

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

Investigação do efeito neuroprotetor da melatonina em modelo *in vitro* de toxicidade do peptídeo β -amilóide

JULIANA BENDER HOPPE

Porto Alegre, fevereiro de 2009

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

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA MELATONINA EM MODELO *IN VITRO* DE TOXICIDADE DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE

Juliana Bender Hoppe

Orientadora: Dra. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Susana Tchernin Wofchuk

(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Prof. Dr. Cristoforo Scavone

(Universidade de São Paulo)

Porto Alegre, fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Christianne pela orientação, por toda dedicação, amizade, paciência e pelo exemplo de ética e competência.

Aos meus colegas do laboratório 37: Ana Paula, Ricardo, Daniéli, Fabrício, Thaline, Patrícia, Aline, Guilherme, Mariana por toda ajuda, conversas, risadas e apoio durante este tempo.

Em especial ao meu colega Rudimar pela fundamental ajuda de todas as horas, por todo conhecimento compartilhado, pelas dicas e ensinamentos de sempre. Teu apoio foi muito importante para a realização deste trabalho!

À Andressa e à Profa. Dra. Maria Martha Campos por toda ajuda e colaboração nos experimentos de dosagem de citocinas.

À Melissa, com quem iniciei na pesquisa científica, por todos os ensinamentos e pela amizade.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica – UFRGS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus amores – Mãe, Pai, Cacá e Andrey – por toda a força, o apoio e o incentivo de sempre e sem medirem esforços, vocês me completam!

RESUMO

O aumento da longevidade da população mundial tem como conseqüência uma maior prevalência de doenças neurodegenerativas. A Doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa mais prevalente e a principal causa de demência após os 60 anos. A DA caracteriza-se por um crescente declínio na função mental e memória do paciente. Esses sintomas são explicados por uma marcante perda neuronal e pela presença de alterações estruturais no tecido cerebral: os emaranhados neurofibrilares (NFTs) intracelulares constituídos pela proteína *tau* hiperfosforilada e as placas senis extracelulares constituídas pela proteína beta-amilóide (A β). Estudos recentes têm evidenciado que um processo inflamatório crônico, desencadeado pelo acúmulo de A β , possui um papel central no processo neurodegenerativo da DA. Alguns dos componentes característicos da neuroinflamação na DA são astrogliose, microgliose e elevação dos níveis de citocinas. Estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças do SNC têm sido amplamente pesquisadas. Dentre essas moléculas a melatonina tem demonstrado potencial atividade neuroprotetora, porém os mecanismos celulares e moleculares para esta atividade permanecem pouco conhecidos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito neuroprotetor da melatonina em modelo *in vitro* de toxicidade do A β 25-35. Para esse propósito foram utilizadas culturas de hipocampo de rato tratadas cronicamente com melatonina, nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M ou 100 μ M, e expostas a 25 μ M do peptídeo A β por 6h, 12h, 24h ou 48h. A morte celular foi quantificada pela medida da incorporação de iodeto de propídeo (IP), um marcador de morte celular. Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com melatonina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M preveniu a morte celular induzida pela exposição das culturas organotípicas de hipocampo de rato ao peptídeo A β por 48h. A melatonina em todas as concentrações usadas nesse trabalho preveniu a hiperfosforilação da proteína *tau* induzida pela exposição por 48h ao peptídeo A β . A ativação da GSK-3 β observada após 12h de exposição ao A β 25-35 foi prevenida pelo pré-tratamento com 100 μ M de melatonina. Uma significativa ativação glial foi observada após 48h de exposição das culturas organotípicas ao A β , evidenciado através do aumento do imunoconteúdo da GFAP e da reatividade da Isolectina B₄, enquanto que o tratamento com melatonina 100 μ M foi capaz de prevenir a ativação de astrócitos e microglia. Os níveis de TNF- α mostraram-se aumentados após 24h e 48h de exposição ao A β e foi observada redução significativa desses nas culturas pré-tratadas com melatonina 100 μ M. Os níveis de IL-6 aumentaram apenas após 48h de exposição ao A β 25-35, sendo esse efeito prevenido pela melatonina na concentração de 100 μ M. O tratamento das culturas com melatonina por 14 dias antes da exposição ao peptídeo A β 25-35 apresentou efeito neuroprotetor no modelo *in vitro* de toxicidade ao peptídeo beta-amilóide. Embora mais estudos sejam necessários para compreensão do mecanismo neuroprotetor da melatonina nessa patogênese, os resultados desse trabalho sugerem que a melatonina possa exercer sua neuroproteção através da inibição da hiperfosforilação da proteína *tau*, diminuição da atividade da GSK-3 β , prevenção da ativação de astrócitos e da microglia e inibição da liberação dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6.

ABSTRACT

The increase of the average life expectancy of the world-wide population has been followed by increase in the prevalence of neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent age-related neurodegenerative disorder affecting people 60 years and older. The AD is characterized for an increasing decline in the mental function and memory of the patient. These symptoms are explained by a marked neuronal loss and the presence of structural alterations in the cerebral tissue: the intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) of the hyperphosphorylated protein *tau* and extracellular amyloid-beta ($A\beta$) into senile plaques. Recent evidence suggests that a chronic inflammatory process, triggered by $A\beta$ deposition, plays an important role in the pathogenesis of AD. Neuroinflammation associated with AD is characterized by astrogliosis, microgliosis and cytokine elevation. Therapeutic strategies for the treatment of CNS diseases have been widely researched. Substantial evidence indicates that melatonin has neuroprotective effects; however, the cellular and molecular mechanisms remain poorly informed. Therefore, the present work was designed to investigate the neuroprotective effects in an *in vitro* model of toxicity by $A\beta_{25-35}$. For this purpose, organotypic slice cultures of rat hippocampus were treated chronically with melatonin, 25 μ M, 50 μ M or 100 μ M, and then exposed to 25 μ M of $A\beta_{25-35}$ for 6h, 12h, 24h or 48h. Cell death was quantified by measuring propidium iodide (PI) uptake, a marker of necrotic dead cell. The results of the present study had shown that the pretreatment with melatonin, at concentrations of 50 μ M and 100 μ M, prevented cell damage in hippocampus induced by the exposure to 25 μ M of $A\beta_{25-35}$ for 48h. The treatment with melatonin in all the concentrations prevented the hyperphosphorylation of protein *tau* induced by 25 μ M of $A\beta_{25-35}$ peptide. Melatonin also prevents GSK-3 β activation after 12h of $A\beta$ exposition. A marked glial activation was showed after exposure of hippocampal cultures to $A\beta_{25-35}$ for 48h, as evidenced by GFAP and Isolectin B₄ increase in reactivity, and the treatment with 100 μ M of melatonin prevented the activation of astrocytes and microglia. The exposure to 25 μ M of $A\beta_{25-35}$ for 24h and 48h increased the TNF- α concentration in the medium and the pretreatment with 100 μ M of melatonin significantly reduced the levels of this cytokine after 48h of exposure to peptide. In addition, IL-6 levels increased only after 48h of exposition to $A\beta_{25-35}$ and the pretreatment with 100 μ M of melatonin also prevented this increase. The treatment of cultures with melatonin for 14 days before the peptide exposure exercised neuroprotective effects in the *in vitro* model of toxicity by $A\beta_{25-35}$. Although further studies are necessary for understanding the neuroprotective mechanisms in AD, the data suggests that the melatonin could to exert neuroprotection through the inhibition of *tau* hyperphosphorylation, reduction of GSK-3 β activity, prevent microglial and astroglial activation and reduce the release of pro-inflammatory factors, as TNF- α and IL-6.

LISTA DE ABREVIATURAS

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

A β 1-40 – peptídeo beta-amilóide contendo 40 aminoácidos

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

AINEs – antiinflamatórios não-esteroidais

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

APP – proteína precursora amilóide

APPs α - forma secretada da APP α

APPs β – forma secretada da APP β

Apo E – apolipoproteína E

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

BHE – barreira hematoencefálica

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

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

CSF – fluido cérebro espinhal (*Cerebrospinal Fluid*)

DA – Doença de Alzheimer

DMSO – dimetilsulfóxido

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

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

IL – interleucina (*interleukin*)

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

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

iNOS – óxido nítrico sintase induzível (*Inductible Nitric Oxide Synthase*)

IP – Iodeto de Propídeo (*Propidium iodide*)

JNK – Proteína quinase c-Jun NH₂-terminal (*Jun N-terminal Kinase*)

MAOA – monoamina oxidase A

MAPKs – proteínas cinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

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

NFTs – emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary Tangles*)

NF- κ B – Fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)

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

NO – óxido nítrico

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

PDPK - proteínas cinases dependentes de prolina (*Proline-Directed Protein Kinase*)

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

PP-2A – proteína fosfatase 2A (*Protein Phosphatase 2A*)

PS – presenilina (*Presenilin*)

p38 MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (*p38 Mitogen Activated Protein Kinase*)

SNC – sistema nervoso central

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

TNF- β – fator de necrose tumoral beta (*Tumoral Necrosis Factor-beta*)

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações morfológicas características do tecido cerebral na DA.....	3
Figura 2. Geração do peptídeo A β a partir do processamento da APP.....	5
Figura 3. Despolimerização dos microtúbulos e hiperfosforilação da <i>tau</i>	7
Figura 4. Esquema do efeito neuroprotetor da melatonina sobre a toxicidade do peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de ratos.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Alzheimer: histórico, prevalência e principais características.....	1
1.2. Peptídeo beta-amilóide: processamento e hipótese da cascata amilóide.....	4
1.3. Proteína <i>tau</i> : atividade de cinases/fosfatases e hiperfosforilação.....	6
1.4. Doença de Alzheimer e Neuroinflamação.....	9
1.5. Melatonina e Doença de Alzheimer.....	11
1.6. Modelos para investigação da toxicidade do A β e peptídeos sintéticos.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Materiais.....	17
3.2. Modelo de lesão induzida pelo peptídeo A β e tratamento das culturas.....	17
3.3. Western Blotting.....	18
3.4. Análise da reatividade da Isolectina B4 em células microgliais.....	19
3.5. Determinação dos níveis de citocinas no meio de cultivo.....	20
3.6. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Artigo Científico a ser submetido ao periódico <i>Neurochemistry International</i>	21
β -amyloid neurotoxicity in organotypic hippocampal slice culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , tau and neuroinflammation.....	22

5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	69
7. PERSPECTIVAS.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXO.....	87
9.1. Normas do Periódico <i>Neurochemistry International</i> , no qual o artigo científico será submetido.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer: histórico, prevalência e principais características

Em 1906, durante o 37º Congresso do Sudoeste da Alemanha de Psiquiatria em Tübingen, Alemanha, o médico alemão Alois Alzheimer apresentou pela primeira vez as características clínicas e neuropatológicas da doença, que anos mais tarde Emil Kraepelin nomeou de Doença de Alzheimer em homenagem ao seu descobridor. Durante sua conferência, Alzheimer definiu seu achado como uma patologia neurológica não reconhecida, que cursa com demência, e destacou os sintomas de déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Esses sintomas foram observados em uma paciente de 51 anos, admitida por Alzheimer no Hospital de Frankfurt em 1901, apresentando perda de memória progressiva, delírios e alucinações. Em 1906, após a morte da paciente seu cérebro foi analisado através de coloração de prata, desta forma Alzheimer identificou as duas principais características neuropatológicas da doença: as placas senis e os emaranhados neurofibrilares (MÖLLER and GRAEBER, 1998; GOEDERT and SPILLANTINI, 2006).

O aumento da longevidade da população mundial, evidenciado nestas últimas décadas, tem como consequência uma maior prevalência das doenças neurodegenerativas. Dentre essas, a Doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa mais comum e a principal causa de demência após os 60 anos de idade (FORMAN et al., 2004). A DA atinge atualmente entre 20 a 30 milhões de pessoas em todo o mundo, e considerando o crescente aumento da expectativa de vida da população, as estimativas indicam que o número de pessoas afetadas pela doença possa triplicar nos próximos 50 anos. A prevalência da doença aumenta com o avanço da idade, afetando aproximadamente 1% a 3% da população na sexta década

de vida, 3% a 12% da população entre 70 a 80 anos e mais de 20% a 35% com mais de 85 anos. Nos países desenvolvidos, a DA representa a terceira causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer (MATTSON, 2004; WALSH and SELKOE, 2004; MOUNT and DOWNTON, 2006). Os números relacionados à DA demonstram sua grande importância, constituindo-se um dos grandes desafios atuais e futuros sob o ponto de vista da saúde pública.

As manifestações da DA iniciam com leves déficits de memória, primeiramente afetando a memória de curto prazo. Os primeiros sintomas geralmente surgem como déficits sutis e intermitentes em lembrar pequenos eventos do cotidiano. Nos estágios mais avançados, há o desenvolvimento progressivo de uma profunda demência afetando as esferas cognitivas e comportamentais. O cérebro de um paciente com DA apresenta atrofia generalizada macroscopicamente visível, envolvendo regiões cerebrais associadas ao processo de aprendizagem e memória, incluindo córtex, hipocampo e amígdala. O reduzido volume cerebral é decorrente de uma profunda degeneração de sinapses e morte neuronal (MATTSON and CHAN, 2003; MATTSON, 2004; HENEKA and O'BANION, 2007).

A DA constitui um quadro complexo envolvendo a combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. 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. Porém, a maioria dos casos de DA são esporádicos, sendo o envelhecimento o principal fator de risco. Além do avanço da idade, vários fatores de risco estão relacionados à DA: baixa escolaridade, sexo feminino, sedentarismo, diabetes mellitus, hipertensão arterial, e outros, além de fatores genéticos. Quanto aos últimos, estão incluídas anormalidades em genes relacionados com a proteína precursora amilóide (APP), presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2),

apolipoproteína E (ApoE). (CITRON, 2002; CASSERLY and TOPOL, 2004; BLENNOW et al., 2006).

Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas para um diagnóstico definitivo da DA. Esse só é obtido com a demonstração das alterações histopatológicas encontradas por Alzheimer: as placas senis e os emaranhados neurofibrilares (LAFERLA et al., 2007) (Figura 1). As placas senis, extracelulares, são formadas através do acúmulo e agregação do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$), formando filamentos cercados por neuritos distróficos, microglia ativada e astrócitos reativos. Enquanto que os emaranhados neurofibrilares são formados pela deposição da proteína *tau*, cuja principal função é estabilizar os microtúbulos responsáveis por modular a organização funcional do neurônio. Porém na DA, a *tau* encontra-se hiperfosforilada desprendendo-se dos microtúbulos, acumulando-se intracelularmente na forma de filamentos emaranhados helicoidais pareados (PHIEL et al., 2003; SELKOE and SCHENK, 2003).

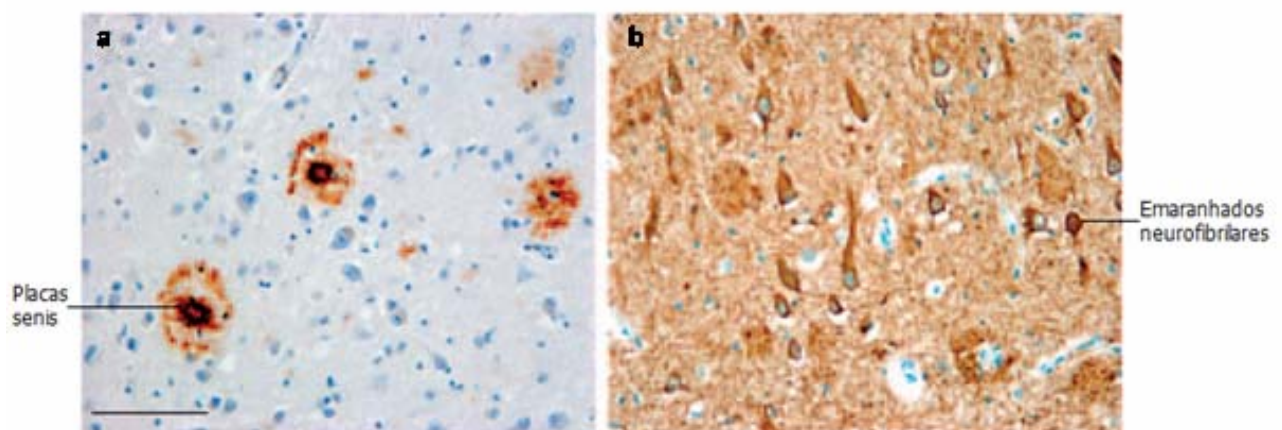


Figura 1. Alterações morfológicas características do tecido cerebral na DA. a Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do peptídeo $A\beta$. **b** Emaranhados neurofibrilares intracelulares constituídos pela proteína *tau* hiperfosforilada. Escala 100 μ m (Adaptada de HAASS and SELKOE, 2007).

1.2 Peptídeo beta-amilóide: processamento e hipótese da cascata amilóide

Compreender os mecanismos moleculares pelos quais essas alterações patológicas comprometem a função e integridade neuronal e levam aos sintomas clínicos observados na DA tem sido uma busca de longo prazo na investigação dessa patologia. Apenas na década de 80 descobriu-se que as placas senis ou placas neuríticas consistiam de agregados de um pequeno peptídeo, o beta-amilóide (A β) (LAFERLA et al., 2007).

O peptídeo A β é produzido pela endoproteólise da proteína precursora amilóide (*Amyloid Precursor Protein* – APP), uma glicoproteína transmembrana amplamente expressa na superfície celular de neurônios e glia. A clivagem e processamento da APP podem ser divididos em duas vias distintas: a via amiloidogênica e a via não-amiloidogênica. O processamento proteolítico anormal, ou amiloidogênico, da APP ocorre através da ação seqüencial de duas proteases denominadas β -secretase (BACE 1) e γ -secretase, resultando na secreção do A β em fragmentos amilóides de 38 a 43 aminoácidos (HAASS et al. 1992; SHOJI et al., 1992; HERZ and BEFFERT, 2000). O peptídeo A β mais produzido durante esse processamento é o peptídeo contendo 40 aminoácidos (A β 1-40) que não é associado à formação das placas, enquanto que uma pequena porção contém 42 aminoácidos (A β 1-42). O peptídeo A β 1-42 é a forma mais hidrofóbica e a mais propensa a formar fibrilas, além de ser o principal responsável pela formação das placas senis. Na via prevalente, não amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre na região central do domínio do peptídeo A β pela α -secretase, impedindo a liberação do peptídeo A β (LAFERLA et al., 2007) (Figura 2).

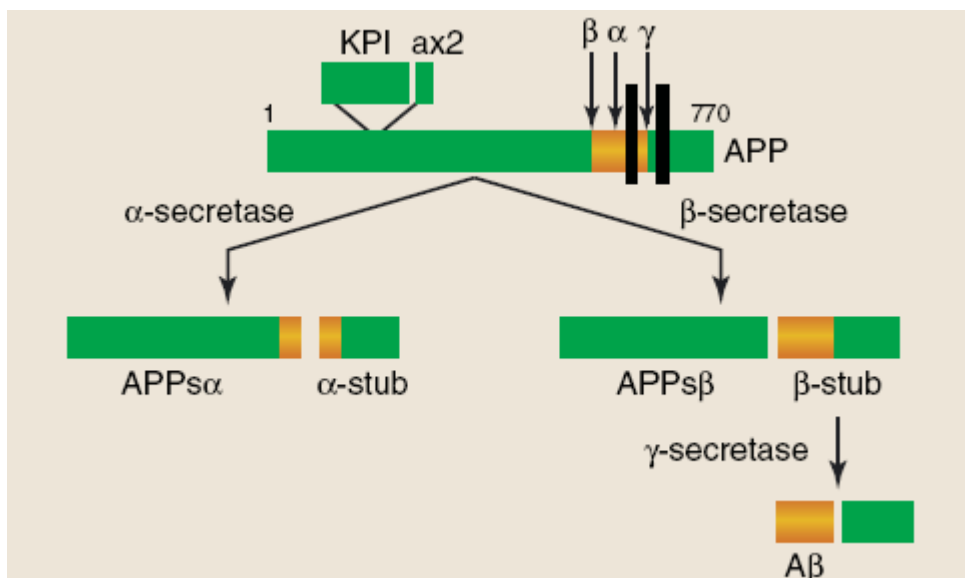


Figura 2. Geração do peptídeo A β a partir do processamento da APP. Processamento amiloidogênico, através da β -secretase e γ -secretase, gerando o peptídeo A β . Processamento não amiloidogênico, mediado pela α -secretase, não havendo geração do peptídeo A β (Adaptado de GOEDERT and SPILLANTINI, 2006).

O peptídeo A β gerado através do processamento da APP encontra-se no estado monomérico. Porém, sua habilidade de existir em outras formas estruturais (oligômeros, protofibrilas e fibrilas) é uma característica exclusiva que define a DA. O processo que converte o peptídeo A β de sua forma relativamente inerte, monomérica, para seu estado patogênico, estados intermediários e fibrilas, é um complexo processo de nucleação. O mecanismo desse processo, ainda não é conhecido, mas parece requerer transições estruturais do peptídeo A β através de dobramento protéico. No estado monomérico, o peptídeo A β parece não exercer efeitos tóxicos, enquanto que as espécies solúveis, oligoméricas e protofibrilares, já demonstraram capacidade de interferir na plasticidade sináptica, através do bloqueio de potenciais de longa duração. Na forma de fibrilas, insolúveis, o peptídeo A β possui a capacidade de se autoagregar formando as placas senis (FUENTEALBA et al., 2004; LAFERLA et al., 2007; ECKERT et al., 2008).

Muitas evidências indicam o papel principal do peptídeo A β no desencadeamento do processo neurodegenerativo da DA. A hipótese da cascata amilóide defende que esse processo é resultado do acúmulo, agregação e toxicidade do peptídeo A β iniciados a partir do processamento anormal da APP. Desta forma, um aumento acentuado dos níveis cerebrais do peptídeo A β , ou por aumento da produção de A β 1-42 e/ou por redução da degradação, levaria a uma maior formação de oligômeros com alterações na função sináptica e na sinalização celular. Em paralelo, ocorreria a formação das fibrilas, com conseqüente, acúmulo e deposição em forma de placas, nas quais se observa uma resposta inflamatória local caracterizada por microgliose e astrogliose. A progressão da doença ocorre com dano sináptico e neuronal, acompanhada da perda da homeostase iônica e injúria oxidativa. O aumento dos níveis de A β é acompanhado por alterações na atividade de cinases e fosfatases, levando a hiperfosforilação da *tau* e formação dos emaranhados neurofibrilares com conseqüente dano no transporte axonal. Desse modo, os eventos da cascata amilóide causam disfunção sináptica e neuronal generalizada, perda seletiva de neurônios e importante déficit de neurotransmissores que culminam em demência com placas senis e emaranhados neurofibrilares (HARDY and SELKOE, 2002; MATTSON and CHAN, 2003; HAASS and SELKOE, 2007).

1.3 Proteína *tau*: atividade de cinases/fosfatases e hiperfosforilação

Os emaranhados neurofibrilares são constituídos principalmente pela deposição de filamentos helicoidais pareados da proteína *tau* hiperfosforilada. Em neurônios ela é normalmente encontrada em axônios, porém na DA e outras taupatias ela se redistribui para o corpo celular e dendritos, em função de seu desprendimento dos microtúbulos. A proteína tau é responsável por estabilizar os microtúbulos do citoesqueleto neuronal,

sendo essa função regulada por um processo de fosforilação e desfosforilação. O citoesqueleto possui a função chave de manter a forma e a polaridade estrutural dos neurônios, essenciais para a fisiologia neuronal. Na DA um desequilíbrio nas atividades cinase/fosfatase parece levar a hiperfosforilação da proteína *tau*, a qual nesse estado desprende-se dos microtúbulos, acumula-se no soma, forma filamentos helicoidais pareados e leva à desorganização do citoesqueleto celular e comprometimento do transporte axonal. A formação dos emaranhados neurofibrilares parece ser um evento secundário na DA, desencadeado pelo acúmulo do peptídeo A β 1-42 e deposição em placas senis que podem acelerar a agregação da *tau* e formação dos emaranhados (FERRARI et al., 2003; LI et al., 2004; GOLDE, 2007; HOOPER et al., 2008) (Figura 3).

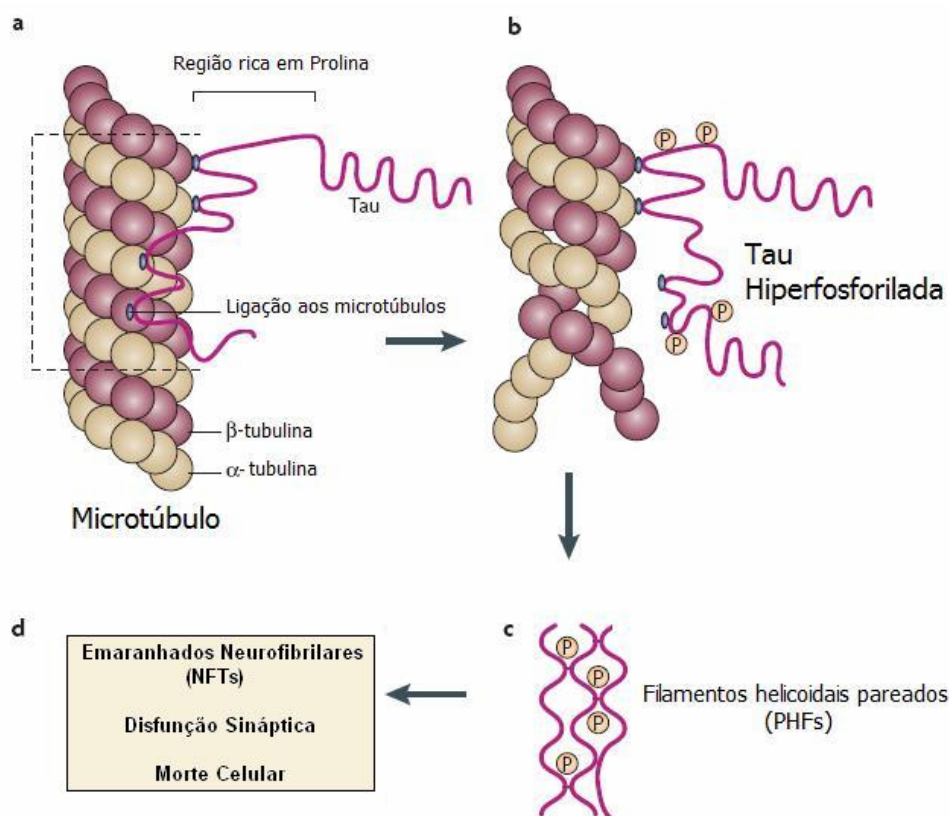


Figura 3. Despolimerização dos microtúbulos e hiperfosforilação da *tau*. **a** A proteína *tau* estabiliza o microtúbulos que dão suporte aos neurônios. **b** Fosforilação em sítios serina/treonina desestabilizam os microtúbulos. **c** Proteína *tau* hiperfosforilada se dissocia dos microtúbulos formando filamentos helicoidais pareados (PHFs). **d** Formação de agregados insolúveis, os emaranhados neurofibrilares (NFTs), contribuindo para a disfunção sináptica e morte celular observada na DA (Adaptado de MAZANETZ e FISCHER, 2007).

A proteína *tau* possui mais de 30 sítios de fosforilação, dos quais próximo da metade são em motivos formados por um resíduo serina ou treonina seguido de uma prolina (Ser/Thr-Pro) e, dessa maneira, fosforilados por proteínas cinases dependentes de prolina (PDPK). A proteína *tau* já demonstrou poder ser fosforilada *in vitro* por muitas proteínas cinases. Dentre essas, acredita-se que a cinase 5 dependente de ciclina (cdk5) e a glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) sejam as mais importantes cinases na regulação da fosforilação da *tau* no cérebro. Essas duas cinases são capazes de fosforilar a proteína *tau* em muitos de seus sítios de fosforilação (Thr-181, Ser-199, Ser-202, Thr-212, Ser-214, Thr-217, Thr-231, Ser-396, Ser-404) (LIU et al., 2002; HAMDANE et al., 2003; MAZANETZ e FISCHER, 2007).

GSK-3 β é considerada a principal cinase na função de manter a estabilidade da proteína *tau*, além disso, é capaz de fosforilar a *tau* em ambos os sítios não Ser/Thr-Pro e nos Ser/Thr-Pro. A enzima GSK-3 β foi originalmente identificada como um modulador do metabolismo do glicogênio. Essa cinase multifuncional, e altamente expressa no cérebro, também está envolvida em importantes processos celulares e em uma variedade de vias intracelulares incluindo desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e apoptose. A GSK-3 β é considerada uma enzima pró-apoptótica por inibir uma variedade de fatores de transcrição importantes para a sobrevivência celular. A GSK-3 β encontra-se ativa quando desfosforilada, mas pode ser inibida através de aumento da fosforilação no sítio específico Ser-9 pela Akt/PKB na via de sobrevivência celular, fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) e também por regulação negativa pela via de sinalização Wnt (WAGMAN et al., 2004; LI et al., 2002; CRESPO-BIEL et al., 2007).

Entre as proteínas fosfatases, a proteína fosfatase 2A (PP-2A) tem sido mostrada como a principal fosfatase encontrada no cérebro. A PP-2A equivale a

aproximadamente 70% da atividade fosfatase total sobre a proteína *tau*, enquanto PP-1, PP-2B e PP-5 representam apenas 10% dessa atividade. As causas que levam a diminuição da atividade da PP-2A na DA ainda não estão claras, mas já foi demonstrado que a PP-2A se encontra em um complexo com receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e que a estimulação desse receptor pode levar a dissociação da PP-2A do complexo reduzindo a atividade dessa fosfatase (CHAN and SUCHER, 2001; GONG et al., 2006).

1.4 Doença de Alzheimer e Neuroinflamação

Um processo inflamatório crônico, desencadeado pelo acúmulo e deposição do peptídeo A β , parece ter importante contribuição no processo neurodegenerativo da DA. Os principais mediadores da inflamação observada na DA são os astrócitos reativos e a microglia ativada circundantes às placas senis (AKIYAMA et al., 2000; WYSS-CORAY, 2006; ZAHEER et al., 2008).

A inflamação associada ao sistema nervoso central (SNC), neuroinflamação, difere da encontrada em outros tecidos e órgãos periféricos. A neuroinflamação é exclusivamente mediada por células residentes cerebrais. A barreira hematoencefálica (BHE), a qual separa o cérebro da periferia, previne não somente agentes nocivos como também leucócitos circulantes e anticorpos de entrarem no cérebro. Além disso, o cérebro não possui fibras nociceptivas, dificultando o reconhecimento da ocorrência de uma inflamação, como também, no SNC não ocorrem os sinais clássicos de inflamação como rubor, tumor, calor e dor (TUPPO and ARIAS, 2005; LEE et al., 2008).

A inflamação no cérebro pode apresentar funções antagônicas, neuroprotetora ou neurotóxica. Quando a neuroinflamação está controlada e bem balanceada, pode contribuir significativamente para o reparo do tecido após uma injúria cerebral. Porém,

uma resposta inflamatória crônica pode provocar danos excessivos aos tecidos saudáveis circundantes ao local da inflamação (GOLDE, 2002; PARK et al., 2007).

Na DA, tem sido proposto que uma fagocitose ineficiente do A β pela microglia, a conseqüente ativação microglial e liberação de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos, contribuiria de maneira decisiva na progressão da DA. Uma vez ativa, a microglia pode também recrutar os astrócitos que ativamente aumentam a resposta inflamatória aos depósitos de A β (AKIYAMA et al., 2000). De acordo com essa hipótese, já foi demonstrado aumento nos níveis de diversos mediadores pró-inflamatórios no cérebro de pacientes com DA. Além de diversos estudos clínicos indicarem que o tratamento prolongado com alguns antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) é capaz de reduzir a prevalência da DA (MCGEER and MCGEER, 2001; MOORE and O'BANION, 2002; GALIMBERTI et al., 2003).

O componente neuroinflamatório presente na DA é caracterizado, além da ativação glial, por uma resposta local de fase aguda mediada por citocinas, ativação do sistema complemento, liberação de glutamato, indução de enzimas inflamatórias como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxygenase-2 (COX-2), com conseqüente aumento da geração de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MCGEER and MCGEER, 2003; ROCK et al., 2004; HENEKA and O'BANION, 2007).

Dentre esses mediadores, as citocinas são uma família de proteínas que incluem as interleucinas (ILs), TNF- α e TNF- β . Na DA, as citocinas são secretadas pelos astrócitos reativos e microglia ativada circundantes às placas senis e possuem a função de regular a intensidade e duração da resposta imune no cérebro (TUPPO and ARIAS, 2005; HENEKA and O'BANION, 2007). TNF- α é o principal agente neurotóxico secretado pela microglia ativada estimulada pelo peptídeo A β (JIANG et al., 2008). As citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, são responsáveis por iniciar e propagar um ciclo

vicioso no processo amiloidogênico, no qual a ativação de microglia e astrócitos estimula uma maior produção dessas citocinas causando um aumento na deposição do peptídeo A β que ativará mais células gliais com conseqüente amplificação do ciclo e perpetuação da neuroinflamação e dos eventos neurodegenerativos (GUO et al., 2002; HENEKA and O'BANION, 2007). Além disso, o aumento dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α observados na DA, devido à ativação glial crônica, não parece ser meramente conseqüência do processo degenerativo, mas ter função importante na cascata de eventos que levam a morte neuronal por ativação de vias de transdução de sinal, como as vias de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (DEL BO et al., 1995; XIE et al., 2004).

1.5 Melatonina e Doença de Alzheimer

O desenvolvimento de terapias efetivas para a DA representa um grande desafio atual e futuro, visto o grande número de pessoas afetadas atualmente pela DA e diante das evidências do aumento significativo de pessoas com essa patologia nas próximas décadas. As terapias atuais para a DA apenas fornecem benefícios discretos para os sintomas clínicos da doença, particularmente nos estágios iniciais. Infelizmente, ainda não existem terapias capazes de afetar o desenvolvimento do processo neurodegenerativo dessa desordem, diante dessa realidade, muitas estratégias terapêuticas com o objetivo de retardar ou impedir a neurodegeneração têm sido amplamente pesquisadas (XIANG et al., 2002; REFOLO and FILLIT, 2004).

Dentre os muitos compostos investigados, os efeitos neuroprotetores da melatonina na DA têm sido objeto de muita pesquisa na última década. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio lipofílico produzido e secretado principalmente pela glândula pineal (BARRENETXE et al., 2004). Melatonina é apenas

secretada durante a fase escura do dia, e possui importantes funções biológicas como regulação do ritmo circadiano, sono, humor, envelhecimento e reprodução (EPSTEIN, 1997; REITER, 2003).

Estudos demonstram que os níveis de melatonina secretados pela glândula pineal ao fluido cérebro espinhal (*Cerebrospinal fluid* - CSF) podem ser até 50 vezes maiores que os medidos simultaneamente no plasma. Indicando que o cérebro pode ter muito maiores concentrações de melatonina e possa ser mais sensível a mudanças nessas concentrações que outros tecidos. Tem sido proposta a existência de dois compartimentos distintos de ação da melatonina, os quais afetam de forma diferente as funções fisiológicas: no plasma, a melatonina deve agir principalmente nos órgãos periféricos, enquanto que no CSF ela pode exercer suas funções nas células neurais numa concentração mais elevada (SRINIVASAN et al., 2006).

A melatonina apresenta diversas atividades farmacológicas, dentre as quais a mais estudada é sua importante propriedade antioxidante atuando como um potente seqüestrador de radicais livres e na regulação de enzimas antioxidantes. Na neuroinflamação a melatonina foi pouco estudada até agora, mas já foi demonstrada sua capacidade em reduzir ativação glial, produção de NO e os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias na isquemia e em alguns modelos de toxicidade do A β (CLAPP-LILLY et al., 2001a; JESUDASON et al., 2007; RODRÍGUEZ et al. 2007; SHEN et al., 2007; GUNASINGH et al, 2008).

Também é atribuída a melatonina a capacidade de agir diretamente sobre a toxicidade induzida pelo A β , através de uma possível interação conformacional entre as duas moléculas prevenindo a fibrilogênese. Além disso, já foi demonstrada a ação da melatonina contra a hiperfosforilação da proteína *tau* induzida por agentes químicos,

podendo essa ação ser através da regulação direta de cinases e fosfatases (CHENG et al., 2006; WANG and WANG, 2006).

Os estudos investigando o possível efeito neuroprotetor da melatonina na DA, estão baseados na redução de seus níveis durante o envelhecimento, especialmente, em pacientes com DA que apresentam profunda redução desse hormônio. Alterações no relógio biológico e na glândula pineal durante o envelhecimento são consideradas essenciais para os distúrbios do ritmo circadiano. O declínio da produção de melatonina relacionada ao envelhecimento pode ser um dos principais fatores que contribuem para o aumento do estresse oxidativo e efeitos degenerativos observados com o envelhecimento e especialmente na DA. De forma interessante, o nível de melatonina no CSF diminui com a progressão da DA. Estudos mostraram níveis de melatonina diminuídos no CSF em estágios pré-clínicos da doença onde o paciente ainda não manifesta danos cognitivos, sugerindo que essa redução possa ser um marcador dos primeiros estágios da doença. Sugere-se que esta pronunciada diminuição dos níveis de melatonina na DA possa ser devido a uma desregulação da inervação noradrenérgica e pela depleção de serotonina, precursor da melatonina, através do aumento da atividade da monoamina oxidase A (MAOA) (PANDI-PERUMAL et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2006; WANG and WANG, 2006).

1.6 Modelos para investigação da toxicidade do A β e peptídeos sintéticos

O entendimento do mecanismo neurotóxico induzido pelo peptídeo A β , que parece iniciar o processo neurodegenerativo na DA, é essencial para o desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos. Com esse objetivo diversos modelos *in vitro* e *in vivo* de toxicidade do peptídeo A β 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.

Entre esses fragmentos, tem sido proposto que o peptídeo sintético de 11 aminoácidos (A β 25-35) represente a região biologicamente ativa do peptídeo A β 1-42 exercendo toxicidade similar ao peptídeo originado a partir do processamento anormal da APP (IVERSEN et al., 1995; PIKE et al., 1995; TOHDA et al., 2003). Assim o peptídeo A β 25-35 tem sido amplamente utilizado em modelos *in vitro* e *in vivo* de DA para estudo dos efeitos tóxicos e para o estudo de potenciais agentes neuroprotetores (JESUDASON et al., 2007; NASSIF et al., 2007; SHEN et al., 2007; FROZZA et al., *in press*; GUNASINGH et al., 2008).

Dentre os modelos utilizados para a compreensão dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do A β , os modelos animais de injeção intracerebral do peptídeo têm contribuído consideravelmente para esses avanços e possuem um papel importante na avaliação de eventuais agentes terapêuticos, não apenas de avaliar a demência associada a DA como de modificar o processo da doença (VAN DAM and DE DEYN, 2006).

Outra metodologia que vem sendo aplicada para estudar o desenvolvimento e progressão da DA consiste na utilização de modelos transgênicos capazes de induzir o acúmulo de A β no cérebro de animais. Os animais transgênicos empregados nesse modelo são principalmente ratos e camundongos que apresentam mutações em três genes relacionados com a DA, APP, PS1 e PS2 (GUO et al., 1999; WESTERMAN et al., 2002; JANKOWSKY et al., 2004).

Dentre os modelos *in vitro*, o modelo de cultivo de tecidos é uma importante alternativa para os modelos animais. Nesse modelo, são utilizados principalmente cultura organotípica de hipocampo, nas quais são mantidas a multiplicidade celular

original do tecido cerebral (incluindo microglia e astrócitos) e as conexões intraneurais que estão presentes *in vivo*, fornecendo inúmeras vantagens sobre culturas primárias e linhagens celulares na investigação dos fatores fisiológicos e compostos farmacológicos que possam contribuir para a plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal, bem como, para o entendimento das cascatas de sinalização envolvidas na DA (CLAPP-LILLY et al., 2001a; HOLOPAINEN, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito neuroprotetor da melatonina em modelo de cultura organotípica de hipocampo de ratos exposta ao peptídeo A β 25-35.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito do tratamento crônico de uma curva de dose de melatonina sobre a morte celular induzida pelo peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica;
- b) Investigar o efeito da melatonina na hiperfosforilação da proteína *tau* e sobre uma das principais cinases envolvidas nessa fosforilação, a GSK-3 β , no modelo de exposição do A β em cultura organotípica;
- c) Avaliar o potencial neuroprotetor da melatonina na neuroinflamação induzida pela exposição ao peptídeo A β , através da investigação de seu efeito na ativação de astrócitos e da microglia, bem como, na secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O peptídeo A β 25-35 foi obtido 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 foram comprados da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Dako Chemicals (Carpenteria, CA, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA) e BioSource. 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). O anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado à peroxidase foi adquirido da Cell Signaling Technology. A membrana de nitrocelulose Hybond-C foi obtida da Highbond[™]ECL[™] (Hybond[™]ECL[™] nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) e os filmes de raio-X foram obtidos da Kodak (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). A melatonina foi obtida da Calbiochem (San Diego, CA, USA).

3.2 Modelo de lesão induzida pelo peptídeo A β e tratamento das culturas

As culturas organotípicas de hipocampo de ratos foram preparadas e mantidas de acordo com método de interface, originalmente apresentado por Stoppini e colaboradores (1991) com algumas modificações (FROZZA et al., *in press*).

Brevemente, os hipocampus de ratos de 6-8 dias foram fatiados em 400µm através de um fatiador de tecido *McIlwain 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 de 28 dias a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio de cultivo trocado a cada três dias. A melatonina foi, primeiramente, dissolvida e dimetilsulfóxido (DMSO) absoluto e então diluído com água Milli-Q, sendo a concentração final de DMSO 0.01%. As culturas foram tratadas cronicamente com 25µM, 50µM ou 100µM de melatonina a partir do 14º dia de cultivo, sendo adicionada a cada troca de meio de cultivo. Após este período de maturação, as culturas foram expostas a 25µM do peptídeo Aβ25-35 por um período de 6h, 12h, 24h ou 48h (FROZZA et al., *in press*) A intensidade de morte celular foi analisada pela avaliação da incorporação do corante Iodeto de Propídio (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. O IP (5µM) foi adicionado ao meio de cultivo 2h antes do término dos períodos de exposição de 6h, 12h, 24h ou 48h ao peptídeo Aβ25-35. As culturas foram observadas em microscópio invertido 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>).

3.3 Western Blotting

Para a análise da fosforilação da proteína *tau*, da atividade da GSK-3β e da imunorreatividade da GFAP foi realizado o ensaio de *Western blotting*. Após a

obtenção das imagens fluorescentes, as fatias foram homogeneizadas em solução de lise (4% SDS, 2mM EDTA, 50 mM Tris) e uma alíquota foi retirada para determinação da quantidade de proteínas (Peterson, 1979). As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (12%). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparelho de transferência semi-seco (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). As membranas foram incubadas por 60 min a 4°C com solução de bloqueio (Tampão Tris contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween-20, pH 7,4) ou solução de albumina 5% em Tampão Tris seguido pela incubação durante 18h a 4°C com os anticorpos para as proteínas de interesse dissolvidos na solução de bloqueio. Após a incubação com os anticorpos primários para GFAP (1:2000; Dako Chemicals), anti-*tau* (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho *tau* (Ser199/202) (1:1000; BioSource), anti-GSK-3 β (1:1000, Cell Signaling Technology) e anti-phospho GSK-3 β (Ser 9) (1:1000, Cell Signaling Technology), as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários IgG conjugados à peroxidase por duas horas a 4°C. O ensaio de quimioluminescência foi detectado utilizando filmes de raio-X. Estes filmes foram escaneados e a intensidade das bandas foi analisado usando o programa Optiquant (Packard Instrument).

3.4 Análise da reatividade da Isolectina B₄ em células microgliais

A Isolectina B₄ (BSI-B₄) conjugada à peroxidase é usada como marcador específico de células microgliais do cérebro de ratos. Essa glicoproteína reconhece glicoconjugados associados à membrana contendo resíduos de α -galactose das células microgliais, mas não de outros tipos de células gliais (STREIT and KREUTZBERG, 1987; HAILER et al., 2005). Para detecção da Isolectina B₄, as

membranas foram incubadas durante 18h a 4°C em solução de albumina (5% de albumina e 2% de Tween em PBS, pH 7,4). Após a Isolectina B₄ conjugada à peroxidase foi incubada em PBS contendo 0,05% de Tween durante 18h a 4°C. O ensaio de quimioluminescência foi detectado utilizando filmes de raio-X. Estes filmes foram escaneados e a intensidade das bandas foi analisado usando o programa Optiquant (Packard Instrument).

3.5 Determinação dos níveis de citocinas no meio de cultivo

Para a determinação dos níveis de citocinas após 6h, 12h, 24h ou 48h de exposição ao A β 25-35 em cultura organotípica, os meios de cultivo foram recolhidos e rapidamente congelados a -20°C para posterior dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-1 β através de kits específicos de ELISA, de acordo com as recomendações do fornecedor (R&D Systems). Este ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Maria Martha Campos, no Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, PUCRS.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos nestes experimentos foram analisados estatisticamente pela Análise da Variância de uma via (ANOVA), seguidos pelo teste post-hoc Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

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

4.1 Artigo científico a ser submetido ao periódico *Neurochemistry International*

β -amyloid neurotoxicity in organotypic hippocampal slice culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , *tau* and neuroinflammation

Juliana Bender Hoppe¹, Rudimar Luiz Frozza¹, Ana Paula Horn¹, Ricardo Argenta Comiran¹, Andressa Bernardi¹, Maria Martha Campos², Ana Maria Oliveira Battastini³ and Christianne Salbego^{3,*}

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

²Faculdade de Odontologia, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 – Partenon - Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90619-900

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

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

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

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

Tel: +55-51-3308-5570

FAX: +55-51-3308-5535

E-mail: salbego@terra.com.br

Running title: Neuroprotective effects of melatonin against A β 25-35

Abstract

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder marked by accumulation of extracellular deposits of beta-amyloid in brain regions that are important for memory and cognition. The buildup of A β aggregates in the Alzheimer's disease is followed by the formation of intracellular neurofibrillary tangles and activation of neuroinflammatory reactions. The present study investigated whether melatonin possesses a neuroprotective effect against A β 25-35-induced toxicity. For this purpose organotypic hippocampal slice cultures were exposed to 25 μ M of A β 25-35 for 6h, 12h, 24h and 48h with or without a chronic pre-treatment with 25 μ M, 50 μ M or 100 μ M of melatonin. Also, we investigated the involvement of GSK-3 β , *tau* protein, astroglial and microglial activation, and cytokines levels on the melatonin protection against β -amyloid-induced toxicity. Melatonin prevented the cell damage in hippocampus induced by the exposure to A β 25-35. In addition, melatonin significantly prevented the activation of GSK-3 β , the hyperphosphorylation of *tau* protein, the glial activation and the β -amyloid-induced increase in TNF- α and IL-6 levels. Based on these findings, we speculate that melatonin may provide an effective means for Alzheimer's disease through attenuation of A β -induced hyperphosphorylation of *tau* protein, attenuation of GSK-3 β activation and neuroinflammation.

Keywords: Melatonin, Alzheimer's disease, β -amyloid, *tau*, GSK-3 β , organotypic hippocampal culture, neuroinflammation.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive age-related neurodegenerative disorder that is the most common form of dementia affecting people 65 years and older. Clinically AD is characterized by progressive loss of memory and cognitive functions (Tuppo and Arias, 2005) and is marked by the accumulation of extracellular deposits of beta-amyloid peptide (A β), senile plaques, in brain regions that are important for memory and cognition (e.g. the hippocampus and cerebral cortex) (Selkoe and Schenk, 2003; Lee et al., 2008). The buildup of A β aggregates in the AD brain is followed by the formation of intracellular neurofibrillary tangles (NFTs), mainly composed of hyperphosphorylated forms of the *tau* protein, and activation of local inflammatory reactions (Akiyama et al., 2000)

According to the amyloid cascade hypothesis, neurodegeneration in AD begins with the abnormal processing of the amyloid precursor protein (APP) and results in the production, aggregation and deposition of the A β peptide. Apparently, the amyloid cascade may facilitate NFT formation and cell death (Cheng et al., 2006). *Tau* proteins belong to the microtubule-associated protein (MAP) family. The hyperphosphorylation of *tau* in AD brains occurs primarily at (Ser or Thr-)-Pro motifs and the different states of *tau* phosphorylation are the result of the activity of specific kinases and phosphatases towards these sites (Crespo-Biel et al., 2007). Among this group of kinases, GSK-3 β is known to phosphorylate *tau* protein, and it is currently accepted that GSK-3 β plays a major role in maintaining the stability of *tau* protein (Fuentealba et al., 2004). Once hyperphosphorylated, *tau* affinity for microtubules is reduced and *tau* can detach, leading to changes in microtubule dynamics, perturbs axon transport of synaptic vesicles and mitochondrias, resulting finally in the degeneration of neurons (Kins and Beyreuther, 2006; Sorrentino and Bonavita, 2007).

Considerable evidence gained over the past decade has supported the conclusion that neuroinflammation is associated with AD pathology. The sustained production of inflammatory mediators can lead to severe pathological conditions such as AD, which is associated mainly with microglial and astrocytic activation, leading to release of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic factors that accelerate neurodegeneration (Golde, 2002; Wyss-Coray, 2006; Park et al., 2007). Inflammatory mediators present in AD lesions are thought to stimulate underlying key events of the pathological cascade resulting in increased A β production with recruitment and activation of glial cells, implying in a self-amplifying cycle of neurodegenerative events and in the perpetuation of neuroinflammation (Guo et al., 2002; Heneka and O'Banion, 2007).

Current therapies for neurodegenerative diseases provide effective symptomatic relief, particularly in early stages of the disease. However, there are too few, if any therapies that affect the underlying disease process. Therapeutic strategies for the treatment of neurodegenerative diseases have been widely researched. Substantial evidence indicates that melatonin has neuroprotective effects in AD; however, the cellular and molecular mechanisms remain far from established (Wang et al., 2004). This neurohormone has potent antioxidant properties, besides also exerting several other properties including immune system modulation, anti-inflammatory functions, and reduction A β in mediated toxicity (Escames et al., 2006; Jesudason et al., 2007; Lee et al., 2007). In addition, melatonin production decreases with advancement of age, a fact which has been suggested to be one of the major causes of age-associated neurodegenerative diseases (Srinivasan et al., 2006; Wang and Wang, 2006).

The access to the central nervous system is one limiting factor to study neurodegenerative diseases. Organotypic hippocampal cultures are a valuable

alternative to animal experiments. Cultured slices maintain their cell architecture and interneuronal connections allowing an extend survival and molecular mechanism studies (Stoppini et al., 1991; Bruce et al., 1996). It has been widely used in our group to investigate neuronal death associated with oxygen and glucose deprivation (Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2009) and A β toxicity (Nassif et al., 2007; Frozza et al., *In Press*).

The present study focuses on the potential protective effect of melatonin against cell damage and neuroinflammation associated with β -amyloid peptide in organotypic hippocampal slice culture. We have used one of the important fragments of A β peptide (A β 25-35) as peptide-induced toxicity which exhibit all the biological activity of the full length A β (Pike et al., 1996; Frozza et al., *In Press*).

Experimental procedures

1. Materials

A β 25-35 peptide was purchased from American Peptide Co. (Sunnyvale, CA, USA). Minimum Essential Medium (MEM), HBSS, fungizone (Amphotericin B) and horse serum inactivated were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Gentamicin was purchased from Schering-Plough (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Millicell culture inserts (Millicell[®] -CM, 0.4 μ m) were purchased from Millipore (Millipore[®], Bedford, MA, USA) and 6-well culture plate were from Tissue culture test plates TPP (Tissue culture test plates TPP[®], Switzerland). Propidium iodide (PI) as well as acrylamide, bisacrylamide, SDS and β -mercaptoethanol used in sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA),

Dako Chemicals (Carpenteria, CA, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA) and BioSource. ELISA kits were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-mouse IgG peroxidase-conjugated was purchased from Cell Signaling Technology. Anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated and reagents to detect chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Hybond-C nitrocellulose membranes were from Hybond™ ECL™ (Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). X-ray films were purchased from Kodak (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). Melatonin was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

2. Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991), with modifications (Frezza et al., *in press*). 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% MEM, 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% and gentamicin 0.100 mg/ml, pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with a 5%CO₂/95%O₂ atmosphere at 37°C for 4 weeks. Culture medium was changed three times a week. All animal use

procedures were approved by the local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

3. Melatonin preparation and culture treatments

Melatonin was first dissolved in absolute dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted with Milli-Q water. After 14 days, the cultures were treated chronically for 14 days with 25 μ M, 50 μ M or 100 μ M of melatonin added to the culture medium and replaced every exchange of culture medium. Cultures treated with DMSO (0.01%) were considered control.

4. A β 25-35 peptide preparation and culture treatments

One milligram of A β peptide was dissolved in sterilized bidistilled water and stock solution of A β 25-35 (0.5mM) was stored at -20°C. Prior to use, A β peptide 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 reduced medium (2.5%) and slices were exposed to 25 μ M (final concentration) of A β 25-35. Control slices received only serum reduced medium with the drug vehicle (DMSO) for 14 days.

5. Quantification of cellular death

Cell damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Norberg et al., 1999; Frozza et al., *In Press*). 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 4h, 10h, 22h or 46h of A β peptide exposure 5 μ M of PI was added to the culture medium and incubated for 2h. PI uptake is indicative of significant membrane injury (Macklis and Madison, 1990). Images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was detectable above background levels was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of damage.

6. *Western blotting assay*

After obtaining fluorescent images, hippocampal slices were homogenized in lyses buffer, aliquots were taken for protein determination (Peterson, 1979) and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Proteins were resolved (75 μ g per lane) on 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electro transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus. 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) or in albumin solution 5% in TBS for phospho-*tau* and further incubated with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution overnight at 4°C. Primary antibodies against GFAP (1:2000; Dako Chemicals), anti-*tau* (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho *tau* (Ser199/202) (1:1000; BioSource), anti-GSK-3 β (1:1000, Cell Signaling Technology) and anti-phospho GSK-3 β (Ser 9) (1:1000, Cell Signaling Technology) were used. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech) or horseradish peroxidase-conjugated

anti-mouse antibody (1:1000; Cell Signaling Technology) for 2 h. The chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films that were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instruments). Data are expressed as percentage of control cultures.

7. Isolectin B₄ reactivity in microglial cells

In the same way as described above, proteins were resolved (75 µg per lane) on 8% SDS-PAGE and, after electrophoresis, they were electro transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus. Membranes were incubated overnight at 4°C in albumin solution (5% albumin and 2% Tween 20 in PBS, pH 7.4). Isolectin B₄ peroxidase conjugated (Sigma) was incubated in PBS containing 0.05% Tween 20 overnight in a final concentration of 0.125 µg/mL. The chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films that were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instruments).

8. Determination of cytokine levels in medium of organotypic cultures

After 6h, 12h, 24h or 48h of incubation with Aβ₂₅₋₃₅ peptide (25µM), the culture medium was collected, rapidly frozen and stored at -20°C for later measurement of TNF-α, IL-6 and IL-1β levels using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, according to the supplier recommendations (R&D Systems).

9. Statistical analysis

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

Results

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

The exposure of cultures to 25 μ M of A β 25-35 peptide for 48h caused a significant increase in fluorescence in hippocampal slices, that means an increase in the cellular damage, and this damage was prevented by the pre-treatment with 50 μ M and 100 μ M of melatonin (Fig. 1A). Quantification of PI fluorescence showed that A β 25-35 peptide caused around 30% of damage in hippocampus, a significant increase when compared to controls cultures (about 4% of cellular damage). The chronic pre-treatment with 25 μ M of melatonin did not protect from A β toxicity, however when cultures were treated with 50 μ M and 100 μ M the cell death was decreased to around 10% and 5%, respectively (Fig. 1B). The exposure of cultures to 25 μ M of A β 25-35 peptide for 6h, 12h and 24h did not cause a significative increase in fluorescence in hippocampal slices (data not shown). Many groups, including our self, have demonstrated previously that reversed A β (35-25) peptide did not induce cell death (Yankner et al., 1990; Johansson et al., 2006; Frozza et al., *in press*).

2. *Effect of A β 25-35 peptide and melatonin on tau hyperphosphorylation*

To investigate whether A β peptide influences the phosphorylation of microtubule-associated *tau* protein as well as the effect of melatonin, Western blotting was performed with antibodies against the phosphorylated form of *tau* at Ser199 and Ser202 as well as against its total immunocontent (Fig. 2A). As we can see in figure 2B, the exposure to A β 25-35 peptide for 48h increased immunoreaction of phospho-*tau* around 45% and this phosphorylation was significantly prevented by pre-treatment with melatonin at all tested concentrations (Fig. 2B).

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

Once it was observed that *tau* protein was hyperphosphorylated when exposed to A β 25-35, we decided to investigate GSK-3 β activity. GSK-3 β (Ser 9) phosphorylation indicates its inactivation. We observed that A β 25-35 was able to decrease GSK-3 β phosphorylation around 40%, which means activation after 12h of A β peptide exposition (Fig. 3A). Melatonin 100 μ M was able to prevent this decrease, suggesting that it maintain GSK-3 β inactivated (Fig. 3B).

4. *Melatonin suppresses glial activation induced by A β 25-35 peptide in organotypic hippocampal slice*

A β 25-35 induced a marked increase in Isolectin B₄ reactivity in organotypic hippocampal cultures, a hallmark of microglial activation (Fig. 4A). Also, the exposure of hippocampal organotypic cultures to A β 25-35 caused astrocytic activation, as evidenced by GFAP immunoreactivity increase in these cultures (Fig. 5A). Compared to

control cultures about 70% increase in Isolectin B₄ reactivity (Fig. 4B) and 40% in GFAP immunoreactivity (Fig. 5B) were observed in cultures exposed to A β peptide for 48h, being melatonin 100 μ M able to prevent both Isolectin B₄ and GFAP increase.

5. Melatonin prevents A β 25-35 peptide-induced increase in TNF- α and IL-6 levels

Considering that inflammatory responses are associated with AD pathology, we also investigated some pro-inflammatory cytokines thought to play a central role in self-propagation of neuroinflammation, as TNF- α , IL-6 and IL-1 β . TNF- α levels were highly increased in the culture medium after exposure of hippocampal cultures to A β 25-35 for 24h and 48h. Melatonin 100 μ M significantly prevented TNF- α increase in both 24 and 48h after exposure to A β peptide (Fig. 6A). The pro-inflammatory cytokine IL-6 levels significantly increased only after 48h of exposure to A β 25-35 peptide. Melatonin 100 μ M was able to prevent this increase (Fig. 6B). We did not observe any alteration in IL-1 β levels after 6h, 12h, 24h and 48h after exposure of hippocampal cultures to A β 25-35 (data not shown).

Discussion

Aggregation of A β peptide in the brain parenchyma is a pathological hallmark of Alzheimer's disease, and has been suggested to play a central role in the pathogenesis of AD (LaFerla et al., 2007; Iijima et al., 2008). The development of therapies for this neurodegenerative disease represents a major challenge to academic, biotechnology and pharmaceutical scientists (Refolo and Fillit, 2004). To contribute in this field, we have used organotypic hippocampal slice cultures to examine A β peptide toxicity and

possible melatonin neuroprotective effects. In previous work we had observed that A β 25-35 peptide induced a significant cell death after an exposure of 48h. Additionally, neural injury induced by A β 25-35 was similar to A β 1-42 (Nassif et al., 2007; Frozza et al., *In Press*). Here, we found that a chronic pre-treatment with melatonin reduced this cell damage. The protective concentrations of melatonin found in our work are in accordance with other A β toxicity models (Clapp-Lilly et al., 2001; Wang et al., 2004; Jang et al., 2005).

In order to investigate a molecular mechanism that could be involved in melatonin neuroprotective effect against A β peptide neurotoxicity, we analyzed the phosphorylation state of *tau* protein. The molecular mechanism of the abnormal hyperphosphorylation of *tau* is not fully understood. *Tau* is known to be phosphorylated at over 25 sites. Around half of these sites are on Ser/Thr-Pro motifs and are therefore phosphorylated by proline dependent protein kinases. The biological activity of *tau* is known to be regulated by the degree of its phosphorylation. It is known that hyperphosphorylated *tau* bind with less affinity to microtubules resulting in the decrease in the interaction with microtubules, in a decrease in microtubule stability, and probably in a microtubule dysfunction inside the cell that could result in a toxic effect, that can compromise the axonal transport and lead to neurodegeneration (Li et al., 2004; Avila et al., 2006; Sengupta et al., 2006). Here, we observed a significant *tau* hyperphosphorylation when organotypic cultures were exposed to A β 25-35 and all the concentrations of melatonin used restored the phosphorylation of *tau* to control levels. We showed that melatonin can also arrest A β -induced *tau* hyperphosphorylation, in accordance with others models of *tau* hyperphosphorylation induction (Li et al., 2005; Yin et al., 2006).

The mechanisms by which aggregated A β -related peptides induce the phosphorylation of *tau* protein are not clear. According to amyloid hypothesis for the AD pathogenesis, A β directly affects neurons, leading to neurodegeneration and *tau* phosphorylation, followed by the production of paired helical filaments (PHF) in neurofibrillary tangles (NFT) (Takashima et al., 1998). A growing body of evidence suggests that the effects of A β on *tau* phosphorylation could be the direct consequence of increased kinase or decreased phosphatase activities (Mazanetz and Fischer, 2007). Indeed, of the proline-directed kinases, GSK-3 β (also known as *tau* protein kinase I) is the major contributor to the phosphorylation of *tau* (Ryder et al., 2004). Our current results showed that exposure to aggregated A β peptide, in addition to *tau* phosphorylation, can significantly increase the GSK-3 β activity, by decreasing its phosphorylation, whereas treatment of the organotypic cultures with melatonin attenuated its activation, preventing this decrease. It is of interest to note that phospho-GSK-3 β reached its maximal activation at 12h and decreased later, whereas increased *tau* phosphorylation was evident up to 2 days following exposure to A β 25-35. In spite of a long period of exposure to be necessary for significant neurotoxic effect, the A β 25-35 can induce intracellular signals after short periods, and this neurotoxic effect could be a result from these previous signaling events, as already demonstrated by our group and others authors (Zheng et al., 2002; Nassif et al., 2007). A plausible explanation for the activation of GSK-3 β 12h after A β exposure and an increase in *tau* phosphorylation 48h after A β peptide exposure could be caused by potentiation of NMDA receptor by microglial factors, as TNF- α (Tan et al., 2000; Combs et al., 2001). Considering that the literature reported that the NMDA receptor is in a complex with PP-2A and that stimulation of this receptor can lead to the dissociation of PP-2A from complex and the

reduction of PP-2A activity (Chan and Sucher, 2001), this could lead to the sustained tau phosphorylation finding in this work.

In the attempt to better establish the neuroprotective effects of melatonin in AD, we also investigated which effects melatonin would have on chronic inflammation mediated by A β 25-35 in an organotypic hippocampal culture model. In the central nervous system microglia plays an important role in immune surveillance, host defense, and tissue repair. But under adverse and certain pathological conditions, resting microglia undergoes an activation process. Senile plaques in Alzheimer brains are associated with reactive astrocytes and activated microglial cells (Zaheer et al., 2008). The presence of activated microglia surrounding A β deposits may point to a phagocytic effort by microglia in an attempt to remove senile plaques, however along with phagocytosis A β can induce neuronal damage resulting from products released by the activated microglia rather than direct action of the A β (Tuppo and Arias, 2005). There is accumulating evidence that A β peptide may promote local inflammation by inducing glial cells to release damaging factors, such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) (Apelt and Schliebs, 2001; Wyss-Coray et al., 2006; Heneka and O'Banion, 2007). The accumulation of cytokines in AD, by a chronic glial activation, does not appear to be merely a consequence of the degenerative processes, but may play a role in the cascade of events inducing neuronal death by stress-activated signal transduction pathways (Del Bo et al., 1995, Xie et al., 2004).

In the present work, the increase in Isolectin B₄ reactivity and GFAP immunoreactivity suggests that microglia and astrocytes, respectively, are activated in organotypic hippocampal cultures exposed to A β 25-35 peptide and these effects were prevented by the pre-treatment with melatonin. This glial activation is probably increasing cytokines production, evidenced here by the high levels of TNF- α and IL-6 in

the culture medium after exposure to A β 25-35. In the same way, melatonin also reduced cytokines levels in organotypic hippocampal slice cultures exposed to A β 25-35. These results are in agreement with other reports implicating A β peptide and neuroinflammation (Clapp-Lilly et al., 2001; Jiang et al., 2008; Zaheer et al., 2008). The A β toxicity model used in this work retains the original multiplicity cellular (including microglia and astrocytes) that are present *in vivo*, giving it obvious advantages over primary cultures and cell lines for investigations of neuroinflammatory processes. We demonstrated for the first time that melatonin can reduce the A β -induced increase in TNF- α , a cytokine thought to play a central role in the self-propagation of neuroinflammation in AD.

The overall results of our work suggest that melatonin may enhance neuroprotection against A β -induced neurotoxicity by reducing the hyperphosphorylation of *tau* protein, possibly by preventing GSK-3 β activation, and by preventing glial activation, reducing TNF- α and IL-6 levels and consequently neuroinflammation.

Acknowledgments

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

References

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G., Cooper, N., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B., Finch, C., Frautschy, S., Griffin, W., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I., McGeer, P., O'Banion, K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, S., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 21, 383-421.

Apelt, J., Schliebs, R., 2001. β -amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenicTG2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Research* 894, 21-30.

Avila, J., Santa-María, I., Pérez, M., Hernández, F., Moreno, F., 2006. Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006 1, 1-5.

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

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

Chan, S.F., Sucher, N.J. 2001. An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. *The Journal of Neuroscience* 21, 7985-7992.

Cheng, G., Whitehead, S., Hachinski, V., Cechetto, D., 2006. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on beta-amyloid (25-35)-induced inflammatory responses and memory deficits in the rat. *Neurobiology of Disease* 23, 140-151.

Clapp-Lilly, K.L., Smith, M.A., Perry, G., Harris, P.L., Zhu, X., Duffy, L.K., 2001. Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12, 1277-1280.

Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., Landreth, G.E., 2001. B-amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 21, 1179-1188.

Crespo-Biel, N., Canudas, A., Pallàs, M., 2007. Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3 β pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. *Neurochemistry International* 50, 435-442.

Del Bo, R., Angeretti, N., Lucca, E., De Simoni, M.G., Forloni, G., 1995. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and β -amyloid production in cultures. *Neuroscience Letters* 188, 70-74.

Escames, G., López, L., Ortiz, F., Ros, E., Acuña-Castroviejo, D., 2006. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: Effects of melatonin treatment. *Experimental Gerontology* 41, 1165-1173.

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

Fuentealba, R., Farias, G., Scheu, J., Bronfman, M., Marzolo, M., Inestrosa, N., 2004. Signal transduction during amyloid- β -peptide neurotoxicity: role in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 47, 275-289.

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

Guo, J., Yu, J., Grass, D., Beer, F., Kindy, M., 2002. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid A protein in a mouse model of amyloidosis. *The Journal of Neuroscience* 22, 5900-5909.

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

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

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

Iijima, K., Chiang, H.C., Hearn, S.A., Hakker, I., Gatt, A., 2008. A β 42 Mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. PloS ONE 3, e1703.

Jang, M.H., Jung, S.B., Lee, M.H., Kim, C.J., Oh, Y.T., Kang, I., Kim, J., Kim, E.H., 2005. Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. Neuroscience Letters 380, 26-31.

Jesudason, E.P., Baben, B.J., Ashok, B.S., Masilamoni, J.G., Kirubakaran, R., Jebaraj, W.C.E., Jayakumar, R., 2007. Anti-inflammatory effect of melatonin on A β vaccination in mice. Molecular and Cellular Biochemistry 298, 69-81.

Jiang, B., Du, J., Liu, J.H., Bao, Y.M., An, L.J., 2008. Catalpol attenuates the neurotoxicity induced by β -amyloid1-42 in cortical neuron-glia cultures. Brain Research 1188, 139-147.

Johansson, S., Radesäter, A.C., Cowburn, R.F., Thyberg, J., Luthman, J., 2006. Modelling of amyloid beta-peptide induced lesions using roller-drum incubation of hippocampal slice cultures from neonatal rats. Experimental Brain Research 168, 11-24.

Kins, S., Beyreuther, K., 2006. Teasing out the tangles. Nature Medicine 12(7), 764-765.

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

Lee, J., Lee, Y., Yuk, D., Choi, D., Ban, S., Oh, K., Hong, J., 2008. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. Journal of Neuroinflammation 5, 1-14.

Lee, M.Y., Kuan, Y.H., Chen, H.Y., Chen, T.Y., Chen, S.T., Huang, T.T., Yang, Y.P., Hsu, Y.S., Wu, T.S., Lee, E.J., 2007. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Pineal Research* 42, 297-309.

Li, L., Sengupta, A., Haque, N., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2004. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Letters* 566, 261-269.

Li, X.C., Wang, Z.F., Zhang, J.X., Wang, Q., Wang, J.Z., 2005. Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 510, 25-30.

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

Mazanetz, M.P., Fischer, P.M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative disease. *Nature Reviews* 6, 464-479.

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

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

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

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

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

Refolo, L.M., Fillit, H.M., 2004. New directions in neuroprotection: basic mechanisms, molecular targets and treatment strategies. *Journal of Alzheimer's disease* 6, S1-S2.

Ryder, J., Su, Y., Ni, B., 2004. Akt/GSK3 β serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cellular Signalling* 16, 187-200.

Selkoe, D.J., Schenk, D., 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 545-584.

Sengupta, A., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2006. Regulation of phosphorylation of tau by protein kinases in rat brain. *Neurochemical Research* 31, 1473-1480.

Sorrentino, G., Bonavita, K., 2007. Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the lesson from tauopathies. *Neurological Sciences* 28, 63-71.

Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S.R., Cardinale, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behavioral and Brain Functions* 15, 1-23.

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

Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., Yamaguchi, H., 1998. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neuroscience Research* 31, 317-323.

Tan, J., Town, T., Mori, T., Wu, Y., Saxe, M., Crawford, F., Mullan, M., 2000. CD45 opposes β -amyloid peptide-induced microglial activation via inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience* 20, 7587-7594.

Tuppo, E., Arias, H., 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 289-305.

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

Wang, J.Z., Wand, Z.F., 2006. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica* 27, 41-49.

Wang, Y., Li, X., Liu, S., Zhou, X., Wang, X., Wang, J., 2004. Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions. *Acta Pharmacologica Sinica* 25, 276-280.

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

Xie, Z., Smith, C.J, Van Eldik, L.J., 2004. Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45, 170-179.

Yankner, B.A, Dawes, L.R, Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L, Neve, R.L., 1990. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245, 417-420.

Yin, J., Liu, Y.H., Xu, Y.F., Zhang, Y.J., Chen, J.G., Shu, B.H., Wang, J.Z., 2006. Melatonin arrests peroxynitrite-induced tau hyperphosphorylation and the overactivation of protein kinases in rat brain. *Journal of Pineal Research* 41, 124-129.

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

Zheng, W.H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., Kar, S., 2002. Amyloid β peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115, 201-211.

Figure 1: Melatonin attenuates cell damage after exposure of organotypic hippocampal slices cultures to A β 25-35 peptide. **(A)** Representative photomicrographs of PI uptake in hippocampal slices after 48h exposure to 25 μ M of A β 25-35 and pre-treated with 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M of melatonin. **(B)** Quantification of PI uptake in response to A β peptide and melatonin. Values was expressed as percentage of cell death in hippocampus. Bars represent the mean \pm SEM, n=8. # significantly different from control culture; *** significantly different from A β 25-35 (25 μ M). (One-way ANOVA followed by Tukey's test, p<0.001).

Figure 2: Effect of melatonin on A β 25-35-induced *tau* hyperphosphorylation. **(A)** Representative Western blotting showing phospho-*tau* (*ptau*) (Ser 199/202) and *tau* 48h after A β 25-35 peptide exposure and pre-treatment with 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M of melatonin. **(B)** Quantification of *tau* phosphorylation 48h after A β exposure with or without melatonin pre-treatment normalized to the total amount of *tau*. Data are expressed as a ratio of the normalized *ptau* and *tau*. Bars represent the mean \pm SEM, n=5. # significantly different from all other groups, p<0.05. (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 3: GSK-3 β activated in early phase of A β peptide exposure can be prevented by melatonin. **(A)** Representative and quantitative Western blotting of pGSK-3 β and GSK-3 β after 6h, 12h, 24h and 48h of A β 25-35 peptide (25 μ M) exposure. Bars represent the mean \pm SDM, n=3. * significantly different from control culture, p<0.05 (One-way ANOVA followed by Tukey's test). **(B)** Representative and quantitative Western blots of (phospho-GSK-3 β) pGSK-3 β and GSK-3 β after 12h A β 25-35 exposure and pre-treated with 100 μ M of melatonin. Bars represent the mean \pm SEM, n=4. # significantly different from all other groups, p<0.05. (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 4: Melatonin reduces the A β 25-35-induced microglial activation in organotypic hippocampal cultures. **(A)** Representative Isolectin B₄ reactivity in organotypic hippocampal cultures after 48h of exposure to A β 25-35 peptide. **(B)** Histograms represent the quantitative analyses of Isolectin B₄ reactivity after 48h A β exposure and pre-treatment with 100 μ M of melatonin. Bars represent the mean \pm SEM, n=6. # significantly different from all other groups, p<0.05 (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 5: Astrocytic activation induced by A β 25-35 peptide can be prevented by melatonin. **(A)** Representative Western blotting of GFAP immunoreactivity in organotypic hippocampal cultures after 48h of exposure to A β 25-35. **(B)** Quantification of GFAP immunocontent after A β peptide exposure and pre-treatment with 100 μ M of melatonin. Bars represent the mean \pm SEM, n=5. # significantly different from all other groups, p<0.05 (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 6: A β 25-35 peptide-induced increase in TNF- α and IL-6 levels can be prevented by melatonin. **(A)** TNF- α levels in the culture medium after exposure of hippocampal cultures to A β 25-35 for 6h, 12h, 24h and 48h. Pre-treatment with melatonin 100 μ M reduced these levels. Bars represent the mean \pm SEM, n=3. ^{***} significantly different from 24h other groups, p<0.05; ^{****} significantly different from 48h other groups, p<0.001; (One-way ANOVA followed by Tukey's test). **(B)** IL-6 levels in the culture medium from cultures exposed to A β 25-35 for 6h, 12h, 24h and 48h. Pre-treatment with melatonin 100 μ M was able to prevent the increased level at 48h. Bars represent the mean \pm SEM, n=3. [#] significantly different from all other groups, p<0.001; (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 1

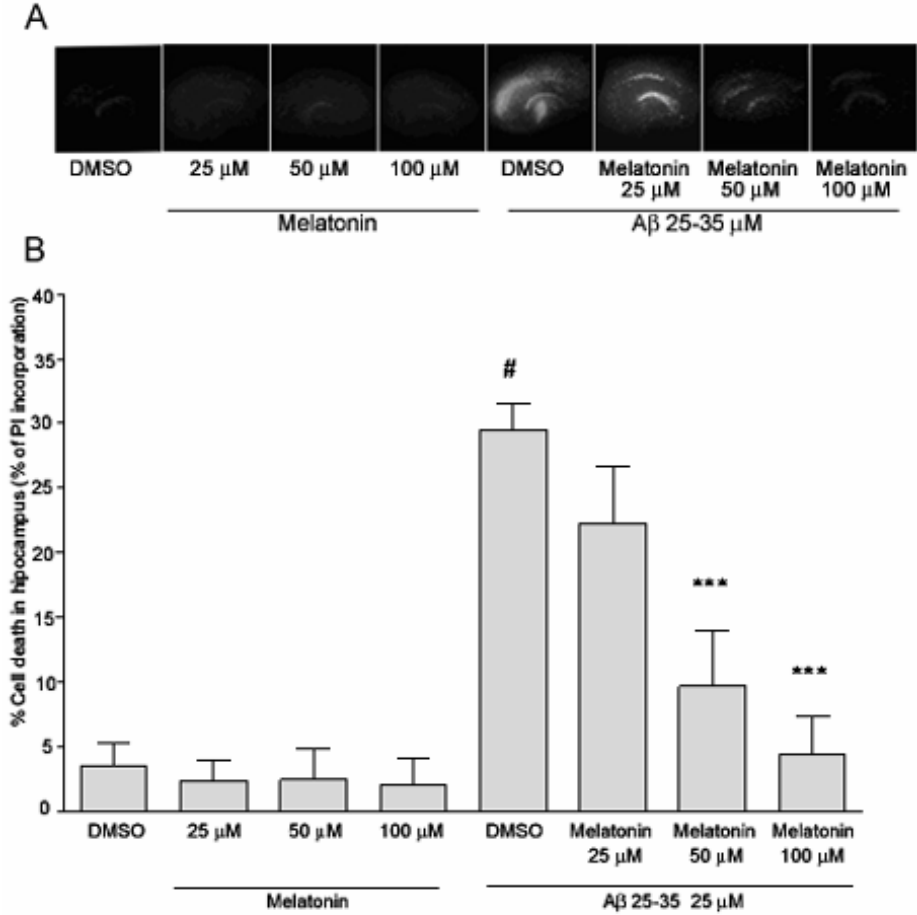


Figure 2

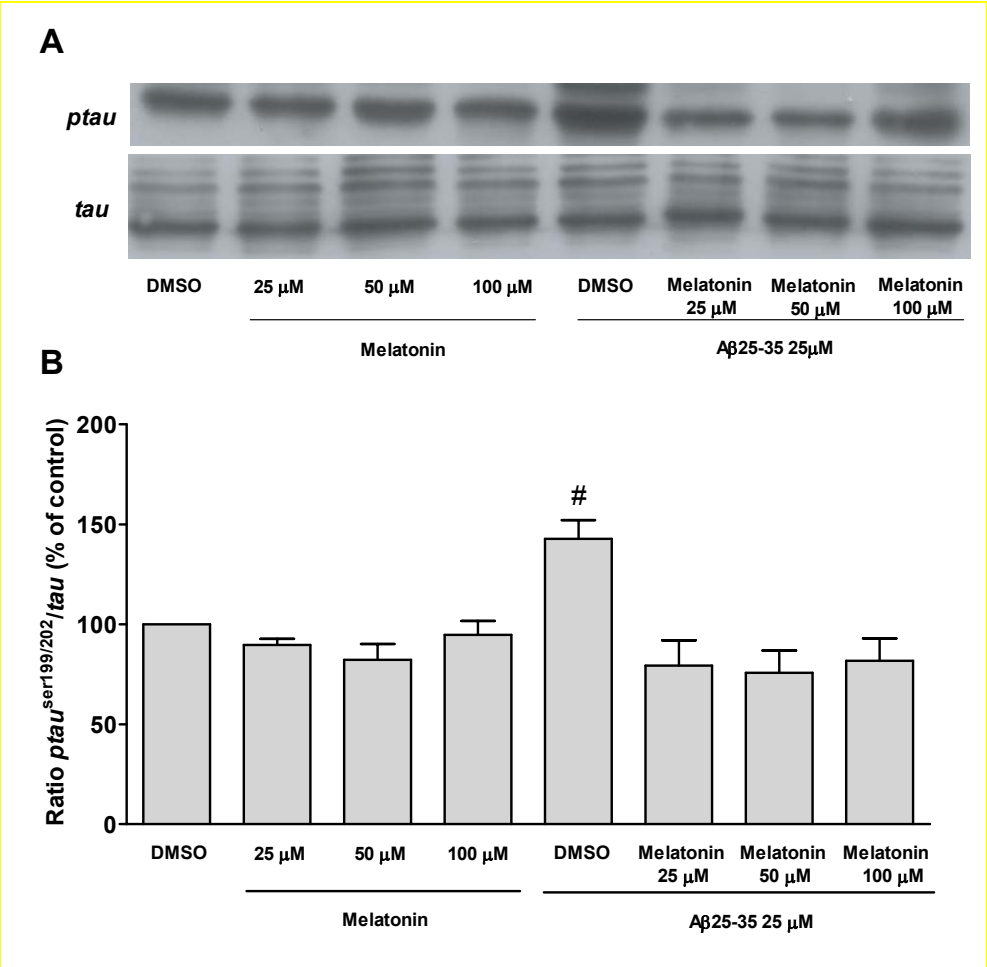


Figure 3

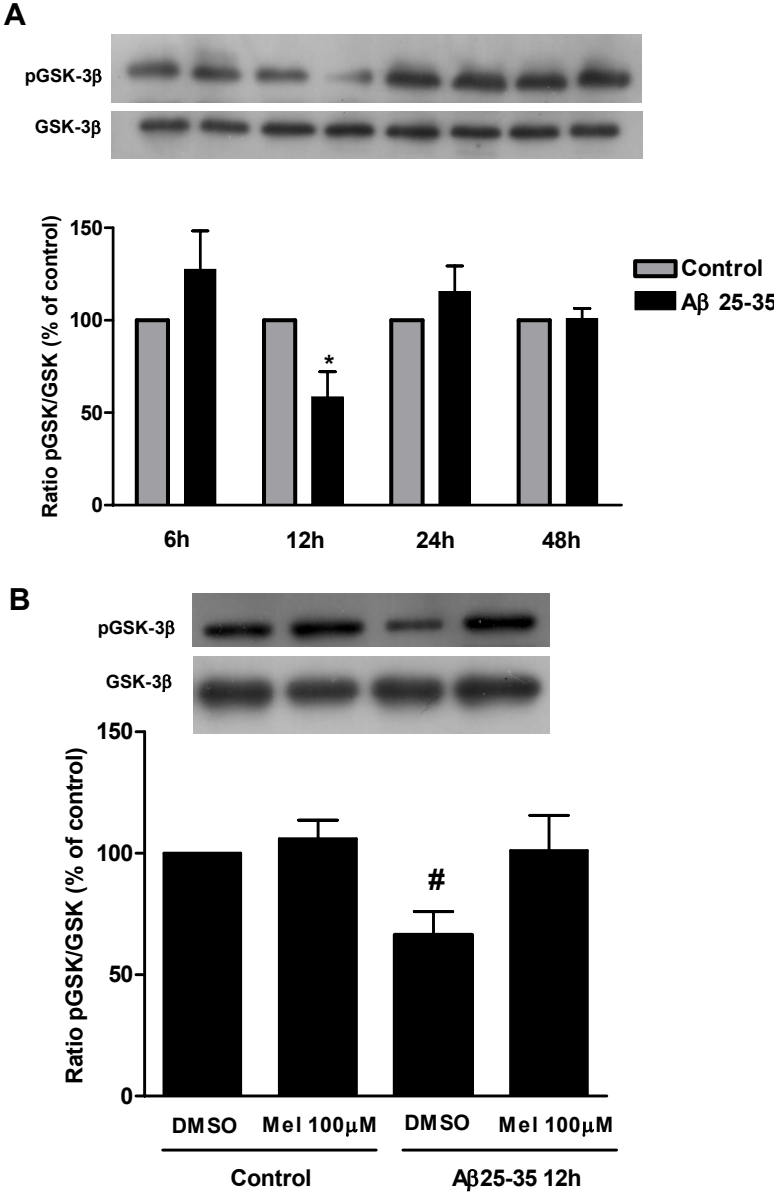


Figure 4

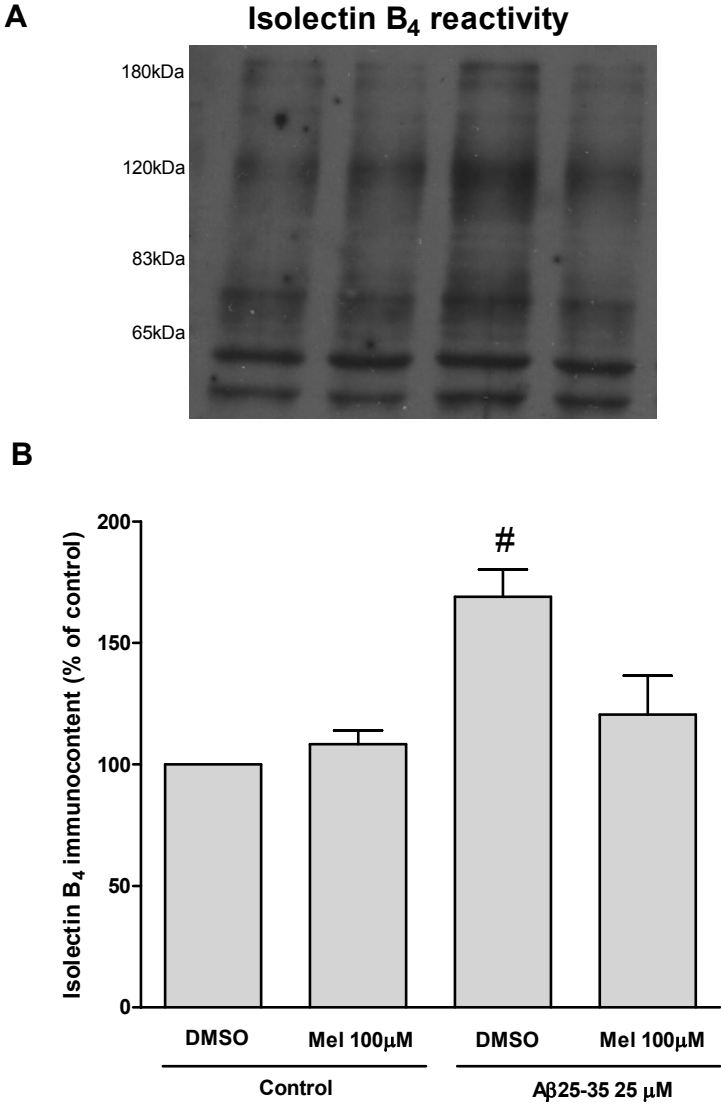
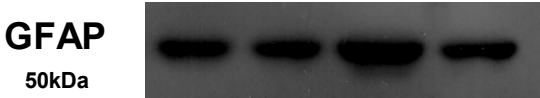


Figure 5

A



B

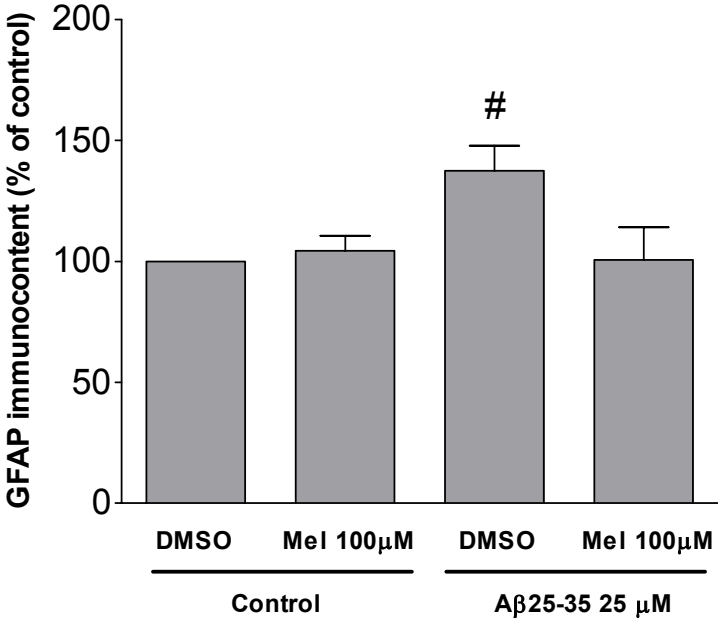
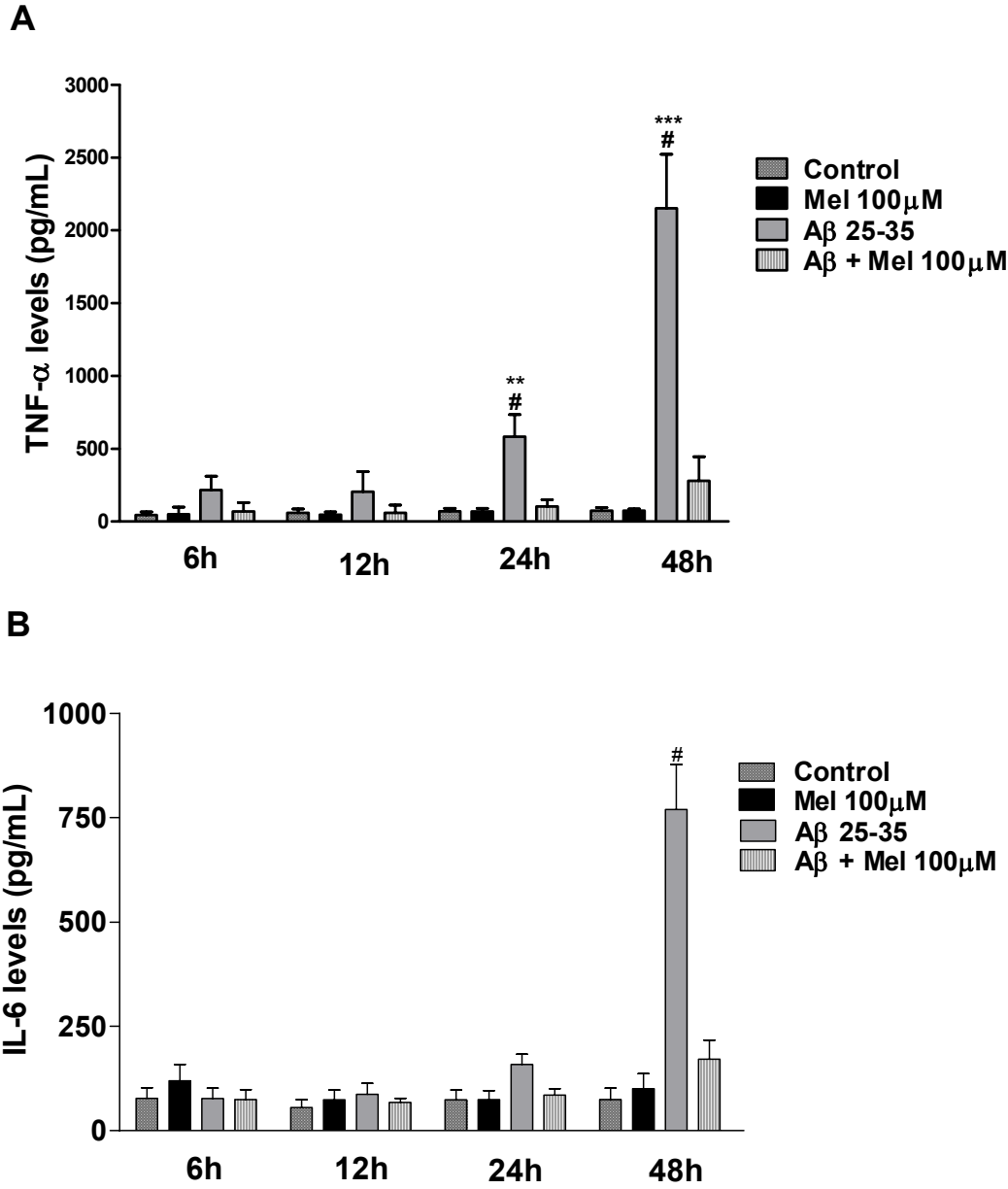


Figure 6



5. DISCUSSÃO

Há pouco mais de um século, em 1906, Alois Alzheimer descreveu a Doença de Alzheimer pela primeira vez (ALZHEIMER, 1907). Até 1980, pouco conhecimento havia sido adicionado aos achados do médico alemão. Foi na década de 80 que pesquisadores identificaram os componentes principais dos dois indicadores histológicos da DA: as placas senis, formada pela agregação de subunidades protéicas denominadas peptídeo β -amilóide, e dos emaranhados neurofibrilares, compostos por filamentos agregados da proteína *tau* anormalmente hiperfosforilada (MASTERS, 1985; GOEDERT et al., 1988, LAFERLA et al., 2007). Dessa década para os dias de hoje a DA tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores, que buscam incessantemente a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa enigmática doença.

Embora esses achados tenham sido um passo importante para o melhor entendimento da DA e para possíveis alvos terapêuticos, o mecanismo preciso pelos quais o A β e a proteína *tau* exercem seus efeitos tóxicos e a ligação entre eles ainda continua pouco compreendido (GOEDERT et al., 2006).

Há várias linhas de pesquisa de estudo da DA, dentre essas existe a quase universalmente aceita teoria de que o peptídeo A β tenha função primária para o desenvolvimento da neurodegeneração, resultando na severa perda neuronal e disfunção sináptica observada nos pacientes com DA. Essa teoria postula que o desenvolvimento dos agregados de A β na forma de placas senis é seguida por uma seqüência de eventos importantes, entre eles a hiperfosforilação da proteína *tau* e uma resposta inflamatória crônica circundante às placas senis, que levam a uma perda

generalizada de sinapses, morte neuronal e déficit de neurotransmissores (TAKASHIMA et al., 1998; SELKOE, 2002; NEWMAN et al., 2007; IJIMA et al., 2008).

Visto que o número de pessoas afetadas pela DA no mundo atualmente é alto e o aumento alarmante desses doentes esperado para as próximas décadas, em decorrência do aumento natural de expectativa de vida, e que farmacoterapia atual se mostra limitada a benefícios sintomáticos e apenas por um curto período de tempo, o desenvolvimento de terapias eficazes contra a DA tem representado um grande desafio para cientistas da área farmacêutica e biotecnológica (CITRON, 2002; REFOLO and FILLIT, 2004).

Na tentativa de melhor compreender os mecanismo tóxicos desencadeados pelo peptídeo A β , utilizamos o modelo de toxicidade do peptídeo A β 25-35 em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, uma vez que essas mantêm a multiplicidade celular original do tecido e as conexões intraneurais (HOLOPAINEN, 2005; NORABERG et al., 2005). Além disso, o modelo de cultura organotípica de fatias hipocampais é um modelo já bem estabelecido em nosso grupo de trabalho, e amplamente empregado para o estudo de morte celular, envolvimento de vias de sinalização e investigação de potenciais agentes neuroprotetores nos modelos de privação de oxigênio e glicose (VALENTIM et al., 2003; HORN et al., 2005; ZAMIN et al. 2006) e no modelo de toxidade induzida pelo peptídeo A β (NASSIF et al., 2007; FROZZA et al., *in press*). Dessa maneira, o modelo utilizado no presente trabalho favorece a investigação de mecanismos moleculares envolvidos com a toxidade do peptídeo A β , focando no tecido hipocampal, uma área importante para o aprendizado e memória e uma das principais regiões afetadas na DA.

Nesse trabalho, utilizamos como ferramenta de indução de toxicidade o fragmento de 11 aminoácidos (A β 25-35) originário do peptídeo A β 1-42, como uma

alternativa mais econômica para o desenvolvimento do modelo experimental. Em razão do peptídeo A β 25-35 apresentar a região biologicamente ativa do peptídeo A β 1-42 e reter suas características de formação de fibrilas e toxicidade, exercendo efeitos similares sobre o sistema colinérgico e cognitivo (IVERSEN et al., 1995; TOHDA et al., 2003; HASHIOKA et al., 2005; HERVAS-AGUILAR et al., 2005). Recentemente, demonstramos um perfil tóxico similar de ambos os peptídeos, A β 1-42 e A β 25-35, na morte celular por necrose e na regulação de vias de sinalização por apoptose em cultura organotípica de hipocampo de ratos (FROZZA et al., *in press*).

Na tentativa de investigar um possível agente neuroprotetor contra a toxicidade induzida pelo A β , escolhemos a melatonina visto suas propriedades únicas de ser um composto naturalmente sintetizado pela glândula pineal e outros tecidos corporais, estar em maior concentração no fluido cérebro espinhal do que na circulação, sua produção diminuir com o envelhecimento e profundamente em pacientes com DA, sugerindo sua ligação com as doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (SRINIVASAN et al., 2006).

No modelo de lesão do presente trabalho, o tecido foi amadurecido *in vitro* a partir de cultura realizada com ratos de 6-8 dias, visto que dados da literatura indicam que cultura organotípica de hipocampo amadurecida 4 semanas *in vitro* são mais sensíveis ao peptídeo A β (BRUCE et al., 1996; ISHIGE et al., 2007; FROZZA et al., *in press*). Após um período de 28 dias de cultivo as culturas foram expostas à concentração de 25 μ M do peptídeo A β 25-35 por 6h, 12h, 24h ou 48h, totalizando 30 dias de cultivo. O tratamento das culturas com melatonina foi realizada a partir do 14º dia de cultivo, sendo adicionada a cada troca de meio e concomitantemente ao A β 25-35 no 28º dia, em uma curva de dose nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Os resultados mostraram uma significativa morte celular, analisada através da

incorporação do corante Iodeto de Propídeo (IP), apenas após 48h de exposição ao peptídeo A β 25-35. O longo tempo de exposição ao peptídeo A β necessário para observar essa toxicidade está de acordo com outros estudos que também relatam a necessidade de um prolongado tempo de exposição (ISHIGE et al., 2007; NASSIF et al., 2007; PATEL and GOOD, 2007; FROZZA et al., *in press*). O resultado apresentado na Figura 1 mostra que o pré-tratamento com melatonina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M preveniu significativamente a morte celular induzida pela exposição de culturas organotípicas de hipocampo ao peptídeo A β 25-35. As concentrações de melatonina que se mostraram neuroprotetoras em nosso trabalho estão de acordo com as de outros estudos envolvendo modelos *in vitro* de toxicidade do peptídeo A β (CLAPP-LILLY et al., 2001a; JANG et al., 2005; WANG et al., 2007). Nesse modelo, apenas o tratamento crônico com melatonina mostrou efeitos neuroprotetores contra a morte celular. Experimentos realizados mostraram não haver diminuição significativa na incorporação de IP quando a melatonina foi administrada uma única vez concomitantemente ao A β 25-35, também em experimentos utilizando uma concentração superior de melatonina (250 μ M) observou-se o aumento da lesão induzida pelo A β 25-35 nas fatias hipocampais (dados não mostrados). Esses resultados prévios sugerem que para a melatonina exercer seu efeito neuroprotetor contra a toxicidade do peptídeo A β possa ser necessário uma prévia sensibilização do tecido à melatonina, corroborando com a hipótese de que seja necessária uma suplementação de melatonina em pacientes com DA visto que seus níveis encontram-se profundamente reduzidos no fluido cérebro espinhal. Quanto ao aumento da incorporação de IP com uma dose elevada de melatonina, outros estudos já haviam demonstrado essa propriedade bifásica da melatonina, agindo como antioxidante em concentrações mais baixas e como pró-oxidante em altas concentrações em um

modelo de Doença de Alzheimer em cultura organotípica (CLAPP-LILLY et al., 2001a; CLAPP-LILLY et al., 2001b). Acredita-se que a melatonina possa proteger neurônios da toxicidade induzida pelo peptídeo A β por apresentar atividade anti-amiloidogênica, não somente diminuindo sua geração ao interferir com o processamento da APP, como também impedir a formação do A β fibrilado através de uma interação estrutura dependente com o peptídeo (CHENG et al., 2006; WANG et al., 2006). Porém, como no presente trabalho as culturas foram tratadas com o peptídeo A β previamente fibrilado não foi possível investigar esses mecanismos nesse modelo de toxicidade do A β 25-35.

A fim de investigar outros mecanismos pelos quais a melatonina possa estar exercendo seu efeito neuroprotetor nas fatias hipocâmpais, analisamos o estado de fosforilação da proteína *tau* após exposição ao A β 25-35 por um período de 48h. A atividade biológica da proteína *tau* é regulada pelo seu estado de fosforilação. De acordo com a hipótese da cascata amilóide, a formação dos depósitos de A β pode ser diretamente responsável pela geração de emaranhados neurofibrilares (SELKOE, 2002; WANG et al., 2007). Corroborando com essa hipótese, nós observamos que a exposição ao A β 25-35 por 48h aumentou a fosforilação da proteína *tau* (Ser199/Ser202). Da mesma maneira, o mais interessante foi a prevenção da hiperfosforilação da proteína *tau* através do pré-tratamento com melatonina em todas as concentrações utilizadas e de modo similar. Esse resultado foi importante para interligar o efeito neuroprotetor da melatonina diretamente ao peptídeo A β e a proteína *tau*, visto que o efeito preventivo da melatonina na hiperfosforilação da *tau* só havia sido observado em trabalhos que induziam a hiperfosforilação com agentes químicos, como wortmannin, caliculina A, isoproterenol ou através da inibição da síntese de melatonina (LI et al., 2005; YIN et al., 2006; WANG et al., 2007).

Diante da hiperfosforilação da *tau* induzida pelo peptídeo A β 25-35, decidimos analisar uma possível via de sinalização envolvida na indução da toxicidade do peptídeo A β 25-35 com a hiperfosforilação da proteína *tau* observadas em nosso modelo. Um crescente grupo de evidências sugere que o efeito do peptídeo A β na hiperfosforilação da *tau* poderia ser uma consequência direta do aumento da atividade de cinases ou diminuição da atividade de fosfatases (GONG et al., 2006; SENGUPTA et al., 2006; MAZANETZ and FISHER, 2007; WANG et al., 2007). Desse modo, decidimos investigar o estado de fosforilação da GSK-3 β , considerada a principal cinase envolvida na fosforilação da proteína *tau* (RYDER et al., 2004). Essa enzima quando fosforilada na Ser-9 encontra-se em seu estado inativo (COHEN and FRAME, 2001). Nossos resultados demonstraram que o peptídeo A β 25-35 foi capaz de diminuir significativamente a fosforilação da GSK-3 β , e, portanto, promover sua ativação, após 12h de exposição ao peptídeo. Essa ativação devido à exposição ao peptídeo A β já havia sido demonstrada em um estudo anterior pelo nosso grupo (NASSIF et al., 2007). Aqui, observamos que o pré-tratamento com melatonina aumentou a fosforilação da GSK-3 β quando comparado com o tecido exposto ao peptídeo A β 25-35 apenas e, conseqüentemente, diminuindo sua ativação. Esse é um dado interessante para o entendimento de um dos possíveis mecanismos de neuroproteção da melatonina contra a neurotoxicidade do peptídeo A β , contribuindo com estudos anteriores (TAKASHIMA et al., 1998; ZHENG et al., 2002).

De modo interessante, no que se refere à atividade da GSK-3 β essas alterações foram detectadas mais precocemente, atingindo seu pico de ativação após 12h de exposição ao peptídeo A β , enquanto que as alterações na fosforilação da proteína *tau* e morte celular significativa só foram observadas após 48h de exposição ao A β . Sugerindo que ao contrário de um longo período de exposição ao A β 25-35 se fazer

necessário para observarmos morte celular, o peptídeo A β é capaz de induzir sinais intracelulares após curtos períodos de exposição ao tecido, sendo que o efeito neurotóxico observado após um longo período possa ser resultado desses sinais prévios (ZHENG et al., 2002; NASSIF et al., 2007). Uma explicação para a ativação da GSK-3 β após 12h de exposição ao peptídeo A β e o aumento na fosforilação da proteína *tau* após 48h de exposição ao peptídeo A β observados nesse trabalho, pode ser a potencialização de receptores NMDA por fatores tóxicos secretados pela microglia ativada, como TNF- α e glutamato (TAN et al., 2000; COMBS et al., 2001). Considerando dados na literatura que reportam que o receptor NMDA está em um complexo com a PP-2A e que a estimulação desse receptor pode causar a dissociação da PP-2A do complexo e a conseqüente redução da atividade dessa fosfatase (CHAN and SUCHER, 2001), isso poderia levar a fosforilação sustentada da proteína *tau* observada nesse trabalho.

Além de ser uma das principais cinases responsáveis pela fosforilação da proteína *tau*, a GSK-3 β parece ser uma proteína intrinsecamente envolvida no processamento da APP e formação do peptídeo A β observadas na DA. Outra maneira pela qual a GSK-3 β pode estar mediando a toxicidade induzida pelo peptídeo A β , além da hiperfosforilação da proteína *tau*, é através da regulação de fatores de transcrição relacionados com apoptose e morte celular (BALARAMAN et al., 2006; HOOPER et al., 2008).

Na tentativa de melhor compreender os mecanismos pelos quais a melatonina exerce efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida pelo peptídeo também investigamos se esses efeitos poderiam estar relacionados com a neuroinflamação mediada pelo peptídeo A β 25-35. No sistema nervoso central as células microgliais agem como as principais células imunocompetentes que coordenam a resposta imune

endógena do cérebro, possuindo importante papel de defesa e reparo tecidual (MCGEER and MCGEER, 2003; TUPPO and ARIAS, 2005). Porém, em certas condições adversas ou patológicas a microglia entra em um processo de ativação. Em situações fisiológicas, as células microgliais se encontram em um estado quiescente exibindo uma morfologia ramificada, já em resposta a uma injúria local, como a deposição de A β , a microglia retrai seus processos adquirindo uma forma amebóide (microglia ativada) ou arredondada (microglia fagocítica) (SRIRAM and O'CALLAGHAN, 2007). Sendo assim, o aumento da reatividade a Isolectina B₄ observado nesse trabalho sugere que a microglia está ativada nas culturas organotípicas expostas ao peptídeo A β 25-35 por 48h, sendo que o pré-tratamento com melatonina preveniu essa ativação de um dos principais marcadores de neuroinflamação. Demonstrando pela primeira vez o efeito da melatonina sobre células microgliais ativadas diretamente devido à exposição ao A β 25-35.

Na DA, além da microglia ativada, astrócitos reativos são encontrados circundando as placas senis. A principal mudança bioquímica durante a astrogliose é a regulação positiva da proteína glial fibrilar ácida (*Glial Fibrillary Acidic Protein* – GFAP), reconhecida com um marcador para astrócitos reativos (HENEKA and O'BANION, 2007; GAO et al., 2008). No presente trabalho, a melatonina também reduziu a imunorreatividade da GFAP, indicando sua ação de prevenção da ativação de astrócitos. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores demonstrando a prevenção da astrogliose induzida pelo peptídeo A β pela melatonina (JESUDASON et al., 2007; GUNASINGH et al., 2008).

Uma vez que observamos essa ativação glial induzida pela exposição ao peptídeo A β 25-35, decidimos investigar os níveis das citocinas TNF- α e IL-6. Visto que células microgliais ativadas e astrócitos reativos podem agravar o dano tecidual através

da liberação de citocinas pró-inflamatórias, gerando um ciclo vicioso na DA (GUO et al., 2002; LIBERTO et al., 2004, HENEKA and O'BANION, 2007). Nossos resultados demonstraram um aumento dos níveis das duas citocinas decorrente da ativação glial induzida pelo peptídeo A β 25-35. O tratamento com melatonina, como reduziu a ativação glial, conseqüentemente preveniu os níveis elevados de TNF- α e IL-6 após a exposição ao peptídeo A β 25-35. Os resultados do efeito da melatonina nos níveis de IL-6 estão de acordo com um trabalho anterior realizado em fatias cerebrais de camundongo expostas ao peptídeo A β 1-40 (CLAPP-LILLY et al., 2001a), enquanto que o efeito da melatonina sobre os níveis de TNF- α ainda não haviam sido investigados em um modelo de toxicidade ao peptídeo A β . Nesse trabalho observamos níveis aumentados de TNF- α a partir de 24h de exposição ao peptídeo A β , enquanto que os níveis de IL-6 só aumentaram significativamente após 48h de exposição ao A β . O aumento dos níveis de TNF- α detectado antes do aumento dos níveis da IL-6 poderia ser explicado pelo fato de o TNF- α ter a função de sinalizar para a ativação da transcrição de outras proteínas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo a IL-6 (BAUD and KARIN, 2001).

Os resultados obtidos nessa dissertação somam-se aos de outros grupos que buscam investigar mecanismos de possíveis agentes terapêuticos que visam prevenir ou minimizar os efeitos envolvidos na DA. Nossos resultados sugerem que a melatonina possa exercer neuroproteção contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β através da redução da hiperfosforilação da proteína *tau*, possivelmente por prevenir a ativação da GSK-3 β , assim como, prevenindo a ativação glial, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-6 e conseqüentemente a neuroinflamação (Figura 4).

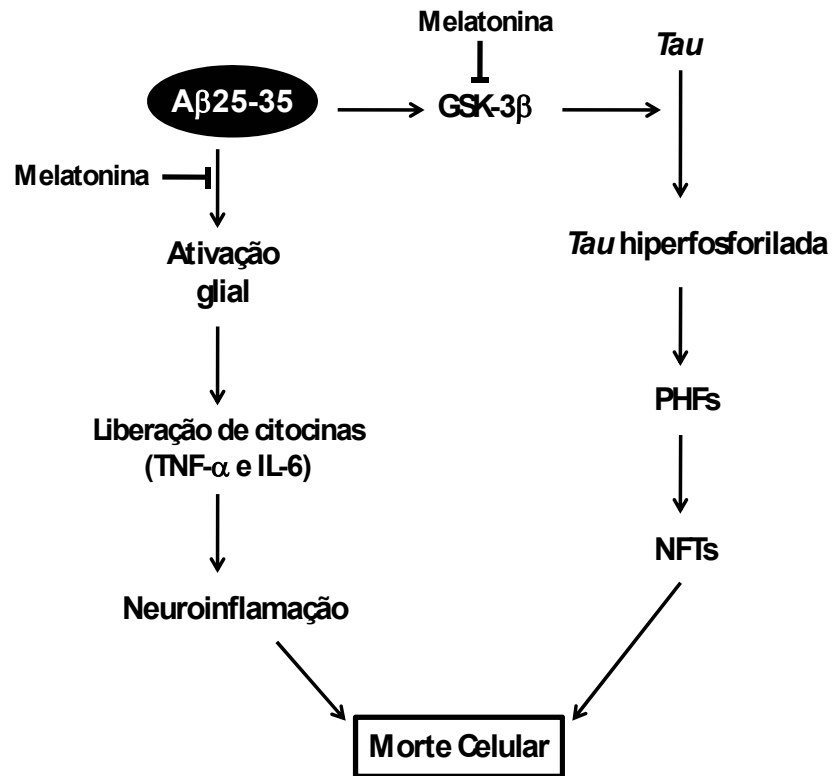


Figura 4. Esquema do efeito neuroprotetor da melatonina sobre a toxicidade do peptídeo A β 25-35 em cultura organotípica de hipocampo de ratos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que:

- a) O tratamento crônico com melatonina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, de maneira dose dependente, preveniu a morte celular em culturas organotípicas de hipocampo de ratos induzida pela exposição ao A β 25-35 por um período de 48h;
- b) A melatonina reduziu a fosforilação da proteína *tau* induzida pelo A β 25-35 em todas as concentrações testadas;
- c) Após 12h de exposição às culturas, o peptídeo A β 25-35 diminuiu a fosforilação da proteína GSK-3 β , conseqüentemente ativando-a, e o pré-tratamento das fatias hipocampais com melatonina na concentração de 100 μ M preveniu esse efeito;
- d) A melatonina 100 μ M preveniu a ativação glial induzida pela exposição por 48h ao A β 25-35, observada através do aumento da reatividade da GFAP e Isolectina B₄;
- e) O peptídeo A β 25-35 induziu o aumento dos níveis de TNF- α após 24h e 48h de exposição, bem como, os níveis de IL-6 após 48h de exposição. A melatonina na concentração de 100 μ M preveniu esse aumento dos níveis das duas citocinas;
- f) A melatonina, portanto, pode exercer neuroproteção contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β 25-35 através da redução da fosforilação da proteína *tau*, possivelmente por prevenir a ativação da GSK-3 β , assim como, prevenindo a ativação glial, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-6 e conseqüentemente a neuroinflamação.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta dissertação geraram as seguintes perspectivas de trabalho:

- Investigar o potencial terapêutico da melatonina em um modelo *in vivo* da Doença de Alzheimer induzida pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo A β 25-35 em ratos de 60 dias;
- Avaliar o efeito da melatonina sobre parâmetros comportamentais após injeção i.c.v. do peptídeo A β 25-35;
- Estudar o envolvimento da neuroinflamação em resposta ao peptídeo A β 25-35 injetado i.c.v. e ao tratamento com melatonina através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias, da investigação do envolvimento das vias de sinalização celular mediadas pela JNK, p38 e NF- κ B, bem como, a expressão das proteínas iNOS e COX-2 e ativação glial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZHEIMER, A. Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allg Z Psychiatr** 64: 146-148, 1907.
- AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G.; COOPER, N.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.; FINCH, C.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I.; MCGEER, P.; O'BANION, K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, S.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging** 21: 383-421, 2000.
- BALARAMAN, Y.; LIMAYE, A.R.; LEVEY, A.I.; SRINIVASAN. Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. **Cell Mol Life Sci** 63: 1226-1235, 2006.
- BARRENETXE, J.; DELAGRANGE, P.; MARTÍNEZ, J.A. Physiological and metabolic functions of melatonin. **J Physiol Biochem** 60: 61-72, 2004.
- BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol** 11: 372-377, 2001.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M.J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet** 368: 387-403, 2006.

- BRUCE, A.J.; MALFROY, B.; BAUDRY, M. β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 2312-2316, 1996.
- CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded protein. **Lancet**, v.363, p.1139-1146, 2004.
- CHAN, S.F.; SUCHER, N.J. An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. **J Neurosci** 21: 7985-7992, 2001.
- CHENG, Y.; FENG, Z.; ZHANG, Q.Z.; ZHANG, J.T. Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer's disease. **Acta Pharmacol Sin** 27(2): 129-139, 2006.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in Discovery and development. **Nature Neurosci Sup** 5: 1055-1057, 2002.
- CLAPP-LILLY, K.L.; SMITH, M.A.; PERRY, G.; DUFFY, L. Melatonin reduces interleukin secretion in amyloid- β stressed mouse brain slices. **Chem Biol Interact** 134: 101-107, 2001a.
- CLAPP-LILLY, K.L.; SMITH, M.A.; PERRY, G.; HARRIS, P.L.; ZHU, X.; DUFFY, L.K. Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. **Neuroreport** 12(6): 1277-1280, 2001b.
- COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nature Mol Cell Biol** 2: 769-776, 2001.

- COMBS, C.K.; KARLO, J.C.; KAO, S.C.; LANDRETH, G.E. β -amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. **J Neurosci** 21: 1179-1188, 2001.
- CRESPO-BIEL, N.; CANUDAS, A.; PALLÀS, M. Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3 β pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. **Neurochem Int** 50: 435-442, 2007.
- DEL BO, R.; ANGERETTI, N.; LUCCA, E.; DE SIMONI, M.G.; FORLONI, G. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and β -amyloid production in cultures. **Neurosci Lett** 188: 70-74, 1995.
- ECKERT, A.; HAUPTMANN, S.; SCHERPING, I.; MEINHARDT, J.; RHEIN, V.; DRÖSE, S.; BRANDT, U.; FÄNDRICH, M.; MÜLLER, W.E.; GÖTZ, J. Oligomeric and fibrillar species of β -amyloid (A β 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. **J Mol Med** 86: 1255-1267, 2008.
- EPSTEIN, F.H. Mechanisms of disease-melatonin in humans. **New Engl J Med** 336: 186-195, 1997.
- FERRARI, A.; HOERNDLI, F.; BAECHI, T.; NITSCH, R.M.; GÖTZ, J. β -amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. **JBC** 278: 40162-40168, 2003.
- FORMAN, M.S.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nat Med** 10: 1055-1061, 2004.

- FROZZA, R.L.; HORN, A.P.; HOPPE, J.B.; SIMÃO, F.; GERHARDT, D.; ARGENTA-COMIRAN, R.; SALBEGO, C. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochem Res** *In Press*.
- FUENTEALBA, R.A.; FARIAS, G.; SCHEU, J.; BRONFMAN, M.; MARZOLO, M.P.; INESTROSA, N.C. Signal transduction during amyloid- β -peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. **Brain Res Rev** 47: 275-289, 2004.
- GALIMBERTI, D.; SCHOONEMBOOM, N.; SCARPINI, E.; SCHELTENS, P. Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. **Ann Neurol** 53: 547-548, 2003.
- GAO, Q.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHENG, X.; QU, R.; LIU, Z.; CHOPP, M. Bone marrow stromal cells reduce ischemia-induced astrocytic activation *in vitro*. **Neuroscience** 152: 646-655, 2008.
- 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 microtubule-associated protein tau. **Proc Acad Sci USA** 84: 4051-4055, 1988.
- GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. A Century of Alzheimer's disease. **Science** 314: 777-780, 2006.
- GOLDE, T.E. Inflammation takes on Alzheimer's disease. **Nat Med** 8(9): 936-938, 2002.
- GOLDE, T.E. The Pathogenesis of Alzheimer's disease and the role of A β 42. **CNS Spectr** 12: 4-6, 2007.

GONG, C.X.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target. **Journal of Biomed Biotechnol** 2006: 1-11, 2006.

GUNASINGH, M.J.; PHILIP, J.E.; ASHOK, B.S.; KIRUBAGARAN, R.; JEBARAJ, W.C.E.; DAVIS, G.D.J.; VIGNESH, S.; DHANDAYUTHAPANI, S.; JAYAKUMAR, R. Melatonin prevents amyloid protofibrillar induced oxidative imbalance and biogenic amine catabolism. **Life Sciences** 83: 96-102, 2008.

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

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. **Nat Med** 5: 101-106, 1999.

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

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

HAILER, N.P.; VOGT, C.; KORF, H.W.; DEGHANI, F. Interleukin-1 β exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial

- activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. **Eur J Neurosci** 21: 2347-2360, 2005.
- HAMDANE, M.; DELOBEL, P.; SAMBO, A.V.; SMET, C.; BÉGARD, S.; VIOLLEAU, S.; LANDRIEU, I.; DELACOURTE, A.; LIPPENS, G.; FLAMENT, S.; BLUÉE, L. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? **Biochem Pharmacol** 66(8): 1619-1625, 2003.
- 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.
- 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** 47(5): 369-376, 2005.
- HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J Neuroimmunol** 184: 69-91, 2007.
- HERVAS-AGUILAR, A.; PUEBLA-JIMENEZ, L.; BURGOS-RAMOS, E.; AGUADO-LLERA, 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** 135(1): 181-190, 2005.
- HERZ, J.; BEFFERT, U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. **Nat Neurosci** 1: 51-58, 2000.
- HOLOPAINEN, I.E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal death, neuroprotection, and synaptic plasticity. **Neurochem Res** 30: 1521-1528, 2005.

- HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem** 104: 1433-1439, 2008.
- HORN, A.P.; GERHARDT, D.; GEYER, A.B.; VALENTIM, L.; CIMAROSTI, H.; TAVARES, A.; HORN, F.; LENZ, G.; SALBEGO, C.G. Cellular death in hippocampus in response to PI-3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. **Neurochem Res** 30: 355-361, 2005.
- IJIMA, K.; CHIANG, H.C.; HEARN, S.A.; HAKKER, I.; GATT, A. A β 42 Mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. **PLoS ONE** 3(2): 1703, 2008.
- 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** 104: 46-55, 2007.
- IVERSEN, L.L.; MORTHISHIRE-SMITH, R.J.; POLLACK, S.J.; SHEARMAN, M.S. The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. **Biochem J** 311:1-16, 1995.
- JANG, M.H.; JUNG, S.B.; LEE, M.H.; KIM, C.J.; OH, Y.T.; KANG, I.; KIM, J.; KIM, E.H. Melatonin attenuates amyloid beta₂₅₋₃₅-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. **Neurosci Lett** 380: 26-31, 2005.
- 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** 13: 159-170, 2004.
- JESUDASON, E.P.; BABEN, B.J.; ASHOK, B.S.; MASILAMONI, J.G.; KIRUBAGARAN, R.; JEBARAJ, W.C.E.; JAYAKUMAR, R. Anti-inflammatory effect of melatonin on A β vaccination in mice. **Mol Cell Biochem** 298: 69-81, 2007.
- JIANG, B.; JING, D.; LIU, J.H.; BAO, Y.M.; AN, L.J. Catalpol attenuates the neurotoxicity by β -amyloid1-42 in cortical neuron-glia cultures. **Brain Res** 1188: 139-147, 2008.
- LAFERLA, F.M.; GREEN, K.N.; ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nat Neurosci** 8: 499-509, 2007.
- LEE, J.; LEE, Y.; YUK, D.; CHOI, D.; BAN, S.; OH, K.; HONG, J. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **J Neuroinflammation** 5(37): 1-14, 2008.
- LIBERTO, C.M.; ALBRECHT, P.J.; HERX, L.M.; YONG, V.W.; LEVISON, S.W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **J Neurochem** 89: 1092-1100, 2004.
- LI, L.; SENGUPTA, A.; HAQUE, N.; GRUNDKE, I.; IQBAL, K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. **FEBS Lett** 566: 261-269, 2004.
- LI, X.; BIJUR, G.N.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers and neuroprotection. **Bipolar Disord** 4: 137-144, 2002.

- LI, X.C.; WANG, Z.F.; ZHANG, J.X.; WANG, Q.; WANG, J.Z. Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. **Eur J Pharmacol** 510: 25-30, 2005.
- LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE, I.; GONG, C.X. Involvement of aberrant glycosilation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 β . **FEBS Lett** 530: 209-214, 2002.
- 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 Nati Acad Sci USA** 82: 4245-4249, 1985.
- MATTSON, M.P.; CHAN, S.L. Neuronal and glial calcium signalin in Alzheimer's disease. **Cell Calcium** 34: 385-397, 2003.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature** 430: 631-639, 2004.
- MAZANETZ, M.P.; FISCHER, P.M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative disease. **Nat Rev Drug Discov** 6: 464-479, 2007.
- MCGEER, E.G; MCGEER, P.L. Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. **Mol Interv** 1(1): 22-29, 2001.
- MCGEER, E.G; MCGEER, P.L. Inflammntory processes in Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 27: 741-749, 2003.
- 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.
- MOORE, A.H.; O'BANION, K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. **Adv Drug Del Rev** 54: 1627-1656, 2002.
- MOUNT, C.; DOWNTON, C. Alzheimer disease: progress or profit? **Nat Med** 12: 780-784, 2006.
- 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.
- NEWMAN, M., MUSGRAVE, F.I., LARDELLI, M. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. **Biochim and Biophys Acta** 1772: 285-297, 2007.
- NORABERG, J.; KRISTENSEN, B.W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res Protocol** 3: 278-290, 1999.
- NORABERG, J.; POULSEN, F.R.; BLAABJERG, M.; KRISTENSEN, B.W.; BONDE, C.; MONTERO, M.; MEYER, M.; GRAMSBERG, J.B.; ZIMMER, J. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disor** 4(4): 435-452, 2005.
- PANDI-PERUMAL, S.R.; ZISAPEL, N.; SRINIVASAN, V.; CARDINALI, D.P. Melatonin and sleep in aging population. **Exp Gerontol** 40: 911-925, 2005.

- PARK, K.W.; LEE, H.G.; JIN, B.K.; LEE, Y.B. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. **Exp Mol Med** 39: 812-819, 2007.
- PATEL, D.; GOOD, T. A rapid method to measure beta-amyloid induced toxicity in vitro. **J Neurosci Methods** 161: 1-10, 2007.
- PETERSON, G.L. Review of the folin-phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Anal Biochem** 100: 201-220, 1979.
- 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** 422: 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** 64: 253-265, 1995.
- REFOLO, L.M.; FILLIT, H.M. New directions in neuroprotection: basic mechanisms, molecular targets and treatment strategies. **J Alzheimer Dis** 6: 1-2, 2004.
- REITER, R.J. Melatonin: clinical relevance. **Best Pract Res Clin Endoc Metab** 17: 273-285, 2003.
- ROCK, R.B.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W.S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P.K. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev** 17: 942-964, 2004.

- RODRÍGUEZ, M.I.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L.C.; LÓPEZ, A.; GARCÍA, J.A.; ORTIZ, F.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. **J Pineal Res** 42(3): 272-279, 2007.
- RYDER, J.; SU, Y.; NI, B. Akt/GSK3 β serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. **Cell Signal** 16: 187-200, 2004.
- SELKOE, D.J. Alzheimer's Disease is a synaptic failure. **Science** 298:789-79, 2002.
- SELKOE, D.J.; SCHENK, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 43: 545-584, 2003.
- SENGUPTA, A.; GRUNKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Regulation of phosphorylation of tau by protein kinases in rat brain. **Neurochem Res** 31(12): 1473-1480, 2006.
- SHEN, Y.; ZHANG, G.; LIU, L.; XU, S. Suppressive effects of melatonin on amyloid-beta-induced glial activation in rat hippocampus. **Arch Med Res** 38(3): 284-290, 2007.
- SHOJI, M.; GOLDE, T.T.; GHISO, J.; CHEUNG, T.T.; ESTUS, S.; SHAFFER, L.M.; CAI, X.; MCKAY, D.M.; TINTNER, R.; FRANGIONE, B.; YOUNKIN, S.G. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **Science** 258: 126-129, 1992.
- SRINIVASAN, V.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALE, D.P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Behav Brain Funct** 15(2): 1-23, 2006.

- SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J.P. Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol** 2: 140-153, 2007.
- STOPPINI, L.; BUCHS, P.A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods** 37: 173-182, 1991.
- STREIT, W.J.; KREUTZBERG, G.W. Lectin binding by resting and reactive microglia. **J Neurocytol** 16(2): 249-260, 1987.
- TAKASHIMA, A.; HONDA, T.; YASUTAKE, K.; MICHEL, G.; MURAYAMA, O.; MURAYAMA, M.; ISHIGURO, K.; YAMAGUCHI, H. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. **Neurosci Res** 31: 317-323, 1998.
- TAN, J.; TOWN, T.; MORI, T.; WU, Y.; SAXE, M.; CRAWFORD, F.; MULLAN, M. CD45 opposes β -amyloid peptide-induced microglial activation via inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase. **J Neurosci** 20: 7587-7594, 2000.
- 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** 990: 141-147, 2003.
- TUPPO, E.; ARIAS, H. 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol** 37: 289-305, 2005.
- 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 immunoccontent in response to preconditioning to oxygen

- and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience** 118: 379-386, 2003.
- VAN DAM, D.; DE DEYN, P.P. Drug Discovery in dementia: the role of rodent models. **Nat Rev Drug Discov** 5: 956-970, 2006.
- WAGMAN, S.A.; JOHNSON, K.W.; BUSSIERE, D.E. Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. **Curr Pharm Des** 10: 1105-1137, 2004.
- WALSH, D.M.; SELKOE, D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron** 44: 181-193, 2004.
- WANG, J.Z.; WANG, Z.F. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. **Acta Pharmacol Sin** 27(1): 41-49, 2006.
- WANG, J.Z.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. **Eur J Neurosci** 25: 59-68, 2007.
- 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.
- WESTERMAN, M.A.; COOPER-BLACKETER, D.; MARIASH, A.; KOTILINEK, L.; KAWARABAYASHI, T.; YOUNKIN, L.H.; CARLSON, G.A., YOUNKIN, S.G, ASHE, K.H. The relationship between Ab and memory in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci** 22: 1858-1867, 2002.

- WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer's disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med** 12(9): 1005-1015, 2006.
- XIANG, Z.; VALDELLON, J.; BORCHELT, D.; KELLEY, K.; SPIELMAN, L.; AISEN, P.S.; PASINETTI, G.A. Cyclooxygenase (COX)-2 and cyclase activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease neuropathology. **Neurobiol Aging** 23: 327-334, 2002.
- XIE, Z.; SMITH, C.J.; VAN ELDIK, L.J. Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. **Glia** 45(2): 170-179, 2004.
- YIN, J.; LIU, Y.H.; XU, Y.F.; ZHANG, Y.J.; CHEN, J.G.; SHU, B.H.; WANG, J.Z. Melatonin arrests peroxynitrite-induced tau hyperphosphorylation and the overactivation of protein kinases in rat brain. **J Pineal Res** 41, 124-129, 2006.
- ZAHEER, A.; ZAHEER, S.; THANGAVEL, R.; WU, Y.; SAHU, S.K.; YANG, B. Glia maturation factor modulates β -amyloid-induced glial activation, inflammatory cytokine/chemokine production and neuronal damage. **Brain Res** 1208: 192-203, 2008.
- ZAMIN, L.L.; DILLENBURG-PILLA, P.; ARGENTA-COMIRAN, R.; HORN, A.P.; SIMÃO, F.; NASSIF, M.; GERHARDT, D.; FROZZA, R.L.; SALBEGO, C.G. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI-3K pathway. **Neurobiol Dis** 24:170-182, 2006.

ZHENG, W.H.; BASTIANETTO, S.; MENNICKEN, F.; MA, W., KAR, S. Amyloid β peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience** 115: 201-211, 2002.

9. ANEXO

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

Neurochemistry International

Guide for Authors

I. General

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

1. Types of communication

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

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

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

2. Submission.

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

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

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

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

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

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

II. Experimental Procedures

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

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

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

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

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

III. Manuscript requirements

1. Form

(a) Manuscripts should be typewritten with one and a half or double spacing throughout and with margins at least 2.5 cm wide. If possible, A4 size (210 x 297 mm) paper should be used. Four copies of each manuscript should be submitted to facilitate reviewing by referees. It is only necessary to send

photocopies of diagrams, or rough prints of halftones, with the third and fourth copies.

(b) Each manuscript must have a title page which includes only the title, the authors' names, the laboratory or origin, the name and address of the person to whom proofs should be mailed, **including a Fax number and e-mail address where possible**, and any necessary footnotes. The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided. Original manuscripts and diagrams are discarded 1 month after publication unless the Publisher is requested to return original material to the author. Corrections to the proof should be restricted to printer's errors. Substantial alterations may be charged to the author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections to any articles cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.

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

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

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

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

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

(h) Greek characters should be clearly identified.

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

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

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

2. Style

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

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

3. Organization

(a) Each paper must begin with a brief *Abstract*. It should not exceed 300 words. The first paragraph of the abstract should summarize the results obtained, the final paragraph should summarize the major conclusions in such a way that a reader not familiar with the techniques used can see any implications for his area of neuroscience. Abbreviations must not be used in the Abstract.

(b) The remaining text of all papers, however short, should be organized in the following four main sections:

(i) An *introductory statement* should first 'set the scene' for a non-specialist and then continue with the specific reasons for undertaking the investigation. Exhaustive reviews of the literature should be avoided

and no attempt should be made to indicate the results obtained. The heading 'Introduction' should be omitted.

(ii) *Experimental procedures*. Procedures used should be given in sufficient detail to permit the repetition of the work by others. However, published procedures should only be briefly summarized and only described in detail if they have been substantially modified. Special chemicals, drugs, etc. with their sources of supply should be grouped under a separate subheading *Materials*.

(iii) *Results*. In this section findings should be described without discussion of their significance. Sub-sections should be used in order to clarify the expression of the results.

(iv) *Discussion*. In this section the authors' interpretations of their findings should be accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work. Repetition of material given under 'Results' should be avoided. *Sub-sections should be used wherever possible* and sub-sections dealing with technical or highly specialized matter should be clearly separated from the rest of the text so that they can be printed in small type.

4. Presentation of data in tables or figures

(a) In general, tables and figures should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text.

(b) Each figure must be accompanied by a caption and explanatory legend typed on a separate sheet.

(c) Care should be taken to present data in a precise manner. For example, histograms should not be used when the data can equally well be given in a Table.

(d) *Figures*:

(i) Each figure must have its number, the authors' names and '*Neurochemistry International*' written lightly on the reverse side.

(ii) Line drawings should be on white card or paper. Where possible, illustrations should be submitted in a form *suitable for direct reproduction*. Delay in publication is inevitable if figures require redrawing. Line drawings should normally be about twice the final size; in no case should the dimensions exceed 20 x 30 cm.

(iii) Symbols on graphs, etc. should be inserted by the author using the following standard characters:

^ • ~ □ X +

5. References

(a) In the text, references should be quoted by giving author's name, followed by the year of publication in parentheses. For more than two authors, the name of the first author is given followed by the words 'et al.'.

(b) The reference list should be typed separately at the end of the manuscript in alphabetical order and arranged as follows: author's name and initials, year, title of the article, full journal title, volume, *first* and *last* page numbers.

For example:

Betz, H., Becker, C.-M., 1988. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochemistry International* 13, 137-146.

References to books should include the author's name and initials, year, title of book, volume, page numbers, publisher and place of publication. Where relevant, the title of a paper within a book, and the editor's names, should be given.

For example:

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

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

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

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

6. Abbreviations

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

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

7. Chemical and biochemical nomenclature

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