o veículo utilizado na preparação do peptídeo (água). As culturas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 48 horas, e posteriormente foram feitas as análises.

3.3. Preparação da solução de nicotina e tratamento das culturas

A nicotina foi dissolvida e diluída com água tipo Milli-Q. Após 21 dias, concomitantemente com o peptídeo β -amilóide, as culturas foram tratadas com 500 μ M (concentração final) de nicotina, a qual foi adicionada diretamente ao meio de cultivo. As culturas controle receberam apenas o veículo (água). As culturas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 48 horas, e posteriormente foram feitas as análises.

3.4. Quantificação da morte celular

A morte celular foi avaliada através análise da incorporação do corante iodeto de propídeo (IP, Calbiochem, San Diego, CA, EUA) (NORABERG, J. *et al.*, 1999). Iodeto de propídeo é um composto polar impermeável quando a membrana celular estiver intacta, porém é capaz de permear as membranas celulares danificadas, de células em processo de morte necrótica, liga-se ao DNA nuclear gerando uma fluorescência vermelha . Após 46 h de exposição ao peptídeo A β e/ou ao tratamento com a nicotina, 5 μ M IP foi adicionado ao meio de cultura e incubado por 2 h. Após este tempo, as culturas foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando um filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas usando o programa Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). A área onde a fluorescência do IP foi detectada acima dos níveis de “*background*” foi determinada usando a opção “*density slice*” do programa Scion Image e comparadas com a área total da fatia para obter a percentagem de lesão (VALENTIN, L. *et al.*, 2003), utilizando a seguinte fórmula: a morte celular (%) = $F_d / F_o \times 100$, onde F_d é a fluorescência de absorção de iodeto de propídeo da área morta de cada fatia do hipocampo e F_o é a área total de cada fatia do hipocampo (HOPPE, J. *et al.*, 2010).

3.5. Análise por Western Blotting

A análise da via de sinalização celular envolvidas na citotoxicidade mediada pelo peptídeo A β , e/ou o efeito da nicotina sobre esta toxicidade, foi feita através do 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 (12%). 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 em 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 apropriados dissolvidos na solução de bloqueio. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-fosfo-AKT (Ser473) (pAkt, 1: 1000; Cell Signaling Technology), anti-Akt (1: 1000; Cell Signaling Technology), anti-fosfo-GSK-3 β (Ser9) (pGSK-3 β , 1: 1000; Cell Signaling Technology) e anti-GSK-3 β (1: 1000; Cell Signaling Technology). As membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário (1:1000) conjugado com peroxidase durante 2 h. A quimioluminescência foi revelada usando *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare UK). As bandas imunorreativas foram reveladas por um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) utilizando filmes de raios-X. Os filmes foram digitalizados e as imagens digitalizadas foram analisadas usando o software Graph Pad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software Inc. La Jolla, CA, EUA). Os dados foram expressos como percentagem da proteína fosforilada, o qual foi obtido pelo quociente do imunoconteúdo da fosfoproteína (pAkt ou pGSK-3 β) pela quantidade de proteína total (Akt ou GSK-3 β) fornecida pelo ensaio de imunodeteccção com o anticorpo contra a respectiva pteína total.

3.6. Ensaio de Citometria de Fluxo

A produção mitocondrial de ânion superóxido, a massa e o potencial de membrana mitocondrial foram avaliados usando as sondas MitoSOX[®], MitoTracker[®] GREEN e RED (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), respectivamente, num citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). As fatias foram dissociadas com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.4, contendo 1 mg% de colagenase IV, filtrou-se e incubou-se com as sondas. Cem microlitros de cada amostra foram incubados a 37°C, no escuro, durante 45 minutos contendo a concentração final de 100 µM MitoTracker[®] GREEN+RED e 100 µM MitoSOX[®]. Foram avaliadas 10.000 células por amostra. Os dados foram analisados usando o software FlowJo.

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos nestes experimentos foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguidos pelo teste post-hoc Tukey usando o software Graph Pad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software Inc. La Jolla, CA, EUA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da nicotina sobre os danos celulares induzidos pelo peptídeo A β 25-35

A exposição das culturas a 50 μ M do peptídeo A β 25-35, durante 48h causou um aumento significativo de 229,37% na incorporação do corante iodeto de propídeo, avaliada pelo aumento da fluorescência em fatias hipocampo, em comparação ao controle, o que representa um aumento do dano celular. O tratamento com 500 μ M de nicotina, adicionada simultaneamente com o peptídeo, não foi capaz de prevenir este dano (Figura 3). Foi realizada uma curva de concentração de nicotina utilizando as concentrações 25, 50, 100, 250 μ M de nicotina, porém nenhuma concentração testada foi efetiva em prevenir a toxicidade do A β 25-35 (dados não mostrados).

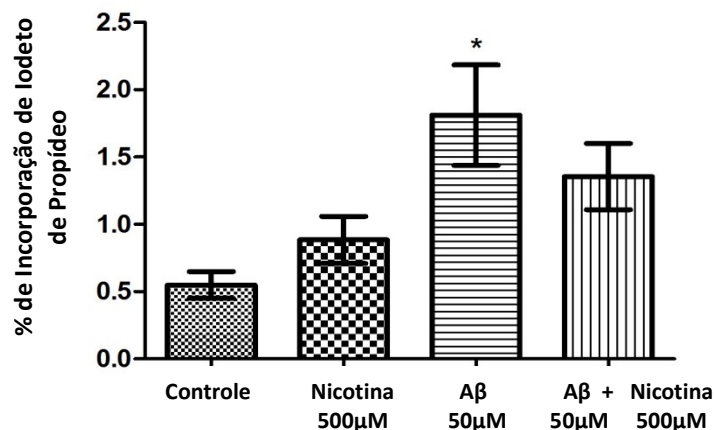


FIGURA 3. Efeito da Nicotina sobre o dano celular induzido pelo peptídeo A β 25-35. Após 46h de exposição ao peptídeo A β e/ou ao tratamento com a nicotina, 5 μ M IP foi adicionado ao meio de cultura e incubado por 2 h. Após este tempo, as culturas foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando um filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas usando o programa Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). Os valores são expressos como % de morte celular no hipocampo. Barras representam a média \pm EP, n = 6. * Valor diferente estatisticamente significativo entre grupo Controle e A β , para p < 0,05 (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.2. A β 25-35 e nicotina não apresentam efeito sobre a fosforilação de AKT e GSK-3 β .

AKT ativada (forma fosforilada) fosforila e inativa a GSK-3 β , sendo uma importante via anti-apoptótica. O estado de fosforilação das proteínas Akt e GSK foi avaliado após 48 h de exposição ao peptídeo A β 25-35, utilizando a técnica de *Western blotting* para as formas fosforilada e total. Foram utilizados os anticorpos contra fosfo-AKT fosforilada em Ser473, e fosfo-GSK-3 β fosforilada em Ser9. Como pode ser visto na figura 4 (A e B), não foi observada diferença significativa no estado de fosforilação destas proteínas quando analisadas após 48 horas de exposição das culturas ao A β 25-35 e/ou a nicotina.

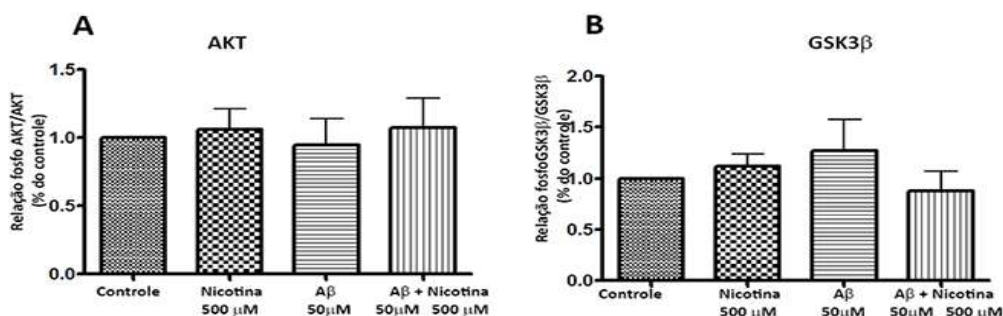


Figura (4).Efeito da Nicotina sobre a fosforilação das proteínas AKT e GSK3 β : Quantificação dos níveis de fosforilação de AKT (A) GSK-3 β (B) após 48h de exposição ao peptídeo e Nicotina. Os dados são expressos como uma relação entre o imunoconteúdo da forma fosforilada e o imunoconteúdo da proteína total normalizada com seu respectivo controle não exposto ao peptídeo A β nem a Nicotina (barra de controle=100%). O controle de carregamento do gel foi feito utilizando a proteína beta-actina como padrão de carregamento. As barras representam a média \pm EP, n = 6 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

4.3. Avaliação da produção de superóxido, da massa mitocondrial e do potencial de membrana.

Para avaliar a função mitocondrial, analisamos a massa mitocondrial e o potencial de membrana através da técnica de citometria de fluxo com sondas MitoTracker® GREEN e RED, respectivamente, e a sonda MitoSOX® para investigar a produção do ânion superóxido. Conforme apresentado na figura 5 (A), a produção do ânion superóxido foi significativamente aumentada nas culturas tratadas simultaneamente com nicotina e com o peptídeo A β 25-35 em comparação com as culturas tratadas somente com o peptídeo A β 25-35, ou somente com nicotina. Com relação à massa mitocondrial, observamos também um aumento significativo nas culturas tratadas com ambos, nicotina e com o peptídeo A β 25-35, em relação às culturas tratadas apenas com o peptídeo ou com nicotina. (Figura5B). Porém não observamos diferença significativa em relação ao potencial de membrana em nenhum dos grupos experimentais (Figura5C)

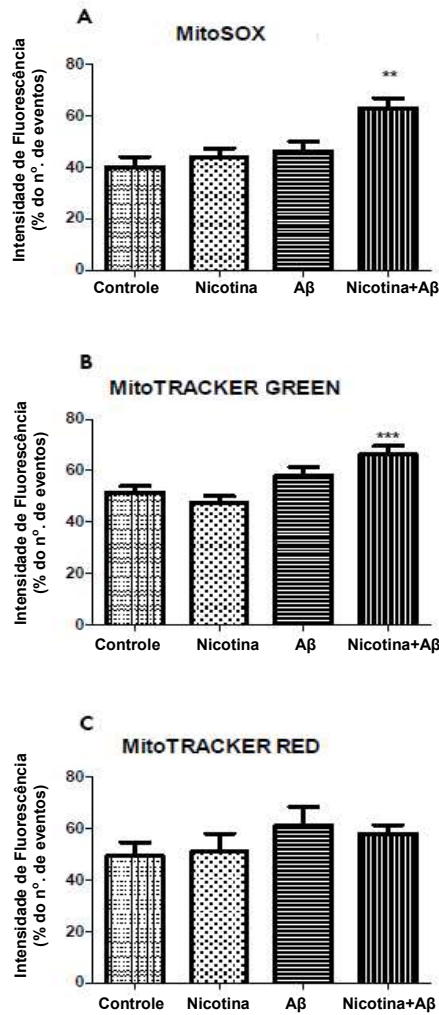


Figura 5. Efeito da Nicotina e do peptídeo Aβ sobre a função mitocondrial: (A) Geração do ânion superóxido, medida pela sonda MitoSOX®; (B) Massa Mitocondrial, medida pela sonda MitoTracker® GREEN e (C) Potencial de membrana mitocondrial, medida pela sonda MitoTracker® RED, (Barras representam a média ± EP, n = 6 ** Valor significativamente diferente do controle com p < 0,05. *** Valor significativamente diferente do controle com p < 0,005. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer é uma das principais causas de demência, a doença é caracterizada clinicamente, pela perda irreversível e progressiva da memória, e histopatologicamente caracterizada pela presença de placas neuríticas (NP) e emaranhados neurofibrilares (NFTs). Ambos os tipos de lesões são formados devido ao acúmulo de agregados de proteínas insolúveis, constituídos pelo peptídeo beta amiloide, no caso das placas neuríticas e da proteína tau, constituindo os emaranhados neurofibrilares. Estudos realizados nos últimos 30 anos têm proporcionado importantes avanços na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patologia da DA.

A teoria da cascata amiloide, a mais aceita pelos pesquisadores no estudo da DA, sugere que as mudanças graduais no metabolismo da proteína precursora amiloide (APP), levam a liberação e agregação do peptídeo A β iniciando uma cascata de eventos os quais resultam na deposição de β -amilóide, desencadeando mecanismos de neurodegeneração associados a formação de emaranhados neurofibrilares contendo a proteína tau hiperfosforilada, e por fim desencadeia disfunção sináptica associada a morte celular (HARDY, J.A, e HIGGINS, G.A. 1992). Com o desenvolvimento de novos estudos, esta teoria foi reformulada alterando a proposta inicial da cascata amiloide, incluindo o potencial neurotóxico do peptídeo A β na sua forma oligomérica (HARDY, J.A. e SELKOE, D.J. 2002; HAASS, C. e SELKOE, D. 2007).

No estudo dos mecanismos envolvidos na DA, os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* são ferramentas fundamentais. Dentre esses modelos, o modelo *in vitro* usando fatias hipocâmpais, a cultura organotípica,

mostra-se como uma importante alternativa ao uso de animais *in vivo* e do cultivo de células (NASSIF, M. et al., 2007; FROZZA, R.L. et al., 2009; HOPPE, J. et al., 2010).

Pelo fato deste modelo preservar a organização sináptica, celular e o circuito intra hipocampal, mantendo assim as características funcionais observadas *in vivo* (HOLOPAINEN, I.E. 2005; NORABERG, J. et al., 2005), torna-se uma excelente ferramenta para o estudo de neurotoxicidade, focando no hipocampo, área envolvida com funções cognitivas, tais como o aprendizado e a memória, e uma das principais regiões afetadas na DA.

O peptídeo A β 25-35 representa uma alternativa mais econômica no desenvolvimento de modelos experimentais da DA. Ele exerce uma toxicidade similar ao A β 1-42, uma vez que ele é formado de um fragmento de 11 aminoácidos originário do A β 1-42, correspondendo a região biologicamente ativa deste. Demonstramos previamente, em modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos, que os peptídeos, A β 1-42 e seu fragmento A β 25-35, exercem um efeito tóxico similar com relação a morte celular assim como na regulação de vias de sinalização associadas com a sobrevivência e/ou morte celular (FROZZA, R.L. et al., 2009).

Alguns estudos mostraram que o poder neurotóxico do peptídeo A β , envolvendo ativação de vias apoptóticas, é mediado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo esta toxicidade atenuada por substâncias anti-radicais livres (MIRANDA, S. et al, 2000).

Outros estudos demonstraram que a nicotina pode ter propriedades antioxidantes potentes e apresenta efeito de neuroproteção frente ao peptídeo

A β em culturas de neurônios hipocampais. (LIU, Q. e ZHAO B, 2004). Neste estudo foi demonstrado que a nicotina reduziu significativamente a morte celular induzida pelo A β em comparação ao veículo.

No presente trabalho utilizamos cultura organotípica para demonstrar o possível efeito de proteção da nicotina frente toxicidade do peptídeo A β através da avaliação do dano celular pela medida da incorporação do iodeto de propídeo. Para avaliar um possível mecanismo, utilizamos a técnica de *Western blotting* para analisar vias de sinalização celular envolvidas com a morte e/ou sobrevivência, focando na via da PI3K, particularmente nas proteínas AKT, pró-sobrevivência, e GSK3 β , pró-apoptótica. Além disto, fizemos uma análise da dinâmica mitocondrial utilizando as sondas MitoSOX[®] e MitoTracker[®] GREEN e RED para avaliar a função mitocondrial.

Como apresentado na figura 3, as culturas organotípicas de fatias de hipocampo expostas a concentrações de 50 μ M de A β 25-35 por um período de 48h, apresentaram dano celular, uma vez que houve um aumento na incorporação do corante iodeto de propídeo, indicativo de morte celular. Já o tratamento com nicotina, 500 μ M, não foi capaz de prevenir o dano causado pelo A β 25-35 (figura 3). Muitos trabalhos descreveram o efeito neuroprotetor da nicotina em modelos de toxicidade do peptídeo A β (KIHARA, T. et al. 1997; 1998; SINGH, I.N. et al. 1998;) utilizando diferentes modelos experimentais, diferentes tipos celulares assim como diferentes preparações do peptídeo A β . Com relação aos nossos resultados, podemos sugerir que a discordância com alguns desses estudos pode estar relacionada com o modelo utilizado pelo nosso grupo. Por outro lado, não podemos descartar que a nicotina possa ter um efeito sobre o dano celular, porém nosso método não foi sensível para

detectá-lo, uma vez que parece haver uma tendência em diminuir o dano celular nas culturas tratadas com nicotina e A β .

GSK-3 β é uma proteína abundante no sistema nervoso central e tem se mostrado um componente chave nas vias de sinalização que levam à neurodegeneração (BALARAMAN, Y. et al., 2006). Estudos recentes revelaram que a elevação da atividade da GSK-3 β está diretamente relacionada com o aumento dos níveis de produção e depósitos do peptídeo A β , hiperfosforilação da *tau* e danos sinápticos em pacientes com a DA e também em modelos animais da mesma doença. A análise de duas proteínas chaves na via da PI3K, a GSK-3 β e a AKT, via importante uma vez que tem como alvos a regulação de mecanismos pro-apoptóticos, os resultados obtidos por Western Blotting com os anticorpos anti-GSK-3 β e anti-AKT, formas fosforilada e total, mostraram que não houve alteração significativa em nenhum dos grupos experimentais. Uma possível explicação para estes resultados pode ser o fato de que a análise destas vias de sinalização foi feita apenas 48 h após a exposição ao A β e/ou à nicotina. Sabe-se que as vias de sinalização celular, de uma forma geral, respondem muito rapidamente (6-24 horas) as situações de estresse celular, e muitas vezes estas alterações voltam ao nível basal após um tempo prolongado. Já foram demonstradas anteriormente através de uma análise temporal, alterações precoces em vias de sinalização celular, as quais tardiamente já não foram detectadas (FROZZA, R.L. et al. 2013; HOPPE, J. et al. 2013).

Tem sido sugerido que o estresse oxidativo tem uma participação crítica na iniciação e na progressão da DA (WANG X. et al, 2014). A produção aumentada e o acúmulo de espécies reativas (EROs) em pacientes com DA

pode induzir disfunção mitocondrial, porém, a origem do aumento da produção de EROs e o mecanismo pelo qual se estabelece o desequilíbrio redox ainda não foram esclarecidos (ZHAO Y, ZHAO B., 2013). O acúmulo de A β parece desencadear o estresse oxidativo levando à disfunção mitocondrial e falha energética (LIN MT, BEAL MF., 2006) já na fase inicial da doença (MATSUOKA Y. et AL, 2001; MOHSENZADEGAN, M et al. 2012). No presente trabalho, avaliamos o efeito do A β e/ou da nicotina sobre parâmetros mitocondriais, utilizando a metodologia de citometria de fluxo. Com relação à produção de espécies reativas, observamos um aumento na produção do ânion superóxido no grupo tratado simultaneamente com Nicotina e A β (figura5 A). Observamos também um aumento da massa mitocondrial neste mesmo grupo (figura5 B), porém com relação ao potencial de membrana não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos experimentais. Uma possível explicação para estes resultados envolve considerarmos a técnica utilizada para a análise da função mitocondrial ter sido a citometria de fluxo, a qual analisa apenas as células íntegras. Desta forma podemos sugerir que as amostras tratadas apenas com A β ou nicotina, o eventual aumento na produção de espécies reativas esteja mascarado pelo fato de as células danificadas, nas quais possa ter aumento na produção destas espécies, não são contadas. Por outro lado, nas amostras tratadas simultaneamente com nicotina e A β , nas quais observamos o aumento de produção de ânion superóxido e de massa mitocondrial, a nicotina possa estar de alguma forma atrasando a morte celular e as mitocôndrias estão “inchando” e produzindo mais espécies reativas. Esta hipótese pode ser apoiada pelo fato de não ter sido observada alteração no potencial de membrana, o que sugere que não há biogênese mitocondrial. Serão

necessários mais experimentos com a utilização de outras metodologias para confirmarmos esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na dissertação nos permitem concluir que:

- a) A nicotina não foi capaz de prevenir o dano celular induzido pelo peptídeo A β 25-35, no modelo experimental de culturas organotípicas de hipocampo de ratos;
- b) Não foi observada qualquer alteração na via de sinalização celular da PI3K, particularmente nas proteínas AKt e GSK3 β , após 48 horas de exposição ao peptídeo A β 25-35 e/o com nicotina.
- c) Os resultados obtidos em relação a dinâmica mitocondrial com este modelo *in vitro* aconselham um aprofundamento das análises, visto que esta dinâmica foi alterada significativamente com o uso simultâneo da nicotina com o peptídeo A β 25-35.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar as proteínas de sinalização de morte e dano celular em diferentes tempos de exposição à nicotina, assim com analisar outras vias de sinalização celular.
- Avaliar o efeito da nicotina sobre o estresse oxidativo, utilizando outras metodologias, em culturas organotípicas expostas ao peptídeo A β ;
- Desenvolver um modelo experimental para avaliação do efeito da nicotina sobre a biogênese mitocondrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIEV G, SMITH MA, DE LA TORRE JC, PERRY G. (2004) Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mitochondrion*. 4:649-63. 2004
- ANDERSON RM, ET AL. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*. 7:101-11. 2008.
- APRAHAMIAN, I., MARTINELLI, J.E. & YASSUDA, M.S.. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. *Revista Brasileira de Clínica Médica*. 7:27-35. 2009.
- ARMSTRONG R. A. The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade Hypothesis", 2011
- ARNERIC SP, HOLLADAY M, AND WILLIAMS M Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochemistry Pharmacology*. 74: 1092–1101. 2007.
- BALARAMAN, Y.; LIMAYE, A.; LEVEY, A..SRINIVASAN, S. Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: 1226-1235, 2006.
- BARLOW RB e HAMILTON JT. The stereospecificity of nicotine Br J Pharmacol Chemother. 25:206-12. 1965.
- BARTUS RT, DEAN RL, BEER B, LIPPA AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217:408-14. 1982.
- BERLETT B.S., STADTMAN E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal Biology Chemistry*. 272:20313-6. 1997.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M.J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403. 2006.
- BROWN D., ET AL. Nicotine promotes survival of cells expressing amyloid precursor protein and presenilin: implication for Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 535:57–61. 2013.
- BURNS, A.; BYRNE, J.; MAURER, K. Alzheimer's disease. *The Lancet* 1086: 35-53, 2002.

- BUTTERFIELD, D. A.; T. REED; NEWMAN, S.F.; SULTANA, R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology Medicine* 43: 658-77. 2007.
- CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded protein. *The Lancet* 363: 1139-1146. 2004.
- CHONG YH, ET. ERK1/2 activation mediates A β oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Journal Biology Chemistry*. 281: 20315-20325. 2006.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in Discovery and development. *Nature Neuroscience* 5: 1055-1057. 2002.
- CLEMENTI ME, MARINI S, COLETTA M ET AL Ab(31-35) and Ab(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35. *FEBS Letters* 579:2913–2918. 2005.
- DANI JA, BERTRAND D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Revision Pharmacology and Toxicology*. 47:699–729. 2007.
- D'ANDREA MR, NAGELE RG. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Current pharmaceutical design*. 12: 677-84. 2006.
- D'ANDREA MR, ET AL Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 38:120–134. 2001
- DENIZ YILDIZ. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* 43 619–632. 2004.
- DOOLITTLE, D.J. ET AL, The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutation Research*. 344, 95–102. 1995.
- FRANCIS PT, PALMER AM, SNAPE M, WILCOCK GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Feb;66:137-47. 1999.

- FORMAN M.S., et al. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*.10:1055–63. 2004.
- FROZZA, R. L.; HORN, A. P.; HOPPE, J. B.; SIMÃO, F.; GERHARDT, D.; COMIRAN, R. A..SALBEGO, C. G. A comparative study of β -amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochemical research*, 34: 295-303. 2009.
- FROZZA RL, ET AL Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. *Journal of Biomedicine Nanotechnology* .9: 2086-104. 2013.
- GENTRY CL AND LUKAS RJ Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurology Disorders* 1:359–385. 2002.
- GJUMRAKCH ALIEV, ET AL. Atherosclerotic lesions and mitochondria DNA deletions in brain microvessels: Implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease *Vascular Health Risk Management*. 4: 721–730. 2008.
- GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. A Century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777-780, 2006.
- GOTTI C, RIGANTI L, VAILATI S, CLEMENTI F. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr Pharm Des*. 12:407–428. 2006.
- GUAN ZZ, ZHANG X, RAVID R, NORDBERG A. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 74:237–243, 2000.
- HAMDANE, M. ET AL. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochem Pharmacol* 66: 1619-1625, 2003.
- HARDY, J. A..HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992.
- HARDY, J..SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297: 353-356, 2002.

- HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons From the Alzheimer's amyloid beta peptide Nature reviews. Molecular cell biology. 8: 1016, 2007.
- HOLOPAINEN, I. E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. Neurochemical research. 30: 1521-1528, 2005.
- HOPPE, J. B.; FROZZA, R. L.; HORN, A. P.; COMIRAN, R. A.; BERNARDI, A.; CAMPOS, M. M.; BATTASTINI, A. M. O..SALBEGO, C. Amyloid- β neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , tau and neuroinflammation. Journal of pineal research, 48: 230-238, 2010.
- HOPPE JB, FROZZA RL, PIRES EN, MENEGHETTI AB, SALBEGO C. The curry spice curcumin attenuates beta-amyloid-induced toxicity through beta-catenin and PI3K signaling in rat organotypic hippocampal slice culture. Neurology Research. 35:857-66. 2013
- INES MORENO-GONZALEZ ET AL. Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease Nature Communications. 4:1495. 2013.
- KARLIN A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. Nature Reviews Neuroscience. 3:102–114. 2002.
- KARRAN, E.; MERCKEN, M..DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery. 10: 698-712, 2011.
- KIHARA T, ET AL 7 Nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block a -amyloid-induced neurotoxicity. The Journal of Biology Chemistry 276: 13541-46. 2001.
- KIHARA T, ET AL Stimulation of $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors inhibits β -amyloid toxicity. Brain Research 792:331–334. 1998.
- KUBO T, NISHIMURA S, KUMAGAE Y ET AL 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. Journal of Neuroscience Research. 70:474–483. 2002.

- LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 8, 499-509. 2007.
- LEE CC, KUO YM, HUANG CC, ET AL. Insulin rescues amyloid b-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *Neurobiol Aging*. 30:377–387. 2009.
- LEE, Y.J.; HAN, S.B.; NAM, S.Y.; OH, K.Y.; HONG, J.T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 33: 1539-1556, 2010.
- LIN MT, BEAL MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 19:787-95. 2006.
- LIU Q, ZHAO B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British journal of pharmacology*. 141:746-754. 2004.
- LOPES, MARCOS A. AND BOTTINO, CÁSSIO M.C.. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000. *Arquivos Neuro-Psiquiatria*. 60: 61-69. 2002.
- MARTIN SE, DE FIEBRE NE, AND DE FIEBRE CM The 7 nicotinic acetylcholine receptor-selective antagonist, methyllycaconitine, partially protects against -amyloid1–42 toxicity in primary neuron-enriched cultures. *Brain Research* 1022:254–256. 2004.
- MATSUOKA Y, PICCIANO M, LA FRANCOIS J, DUFF K. Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*.104: 609-13, 2001.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639, 2004.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639, 2004.
- MIELKE, M. M.; VEMURI, P..ROCCA, W. A. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology*. 6: 37, 2014.
- MIRANDA, S., OPAZO, C., LARRONDO, L.F. ET AL. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid b-peptide in Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 62, 633-648. 2000.

- MOHSENZADEGAN M, MIRSHAFIEY A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran Journal of Allergy Asthma Immunology* 11:203–216. 2012.
- MÖLLER, H.J.; GRAEBER, M.J. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248: 111-122, 1998.
- NASSIF, M.; HOPPE, J.; SANTIN, K.; FROZZA, R.; ZAMIN, L.L.; SIMÃO, F.; HORN, A.P.; SALBEGO, C. β -amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 β , and PTEN. *Neurochem Int* 50: 229-235, 2007.
- NORABERG J, KRISTENSEN BW, ZIMMER J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Research Protocols*. 3:278-90.1999.
- 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. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 4: 435-452, 2005.
- PALMER AM, ET AL. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry* 66: 137–147. 1999.
- PHILIPSON, O.; LORD A, GUMUCIO, A.; O' CALLAGHAN, P.; LANNFELT, L.; NILSSON, L.N. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *Febs Journal* 277:1389-1409, 2010
- 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. *Journal of Neurochemistry* 64: 253-265, 1995.
- RUSTED JM, NEWHOUSE PA, AND LEVIN ED Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behavior Brain Research*. 113:121–129. 2000.
- SCHEVELBEIN, H., Nicotine, resorption and fate. *Pharm. Ther.* 18, 233–248. 1982.

- SELKOE DJ, WALSH DM, Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 181-93. 2004,
- SILVA, T.; REIS, J.; TEIXEIRA, J..BORGES, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. *Ageing research reviews*, 15: 116-145, 2014.
- SINGH IN, SORRENTINO G, SITAR DS, KANFER JN. (-)Nicotine inhibits the activations of phospholipases A2 and D by amyloid beta peptide. *Brain Research*. 3:275-81. 1998.
- STADTMAN ER, BERLETT BS. (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemistry Research Toxicology*. 10:485-94. 1997.
- STOPPINI, L.; BUCHS, P.A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal Neurosciense Methods* 37: 173-182, 1991.
- SWERDLOW RH. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 12:1630-9. 2011
- TAKADA-TAKATORI Y ET AL Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmzology*, 51:474-486. 2006.
- TSETLIN V, KUZMIN D, KASHEVEROV I. Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem*. 116:734-741. 2011.
- VALENTIM, L.M., RODNIGHT, R., GEYER, A.B., HORN, A.P., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., NETTO, C.A. SALBEGO, C.G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen 84 and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118: 379-386, 2003.
- VAN DER FLIER, W. M.; PIJNENBURG, Y. A.; FOX, N. C..SCHELTENS, P. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing < i> APOE</i> ε4 allele. *The Lancet Neurology*. 10:280-288, 2011.
- VERGHESE, P. B.; CASTELLANO, J. M..HOLTZMAN, D. M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 10: 241-252, 2011.

- WANG, X.C.; ZHANG, Y.C.; CHATTERJIE, N.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; WANG, J.Z. Effect of melatonin and melatonylvalpromide on β -amyloid and neurofilaments in N2a cells. *Neurochem Res* 33: 1138-1144, 2007.
- WANG, X ET AL. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842 1240–1247, 2014.
- WANG HY, ET AL Amyloid1–42 binds to 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *The Journal of biological chemistry*. 275:5626–5632. 2000.
- WEVERS A, ET AL Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. *The European journal of neuroscience*. 11:2551–2565. 1999.
- ZHANG, H.; MA, Q.; ZHANG, Y. W..XU, H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry*. 120: 9-21. 2012.
- ZHANG, Y.-W.; THOMPSON, R.; ZHANG, H..XU, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*. 4: 3. 2011.
- ZHAO Y, ZHAO B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 316523, 2013
- ZHOU, Z.-D.; CHAN, C. H.-S.; MA, Q.-H.; XU, X.-H.; XIAO, Z.-C..TAN, E.-K. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease (AD). *Cell adhesion & migration*. 5:280, 2011.