

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

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TOXICIDADE DE
OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO β -AMILOIDE EM CULTURA
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS

ANDRÉ BEVILACQUA MENEGHETTI

Porto Alegre

2014

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

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TOXICIDADE DE
OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO β -AMILOIDE EM CULTURA
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS**

ANDRÉ BEVILACQUA MENEGHETTI

Orientadora: Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego

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

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

BEVILACQUA MENEGHETTI, ANDRÉ
AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TOXICIDADE
DE OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO BETA-AMILOIDE EM CULTURA
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATOS / ANDRÉ BEVILACQUA
MENEGHETTI. -- 2014.
95 f.

Orientador: CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. ALZHEIMER'S DISEASE. 2. AMILOID-BETA
OLIGOMERS. 3. ORGANOTYPIC CULTURE. 4. MAPK. I.
GAZZANA SALBEGO, CHRISTIANNE, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Christianne, por ter aceitado me orientar e me proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho. Por ter acreditado em mim, pela amizade, liberdade e pelo excelente exemplo de profissionalismo e ética.

Ao Rudimar e à Juliana, por todo aprendizado que me proporcionaram, pela amizade, por toda a ajuda e conversas. Vocês tiveram grande importância para realização deste trabalho.

À Bruna e ao Leon, por toda ajuda nos experimentos, inclusive nos finais de semana, pela amizade e pelas boas conversas.

A todos os colegas do Grupo de Neuroproteção e Sinalização Celular que tive o prazer de conviver, pela amizade, pelas trocas de ideias, pelo companheirismo e momentos de descontração.

À Profa. Cristiane Matté e seu grupo, pela parceria formada no Laboratório 23 e pelos ótimos momentos de descontração.

A todos os amigos dos diversos laboratórios com os quais convivi neste período no Departamento de Bioquímica.

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

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos durante minha graduação em Farmácia e pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

A minha família, principalmente ao meu tio Fernando, que sempre me ajudou e encorajou para realização desta pós-graduação. Agradeço aos meus pais, especialmente à minha mãe, Maira, que mesmo morando longe, sempre me apoiou e me deu todo suporte necessário durante todos esses anos de estudo.

À Sabrina, minha namorada, que esteve ao meu lado durante todo o mestrado. Pela amizade, ajuda, ideias, incentivo e cobranças, que foram de grande importância para realização deste trabalho. Pelo companheirismo e principalmente por todo amor e carinho que me fazem cada dia mais feliz!

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Doença de Alzheimer: prevalência e principais características.....	8
1.2. Proteína <i>tau</i>	11
1.3. Proteína β -amiloide.....	12
1.4. A hipótese da cascata amiloide e a toxicidade dos oligômeros.....	15
1.5. Sinalização celular e oligômeros do peptídeo A β	18
1.6. Modelos experimentais de toxicidade do peptídeo A β	21
2. OBJETIVOS.....	23
PARTE II	25
3. CAPÍTULO I: Evaluation of the molecular mechanisms of Amyloid- β oligomers toxicity in organotypic hippocampal slice cultures.....	26
PARTE III	58
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÕES.....	66
6. PERSPECTIVAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
LISTA DE FIGURAS.....	81
8. ANEXOS.....	82

PARTE I

RESUMO

A doença de Alzheimer é a principal e a mais comum desordem neurodegenerativa relacionada à idade. O número de pessoas afetadas pela doença de Alzheimer vem crescendo bastante nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da expectativa de vida da população. As causas para o desenvolvimento da doença de Alzheimer são bastante complexas, envolvendo uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. Os emaranhados neurofibrilares, constituídos pela proteína *tau* hiperfosforilada, e as placas senis, compostas pelo peptídeo β -amiloide, são as duas principais alterações fisiopatológicas encontradas nessa patologia. Existe uma ampla variedade de evidências genéticas, fisiológicas e bioquímicas que suportam a ideia que o peptídeo β -amiloide é ao menos uma das causas que originam a doença de Alzheimer. Na forma monomérica, o peptídeo β -amiloide parece não exercer efeitos tóxicos. Porém, conforme estas formas monoméricas se polimerizam formando intermediários solúveis denominados oligômeros, e por fim protofibrilas e fibrilas, exercem consideráveis efeitos neurotóxicos. Os oligômeros do peptídeo β -amiloide são capazes de se correlacionar de forma mais consistente com os distúrbios cognitivos observados na doença de Alzheimer. Além disso, diversos trabalhos atribuem às alterações sinápticas um dos principais mecanismos de toxicidade dos oligômeros do peptídeo β -amiloide. Para isso, diversas vias de sinalização sofrem alteração no seu funcionamento, como a via das MAPKs, destacando as proteínas JNK1/2 e ERK1/2, e a via Wnt/ β -catenina. Neste trabalho nós procuramos avaliar os mecanismos moleculares de toxicidade dos oligômeros do peptídeo β -amiloide em culturas organotípicas de hipocampo de ratos. Para isso, as culturas foram expostas às concentrações de 0,5; 1 e 2 μ M por um período de 48h. A morte celular foi avaliada a partir da incorporação do iodeto de propídeo, um marcador de morte celular de células principalmente em processo de necrose. A exposição das culturas a todas as concentrações testadas não foi capaz de causar um aumento significativo na morte celular. Entretanto, observamos um decréscimo nos níveis da proteína sinaptofisina por *Western blotting* em todas as concentrações utilizadas. Essas alterações nos níveis de sinaptofisina foram acompanhadas pela ativação da proteína JNK, ou seja, pelo aumento da sua fosforilação, e pela inibição da proteína ERK, que teve seus níveis de fosforilação diminuídos. Nós também observamos uma diminuição no imunoconteúdo da proteína β -catenina. A avaliação dos níveis de fosforilação da GSK-3 β e β -catenina não apresentou resultado significativo. Embora mais estudos sejam necessários para avaliar os mecanismos de toxicidade dos oligômeros do peptídeo β -amiloide, nossos resultados sugerem uma perda sináptica nas culturas organotípicas, uma das primeiras características observadas na doença de Alzheimer. Acreditamos que esse modelo possa ser utilizado no estudo de fatores fisiológicos e compostos farmacológicos relacionados com a doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the principal and the most common neurodegenerative age-related disorder. The number of patients affected by Alzheimer's disease has increased greatly in recent years, mainly due to increase in life expectancy of the population. The causes for the development of Alzheimer's disease are quite complex, involving a combination of genetics, molecular, and environmental factors. Neurofibrillary tangles, formed by hyperphosphorylated *tau* protein, and senile plaques, composed of amyloid- β peptide, are the two major pathological changes found in Alzheimer's disease. A wide variety of genetic, physiological, and biochemical evidences support the idea that amyloid- β peptide is at least one of the main causes of Alzheimer's disease. In monomeric form the amyloid- β peptide appears did not exert toxic effects. However, as these monomers polymerize forming soluble intermediates called oligomers, and after protofibrils and fibrils, exert considerable neurotoxic effects. The amyloid- β oligomers peptide are more consistently correlated to cognitive disturbances observed in Alzheimer's disease. In addition, several works have attributed to synaptic changes a major mechanism of amyloid- β oligomers toxicity. Several signaling pathways become altered in their work due to amyloid- β oligomers, such as MAPK pathway, highlighting JNK1/2 and ERK1/2 proteins, and Wnt/ β -catenina. In this work, we evaluated the molecular mechanisms of amyloid- β oligomers toxicity in rat organotypic hippocampal slice cultures. For this purpose, cultures were exposed to concentrations of 0.5, 1, and 2 μ M of amyloid- β oligomers for 48h. Cell death was assessed from the incorporation of propidium iodide, a marker of cell that are mainly in the necrosis process death. Exposure of all concentrations tested was not able to induce a significant increase in cell death in cultures. However, a decrease in synaptophysin protein levels by Western blotting occurred in all concentrations. These changes in synaptophysin levels were accompanied by JNK activation and ERK inhibition. We also observed a decrease in β -catenin protein immunocontent. The evaluation of GSK-3 β and β -catenin phosphorylation showed no significant alterations. Although further studies are necessary for understanding the mechanisms underlying amyloid- β oligomers toxicity, our data suggest synaptic loss in organotypic cultures, one of the earlier characteristics of AD, may be considered a good model to study physiologic factors and pharmacologic compounds AD-related.

LISTA DE ABREVIATURAS

A β – beta-amiloide (*Amyloid-beta*)

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

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

A β Os – peptídeo beta-amiloide na forma de oligômeros

ADDL – ligantes difundíveis derivados do peptídeo β -amiloide (*Amyloid-beta derived diffusible ligands*)

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

APP – proteína precursora amiloide (*Amyloid precursor protein*)

ApoE – apolipoproteína E

ASPD – agregados esféricos do β -amiloide (*Amylospheroid*)

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

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

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

cdk5 – cinase dependente de ciclina-5 (*Cyclin-dependent kinase 5*)

CREB – proteína ligante ao elemento de resposta do cAMP (*cAMP-regulatory element binding*)

CTF83 – fragmento C-terminal da APP associado à membrana contendo 83 aminoácidos

CTF99 – fragmento C-terminal da APP associado a membrana contendo 99 aminoácidos

DA – Doença de Alzheimer

ENFs – emaranhados neurofibrilares

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

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

FDA – *Food and Drug Administration*

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

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

LPR1 – receptor de lipoproteína de baixa densidade 1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*)

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

LOAD – Doença de Alzheimer de início tardio (*Late-onset Alzheimer's Disease*)

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

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

NFTs – emaranhados neurofibrilares (*Neurofibrillary tangles*)

NGF – receptor do fator de crescimento nervoso (*Nerve growth factor*)

NMDA – receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato

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

PI – iodeto de propídeo (*propidium iodide*)

PI3K – via da fosfatidilinositol-3-cinase

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

PrP^c – proteína celular príon (*Cellular prion protein*)

PS – presinilina (*Presenilin*)

PSs – placas senis

SAPK – proteína cinase ativada por estresse (*Stress-Activated Protein kinase*)

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer: prevalência e principais características

A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência entre a população idosa, abrangendo entre 60 a 80% de todos os casos. De acordo com estudos epidemiológicos, entre 7 a 10% dos indivíduos com mais de 65 anos e 50 a 60% acima de 85 anos sofrem com a DA. São estimados que em torno de 35,6 milhões de pessoas apresentaram a DA no mundo em 2010, e que esse número tende a quase duplicar em 20 anos, passando para 65,7 milhões, podendo chegar a 115,4 milhões em 2050 (Mielke et al., 2014; Silva et al., 2014). O principal fator responsável pelo crescente número de pessoas diagnosticadas com DA é o aumento da expectativa de vida. Com os avanços nas áreas da saúde, a humanidade vem passando por uma transição demográfica nas últimas décadas, sendo que o perfil da população está se alterando de um predomínio de jovens e adultos para uma população idosa. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, por exemplo, em 1990, a expectativa de vida ao nascer era de 63 anos, em 2012, aumentou para 70 anos. Os números relacionados à DA *per se* já denotam a importância desta patologia, somado a estes, sob o ponto de vista econômico, estima-se um custo de mais de 214 bilhões de dólares em 2014 somente nos Estados Unidos (US Alzheimer's Association, 2014).

Uma das primeiras manifestações clínicas de pacientes acometidos pela DA é a dificuldade em lembrar-se de informações adquiridas recentemente, devido à deterioração de domínios cognitivos seletivos, em especial aqueles relacionados com a memória (Laferla et al., 2007). Com o avanço da doença, os sintomas começam a ficar mais graves, incluindo desorientação, alterações

de humor e comportamento, dificuldade para falar, engolir e andar, que geram um comprometimento significativo da qualidade de vida dos pacientes, levando à dependência absoluta, hospitalização e à morte (Silva et al., 2014). Segundo o *US Food and Drug Administration* (FDA), apenas cinco medicamentos são aprovados para serem utilizados no tratamento da DA, sendo quatro deles inibidores da acetilcolinesterase e a memantina, um antagonista não-competitivo do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA - *N-methyl-D-aspartate*). Entretanto, estes se limitam apenas ao tratamento dos sintomas da doença, não impedindo o seu progresso.

As causas para o desenvolvimento da DA são bastante complexas, envolvendo uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. Baseando-se na idade de início de aparecimento dos sintomas, a DA pode ser classificada em DA de início precoce ou familiar (FAD – *Familial Alzheimer's disease*, início < 65 anos) e DA de início tardio ou esporádico (LOAD - *Late-onset Alzheimer's disease*, início > 65 anos). O primeiro tipo é mais raro, acometendo entre 1 a 5% dos casos, e o segundo, mais de 95% do total (Mattson, 2004; Reitz e Mayeux, 2014a). Nos casos de FAD, estudos genéticos demonstram mutações nas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e na proteína precursora amiloide (APP – *Amyloid Precursor Protein*) (Koo e Kopan, 2004; Bettens et al., 2013; Müller et al., 2013). Em relação aos casos de LOAD, apesar de o envelhecimento ser o principal fator de risco para o seu desenvolvimento, outros fatores estão relacionados, tais como: sexo feminino, obesidade, dislipidemia, baixa índice de escolaridade, diabetes, hipertensão e doenças metabólicas (Reitz e Mayeux, 2014a).

Além disso, mutações no alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (ApoE) foram confirmadas como fator que aumenta os riscos de desenvolvimento da forma esporádica da doença e também da forma familiar de herança autossômica dominante. Aproximadamente 50% dos pacientes que desenvolvem a forma esporádica da doença apresentam o alelo $\epsilon 4$ da ApoE. Por outro lado, a presença de uma cópia deste alelo aumenta em três vezes as chances de desenvolver a doença, enquanto que duas cópias em torno de doze vezes (Van Der Flier et al., 2011; Verghese et al., 2011). A ApoE participa da remoção do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), via proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade-1 (LPR1), formando um complexo ApoE/ $A\beta$. Entretanto, o alelo $\epsilon 4$ da ApoE liga-se com uma menor afinidade ao peptídeo $A\beta$, reduzindo a capacidade de remoção do mesmo e promovendo seu acúmulo e formação das placas senis (Bu, 2009).

O cérebro de um paciente com DA apresenta uma redução de tamanho macroscopicamente visível, envolvendo regiões cerebrais relacionadas com o processo de aprendizagem e memória, incluindo os lobos frontal e temporal, resultado da intensa degeneração sináptica e morte neuronal (Mattson, 2004). Em nível molecular, trata-se de uma progressão complexa que envolve uma cascata de interações patológicas sequenciais, incluindo a agregação do peptídeo $A\beta$ através da clivagem proteolítica da APP por β - e γ -secretases com o desenvolvimento de placas senis (PSs) extracelulares, e a hiperfosforilação e agregação da proteína *tau* formando os emaranhados neurofibrilares (ENFs) (Laferla et al., 2007; Zhang et al., 2012).

1.2. Proteína *tau*

A *tau* pertence à classe de proteínas associadas aos microtúbulos (MAP – *Microtubule Associated Proteins*) que, em condições fisiológicas, regula a estabilização, a dinâmica e a organização espacial dos microtúbulos. Tem sido demonstrado o envolvimento da *tau* no transporte axonal de organelas, incluindo a mitocôndria. A *tau* é altamente expressa no cérebro, principalmente em axônios de neurônios. Em situações patológicas, como ocorre na DA e em outras doenças neurodegenerativas denominadas taupatias, a *tau* torna-se altamente fosforilada e perde sua estabilidade, e assim, desprende-se dos microtúbulos. Principalmente no corpo celular e dendritos de neurônios, a *tau* hiperfosforilada se acumula e forma os filamentos helicoidais pareados (PHF – *Paired helical filaments*) que, através de um processamento proteolítico, acarreta a formação de oligômeros da *tau* e os ENFs (Figura 1) (Ittner e Götz, 2010; Querfurth e Laferla, 2010; Medina e Avila, 2014).

A hiperfosforilação da *tau* é um evento relacionado diretamente com o aumento da atividade de proteínas cinases e diminuição da atividade de fosfatases. Dentre as principais proteínas que fosforilam a *tau*, destacam-se a glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), a proteína cinase dependente de ciclina 5 (cdk5), a proteína cinase A (PKA), as proteínas cinase mitógeno-ativadas (MAPK) ERK 1/2, bem como as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPks). A perda de atividade da *tau* ocasionada pela hiperfosforilação compromete o transporte axonal e contribui para a disfunção sináptica e morte neuronal observada na DA (Mazanetz e Fischer, 2007; Querfurth e Laferla, 2010; Wang et al., 2013).

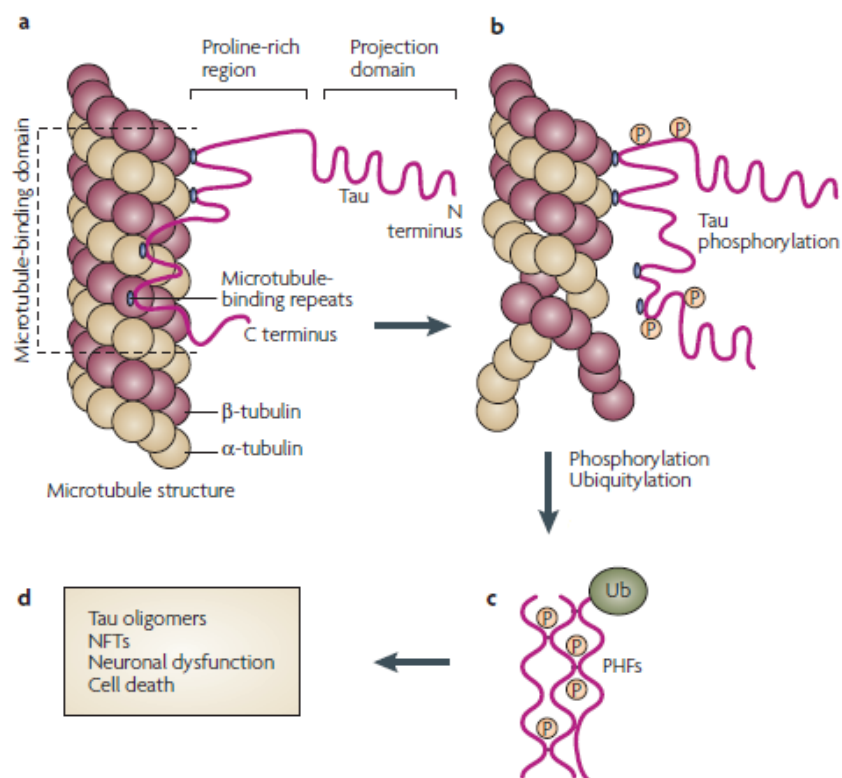


Figura 1 – Mecanismo de formação dos emaranhados neurofibrilares. a) A proteína *tau* ligada aos resíduos de α e β -tubulinas nos microtúbulos, exercendo um papel fundamental para estabilização destes. b) A fosforilação em sítios de serina/treonina altera a afinidade da *tau* com os microtúbulos, desestabilizando-os. c) Agregação da *tau* formando os filamentos helicoidais pareados (PHFs). d) Formação dos emaranhados neurofibrilares (NFTs) contribui para disfunção neuronal e morte celular (adaptada de Mazanetz e Fischer, 2007).

1.3. Peptídeo β -amiloide

O peptídeo $A\beta$ é produzido através da clivagem proteolítica da APP, uma glicoproteína transmembrana amplamente expressa por todos os tipos celulares. A APP é uma proteína integral de membrana tipo I, com um amplo domínio extracelular, uma porção hidrofóbica transmembrana e um pequeno resíduo C-terminal denominado domínio intracelular da APP (AICD – *APP intracellular domain*). O gene da APP está localizado no cromossomo 21 e

contém 18 éxons. Existem 8 isoformas da APP que são geradas por *splicing* alternativo, alcançando um tamanho de 695 a 770 aminoácidos. Dentre estas isoformas, a de 695 aminoácidos (APP695) é a mais expressa no cérebro e é produzida principalmente pelos neurônios (O'Brien e Wong, 2011; Zhang et al., 2012).

A APP sofre processamento por diversas secretases e proteases diferentes através de dois caminhos: o processamento amiloidogênico e o não-amiloidogênico. No processamento não amiloidogênico, a APP é sequencialmente clivada pela α -secretase e γ -secretase. A α -secretase cliva a APP no meio da sequência de aminoácidos (entre a Lis16-Leu17) no qual geraria o peptídeo A β , liberando um grande ectodomínio solúvel chamado sAPP α e um fragmento C-terminal associado a membrana contendo 83 aminoácidos (CTF83). O fragmento CTF83 é posteriormente clivado pela γ -secretase para liberar o peptídeo P3 e o AICD, sendo ambos degradados rapidamente. Alternativamente, a geração do peptídeo A β ocorre no processamento amiloidogênico através da clivagem da APP inicialmente pela enzima β -secretase ou *β -site APP cleaving enzyme 1* (BACE1), formando um domínio extracelular chamado sAPP β e um fragmento C-terminal associado a membrana contendo 99 aminoácidos (CTF99), que contém a sequência do A β e o AICD. Em seguida, a enzima γ -secretase cliva o fragmento CTF99 entre os aminoácidos 38 e 43 liberando o peptídeo A β (Figura 2) (Laferla et al., 2007; Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2011; Zhang et al., 2012).

O peptídeo A β produzido a partir do processamento da APP varia no tamanho, sendo a maior produção da sequência contendo 40 aminoácidos (A β 1-40), e em segundo, com um percentual de aproximadamente 10%, o

peptídeo com 42 aminoácidos (A β 1-42). Este é a forma mais hidrofóbica e a que apresenta maior facilidade de formar fibrilas, sendo por isso a predominante nas placas senis. Na forma monomérica o peptídeo A β parece não exercer efeitos tóxicos. Porém, conforme estas formas monoméricas se polimerizam formando intermediários solúveis denominados oligômeros, e por fim protofibrilas e fibrilas, ele apresenta uma potente atividade bloqueadora da potenciação de longa duração (LTP) e afeta de forma significativa diversas vias de sinalização (Lambert et al., 1998; Laferla et al., 2007; Cavallucci et al., 2012). Quando ocorre um desequilíbrio onde a produção e agregação superam a degradação do peptídeo A β , ocorre um acúmulo do mesmo e este excesso pode ser um fator inicial da DA, desencadeando uma série de eventos celulares e moleculares que culminam na disfunção sináptica e na morte neuronal.

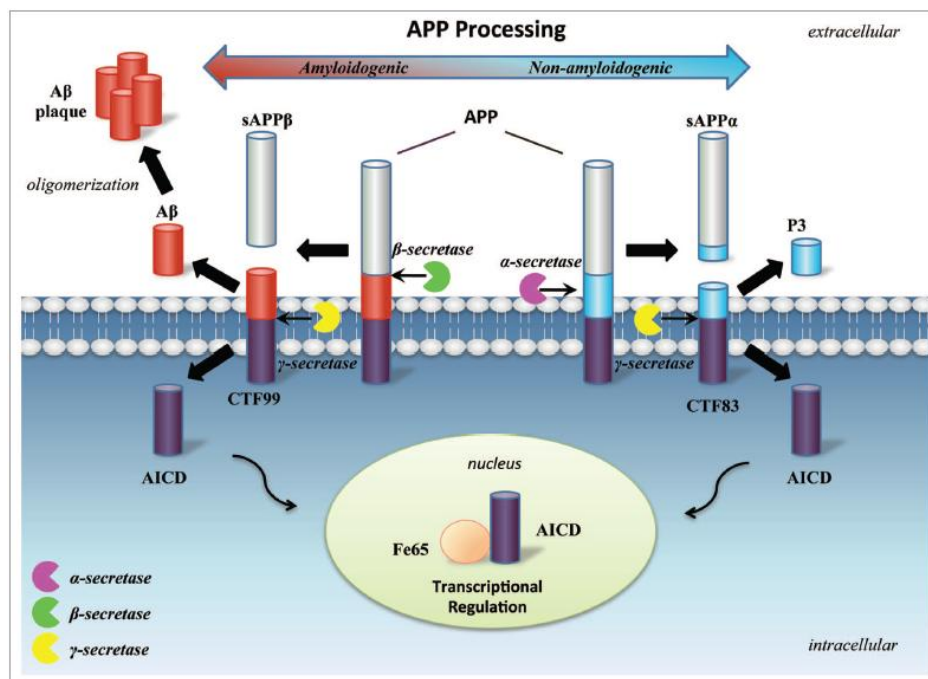


Figura 2 - Processamento proteolítico da APP. Processamento não-amiloidogênico da APP pelas enzimas α - e γ -secretases, sem a geração do peptídeo A β (direita). Processamento amiloidogênico da APP pelas enzimas β - e γ -secretases, formando o peptídeo A β de 38 a 43 aminoácidos (esquerda) (adaptada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

1.4. A hipótese da cascata amiloide e a toxicidade dos oligômeros

O peptídeo A β está naturalmente presente no cérebro e fluido cefalorraquidiano de seres humanos saudáveis durante toda a vida. A hipótese da cascata amiloide surgiu em 1992, quando Hardy e Higgins (Hardy e Higgins, 1992) colocaram as fibrilas insolúveis do peptídeo A β como as primeiras espécies tóxicas na DA, e a formação dos emaranhados neurofibrilares, perda sináptica e morte das células neuronais como um evento secundário. A origem desta hipótese veio da descoberta de que uma das variantes da DA possui herança autossômica dominante, a partir de uma mutação no gene que codifica a APP e nas presinilinas, o que aumentaria a produção do peptídeo A β , evento suficiente para desenvolver a doença. Entretanto, esta hipótese não considerava a interação do A β com a proteína *tau*. Descobertas de que mutações no gene que codifica a proteína *tau* podem levar a um tipo de demência autossômica dominante no lobo frontotemporal, sem o aparecimento de placas senis, mostram que os emaranhados neurofibrilares podem causar perda neuronal *per se*. Essas observações colocaram as alterações patológicas na *tau* como um evento *downstream* da formação das placas senis (Hardy e Selkoe, 2002; Karran et al., 2011; Carrillo-Mora et al., 2014).

Embora a hipótese amiloide forneça um panorama geral para explicar a patogênese da DA, ela carece de detalhes, e algumas observações não se encaixam com a versão mais simples da hipótese. Primeiro, a quantidade de placas e sua distribuição se correlacionam fracamente com a severidade dos sintomas em pacientes com a DA (Perrin et al., 2009). Segundo, em vários modelos animais transgênicos para APP a perda neuronal e anormalidades

comportamentais têm surgido antes da formação das placas senis (Mucke et al., 2000). Em terceiro, a concentração de peptídeo A β necessária para fibrilação e neurotoxicidade são maiores que as concentrações fisiológicas (Gilbert, 2013). Com base nessas evidências e questionando a hipótese da cascata amiloide, uma nova versão foi elaborada, a hipótese dos oligômeros tóxicos de A β .

No final da década de 90, dois trabalhos mostraram que os oligômeros do peptídeo A β (A β Os – *A β oligomers*) são capazes de se correlacionar de forma mais consistente com os distúrbios cognitivos observados na DA, sendo capazes de mediar sua toxicidade distante das placas senis, pois ao contrário destas, são solúveis (Lue et al., 1999; Mclean et al., 1999; Larson e Lesné, 2012). O mecanismo de formação dos A β Os ainda não é totalmente elucidado. Diferentes tamanhos e formatos já foram descritos com vias de formação diferentes, indicando a complexidade do mecanismo de formação, como pode ser observado na Figura 3. Além disso, a formação parece também diferir para oligômeros intracelulares e extracelulares (Sakono e Zako, 2010; Benilova et al., 2012).

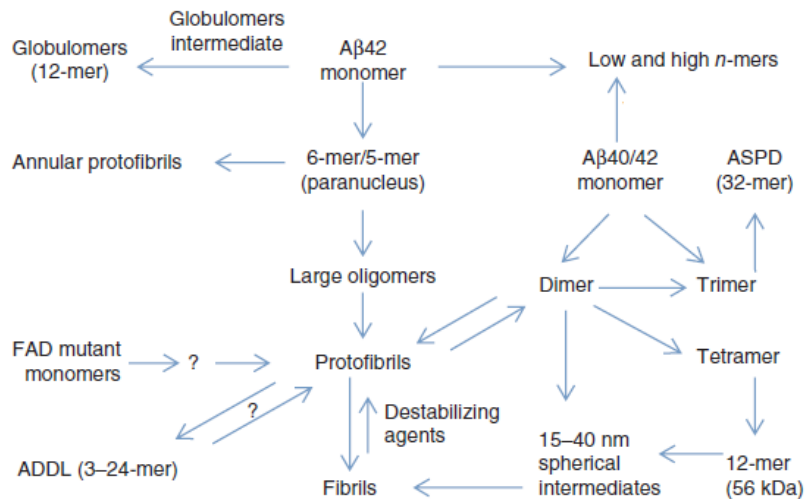


Figura 3 – Esquema de interconversão entre as diferentes espécies naturais e sintéticas do peptídeo Aβ. Monômeros, oligômeros e fibrilas de Aβ existem em um complexo equilíbrio. A coexistência de populações diferentes de oligômeros que podem ou não converter-se em fibrilas é possível. Apesar das diferenças estruturais, estabilidade e concentração, todos os oligômeros podem contribuir para toxicidade do peptídeo Aβ (adaptada de Benilova et al., 2012).

A toxicidade dos AβOs está bem documentada. Por exemplo, baixas concentrações de dímeros e trímeros solúveis do peptídeo Aβ são capazes de reduzir a densidade dos espinhos dendríticos e o número de sinapses eletrofisiologicamente ativas em neurônios piramidais de culturas de hipocampus de ratos. Além disso, são capazes de ativar receptores de glutamato NMDA, induzindo a depressão de longa duração (McClean et al., 1999; Benilova et al., 2012; Cavallucci et al., 2012). Diversos outros receptores proteicos têm sido apontados como capazes de se ligarem as várias formas dos AβOs, incluindo os receptores de insulina, o receptor do fator de crescimento nervoso (NGF – *Nerve growth factor*), a proteína celular príon (PrP^c – *Cellular prion protein*) e os receptores *Frizzled*, contribuindo para as alterações fisiológicas que levam a morte celular (Figura 4) (Sakono e Zako, 2010; Benilova et al., 2012; Giuffrida et al., 2012; Patel e Jhamandas, 2012).

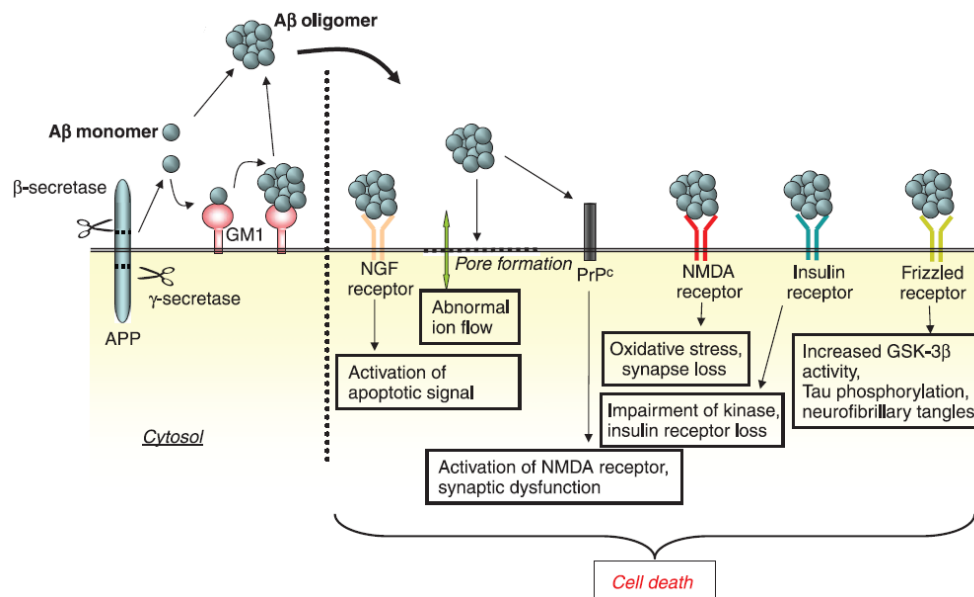


Figura 4 – Mecanismos de toxicidade de oligômeros extracelulares. Após a clivagem da APP, o peptídeo Aβ é liberado para o meio extracelular. Os oligômeros podem ser formados na presença do gangliosídeo GM1 na membrana celular e causar morte celular mediada pelo receptor do fator de crescimento nervoso (NGF). A proteína celular príon (PrP^c) pode atuar como um receptor dos oligômeros mediando a disfunção sináptica. O poro na membrana pode ser formado pelos oligômeros, causando um influxo de Ca²⁺, provocando disfunção celular. Além disso, a toxicidade dos oligômeros pode ser mediada através da ligação aos receptores NMDA, de insulina e Frizzled (adaptada de Sakono e Zako, 2010).

1.5. Sinalização celular e oligômeros do peptídeo Aβ

Boa parte do mecanismo de homeostase das células passa pelo bom funcionamento das vias de sinalização intracelulares, ou seja, o controle inadequado dessas vias pode ser responsável pelo desencadeamento ou agravamento de diversas patologias, entre elas as doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. As vias de sinalização envolvidas na DA foram resumidas em um mapa denominado *AlzPathway*, onde pode ser observada a complexidade da sinalização intra, inter e extracelular envolvida na doença. O mapa é composto por 1347 espécies (proteínas, complexos, moléculas simples, RNAs,

genes) e 1070 reações (Ogishima et al., 2013), e pode ser acessado em alzpathway.org.

As alterações cognitivas associadas aos primeiros estágios da DA são atribuídas às falhas sinápticas (Selkoe, 2002; Coleman e Yao, 2003; Bate e Williams, 2010). Além disso, diversos trabalhos atribuem às alterações sinápticas um dos principais mecanismos de toxicidade dos A β Os (Lacor et al., 2007; Overk e Masliah, 2014). Diversas vias de sinalização ao sofrerem alteração no seu funcionamento, podem levar à perda sináptica, tais como a via das MAPKs, destacando as proteínas JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e ERK1/2 (Kim e Choi, 2010; Sclip et al., 2011; Sclip et al., 2014). Além desta, a via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K/Akt) apresenta um grande papel na sobrevivência celular e também na plasticidade sináptica (Kim e Chung, 2002; Horwood et al., 2006; Chiang et al., 2010), sendo diretamente influenciada pela exposição ao peptídeo A β (Figura 5). Dentro desta via, a GSK-3 β é a principal cinase envolvida na fosforilação da proteína *tau*, é uma proteína altamente expressa no cérebro, está envolvida em importantes processos celulares e em uma variedade de vias intracelulares, incluindo diferenciação celular e apoptose. A GSK-3 β é considerada uma proteína pró-apoptótica por inibir uma série de fatores de transcrição importantes para sobrevivência celular (Li et al., 2002; Reddy, 2013).

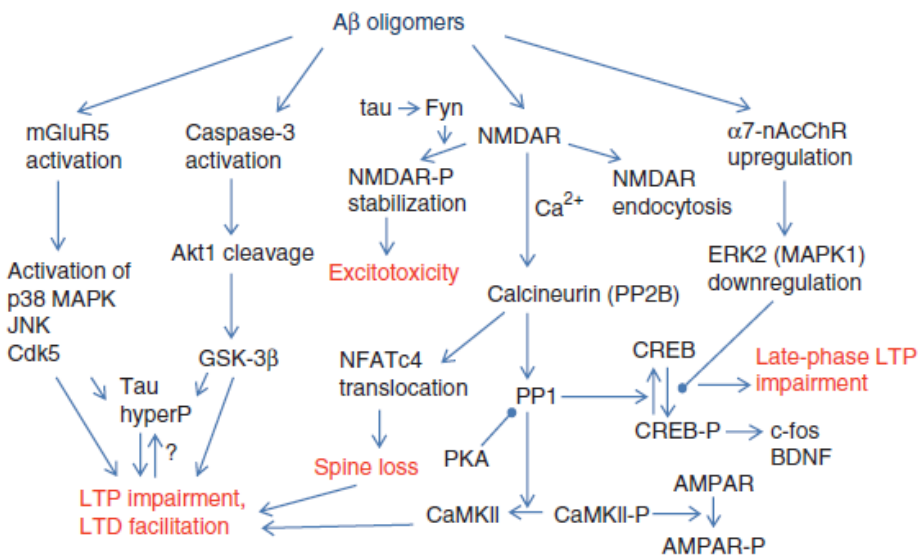


Figura 5 – Mecanismos moleculares propostos na literatura para a sinaptotoxicidade do peptídeo Aβ. O diagrama ilustra algumas vias de sinalização que são requeridas em diferentes paradigmas experimentais para explicar a sinaptotoxicidade. Ainda não existe um consenso sobre qual mecanismo seria mais relevante na DA (adaptada de Benilova et al., 2012). Abreviaturas: mGluR5, receptor metabotrópico de glutamato 5; AMPAR, receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato; CaMKII, proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina II; PKA, proteína cinase A; PP1, proteína fosfatase 1; NFATc4, fator nuclear de células T ativadas; α 7-nAChR, receptor nicotínico de acetilcolina α 7; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro.

Além disso, a GSK-3 β está envolvida na regulação dos níveis da proteína β -catenina, que faz parte da via canônica da Wnt (Inestrosa et al., 2012). Na sua forma ativada, a GSK-3 β atua fosforilando a β -catenina, desencadeando sua ubiquitinação e encaminhando-a para degradação no proteossoma, diminuindo desta forma sua atividade. Na forma desfosforilada, a β -catenina apresenta estabilidade e é capaz de se translocar para o núcleo

ativando uma série de fatores de transcrição, levando a efeitos neuroprotetores frente à toxicidade do peptídeo A β (Inestrosa et al., 2012; Purro et al., 2014; Vargas et al., 2014).

1.6. Modelos experimentais de toxicidade do peptídeo A β

Com finalidade de se obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DA, a busca por modelos *in vivo* e *in vitro* de toxicidade do peptídeo A β , que mimetizem ao máximo as alterações encontradas na doença, segue como um desafio para os pesquisadores. Devido ao alto custo desses modelos, peptídeos sintéticos do A β já foram desenvolvidos e surgem como importante ferramenta para o estudo desta patologia.

Dentre os modelos utilizados para compreensão dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do peptídeo A β , modelos em animais com injeção intracerebral do peptídeo A β têm sido utilizados com a finalidade de observar as alterações comportamentais e fisiológicas, além de ser um modelo utilizado para o teste de substâncias possivelmente terapêuticas (Bernardi et al., 2012; Frozza et al., 2013; Hoppe, Juliana B et al., 2013).

Nos modelos *in vitro*, o cultivo de tecido é uma importante alternativa aos modelos com animais, incluindo-se neste a cultura organotípica de hipocampo (Frozza et al., 2009; Hoppe et al., 2010). Ao contrário do cultivo celular que permite a análise em um conjunto de células isoladas, a cultura organotípica combina a acessibilidade com a preservação da multiplicidade celular original do tecido cerebral e das conexões interneurais (Norberg et al.,

2005). Dessa forma, a utilização desse modelo permite o estudo molecular das vias de sinalização envolvidas com a morte neuronal e danos na plasticidade sináptica induzida pela toxicidade do peptídeo A β (Holopainen, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos moleculares de toxicidade dos A β O_s em culturas organotípicas de hipocampo de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a morte celular induzida pelos A β O_s nas culturas organotípicas através da incorporação do iodeto de propídeo.
- b) Avaliar algumas das vias de sinalização que poderiam estar envolvidas na toxicidade dos A β O_s, tais como PI3K, Wnt/ β -catenina, MAPK, bem como o imunocconteúdo da proteína sinaptofisina.

PARTE III

4. DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer, uma desordem neurodegenerativa multifatorial, é a principal forma de demência relacionada à idade, responsável por mais de 60% dos casos, com tendência a se tornar um problema de saúde pública em razão do aumento da expectativa de vida da população mundial. Por isso, a DA tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade médica e científica. Doenças neurodegenerativas estão entre os problemas mais desafiadores da medicina. Embora os avanços nas pesquisas básicas e clínicas tenham mostrado progresso em relação ao entendimento do curso da DA, ela ainda é considerada uma das doenças mais complexas, uma vez que o completo entendimento dos seus mecanismos ainda está longe de ser elucidado. A teoria da cascata amiloide é a mais aceita pelos pesquisadores da DA. Essa teoria propõe que mudanças graduais na produção e agregação do peptídeo A β iniciam uma cascata de eventos moleculares que progridem para uma extensiva disfunção neuronal e morte celular, causando uma diminuição nos níveis de neurotransmissores e conseqüentemente ao desenvolvimento de um quadro de demência (Selkoe, 1991; Laferla et al., 2007). A perda sináptica está associada com os déficits cognitivos observados na DA (Selkoe, 2002; Nisticò et al., 2012), entretanto o mecanismo responsável pela perda das conexões ainda não está estabelecido. Primeiramente, acreditava-se que a perda sináptica ocorria devido às fibrilas amiloides insolúveis, porém, recentemente, vem sendo demonstrado que a disfunção sináptica e a neurodegeneração são as primeiras conseqüências da toxicidade dos A β Os (Klein, 2006; Benilova et al., 2012).

Mais de 20 anos atrás, foi demonstrado que o peptídeo A β monomérico não tóxico foi convertido para espécies tóxicas após incubação por alguns dias

em solução tamponada (Pike et al., 1991). A toxicidade foi associada ao aparecimento de espécies de alto peso molecular, confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrando a propriedade do peptídeo A β de se auto-agregar. A polimerização do peptídeo A β é um processo complexo e ocorre via intermediários metaestáveis (Lee et al., 2011). As placas amiloides podem existir à parte ou em equilíbrio com os A β Os, resultando em um misto de espécies neurotóxicas ao redor das placas que podem causar danos neuronais (Benilova et al., 2012). A multiplicidade de espécies de A β é derivada não somente de variações biológicas nativas, mas também de diferentes técnicas de preparação *in vitro* ou do isolamento *post mortem* de cérebro de pacientes com DA. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa já demonstraram o efeito do peptídeo A β fibrilado em modelos *in vitro* e *in vivo* (Bernardi et al., 2012; Frozza et al., 2013; Hoppe, Juliana Bender et al., 2013a; Hoppe, Juliana Bender et al., 2013b). Este é o primeiro trabalho em nosso grupo que utiliza a metodologia de preparação dos A β Os, visto que, atualmente, este é o modelo de preparação mais utilizado na literatura. A caracterização dos oligômeros por *Western blotting* utilizando o anticorpo 6E10 mostrou a presença de monômeros, trímeros, tetrâmeros, além de oligômeros de alto peso molecular, e confirmou também a ausência de fibrilas, de acordo com trabalhos anteriores (De Felice et al., 2008; Sebollela et al., 2012).

Neste estudo, nós avaliamos os mecanismos moleculares pelos quais os A β Os induzem neurotoxicidade utilizando um modelo de cultura organotípica de fatias de hipocampo de ratos. Nossos resultados demonstraram a toxicidade dos A β Os pela incorporação do iodeto de propídeo e por *Western blotting* para algumas proteínas que poderiam estar envolvidas na sinaptotoxicidade. No

presente trabalho, culturas organotípicas de fatias de hipocampo foram expostas a concentrações de 0,5 a 2 μ M de A β O por um período de 48h. Nestas condições não foi observada morte celular necrótica, uma vez que não houve um aumento significativo na incorporação do iodeto de propídeo. Esse resultado foi similar aos encontrados por Chong et al. (2006), apesar dos modelos apresentarem diferenças. Uma possível explicação pode ser o fato de que o tempo de exposição utilizado no experimento não foi suficiente para que a morte celular por necrose possa ser detectada nas culturas. Ainda, deve-se considerar que outros mecanismos de morte celular podem estar envolvidos, os quais não são detectados pela metodologia utilizada.

Apesar do fato de não ter sido observada morte celular neste tempo de exposição, os A β O podem estar interferindo em outros processos celulares que levam à disfunção sináptica. Para verificar esta possibilidade, optou-se por analisar os níveis de sinaptofisina, a principal proteína sináptica vesicular, e os resultados mostraram uma diminuição nesse marcador sináptico (Figura 2 do artigo). Esse efeito parece ser mediado através da modulação das vias de sinalização celular das proteínas ERK1/2 e JNK (Figuras 3 e 4 do artigo), bem como da proteína β -catenina (Figura 5 do artigo). A família das MAPKs inclui a ERK1/2, p38 e JNK. Membros da família das MAPKs desempenham um papel crucial na regulação de respostas a vários estresses no desenvolvimento neuronal, resposta inflamatória e apoptose (Kim e Choi, 2010). A via de ativação da JNK pode ocorrer pela liberação de citocinas pró-inflamatórias ou em resposta a estresses celulares genotóxicos, osmóticos ou oxidativos (Shen e Liu, 2006). A ativação da JNK tem sido descrita em cultura de neurônios após exposição ao peptídeo A β , e sua inibição apresenta efeitos que diminuem a

toxicidade do A β (Bozyczko-Coyne et al., 2001; Morishima et al., 2001). Além disso, a JNK regula vários processos como o desenvolvimento cerebral, formação e reparo da memória. Ainda, a JNK está estritamente relacionada com a disfunção neuronal na DA (Mehan et al., 2011). Scip et al. (2014) mostraram que a ativação da JNK ocorre precocemente antes dos processos que levam a sinaptopatia e aos danos cognitivos em um modelo transgênico *in vivo* da DA. Aqui, mostramos que quando as culturas organotípicas foram expostas aos A β Os, a atividade da JNK se mostrou aumentada. Esses resultados sugerem que a via da JNK pode estar envolvida na perda sináptica observada nas culturas organotípicas após a adição dos A β Os. Entretanto, futuras investigações precisam ser feitas para melhor elucidação desse mecanismo.

A via da ERK, umas das mais bem caracterizadas entre as três MAPKs, tem sido apontada como uma via importante na regulação da função neuronal, uma vez que a ERK é uma proteína abundante no cérebro de adultos e sua sinalização pode desempenhar múltiplos papéis na regulação atividade-dependente da função neuronal (Zhu et al., 2003). A nível celular, ERK1/2 regula uma diversidade de funções incluindo crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular ou apoptose, sendo considerada como um fator antiapoptose (Rosen et al., 1994; Ghasemi et al., 2014). Além disso, no cérebro, fortes evidências sugerem que a ERK1/2 é um importante componente das cascatas de sinalização nos neurônios e que a modulação da sua atividade pode ser necessária tanto para plasticidade sináptica quanto para os processos de aprendizado e memória (Sweatt, 2001). Por outro lado, a atividade e expressão da β -secretase (BACE 1), a endoprotease essencial para

produção do A β , parece ser negativamente modulada pela ativação da via da ERK1/2 (Tamagno et al., 2009). Entretanto, os efeitos do peptídeo A β na atividade da ERK1/2 ainda são controversos. Alguns estudos têm mostrado uma diminuição da atividade da ERK após a exposição ao peptídeo A β (Bell et al., 2004; Townsend et al., 2007; Li et al., 2011), enquanto outros mostraram o efeito oposto (Chong et al., 2006; Ghasemi et al., 2014), o que poderia ser explicado pelos diferentes níveis de agregação, concentração, área cerebral e/ou tempo de exposição ao peptídeo A β . Em nosso estudo, observou-se que a exposição das culturas organotípicas aos A β Os por um período de 48h levou a uma diminuição da atividade da ERK1/2. Considerando o fato que, entre outras funções, a ERK desempenha um papel na regulação da expressão gênica neuronal, sua inativação pode levar à diminuição da transcrição de diversos fatores, como por exemplo, da proteína ligante ao elemento de resposta do cAMP (CREB), através da diminuição da sua fosforilação (Adams et al., 2000; Benilova et al., 2012). Desta forma, a transcrição mediada pelo CREB de genes responsáveis pela plasticidade sináptica fica alterada, implicando em danos nas funções cognitivas (Zhang et al., 2013).

Com a finalidade de tentar explicar melhor a sinaptotoxicidade observada nas culturas organotípicas após a exposição aos A β Os, foram avaliadas outras duas importantes vias de sinalização implicadas na perda sináptica: PI3K, representada pela GSK-3 β , e a Wnt/ β -catenina. GSK-3 β é uma proteína abundante no sistema nervoso central e tem se mostrado ser um componente chave nas vias de sinalização que levam à neurodegeneração (Balaraman et al., 2006). Estudos recentes revelaram que a elevação da atividade da GSK-3 β está diretamente relacionada com o aumento dos níveis

de produção e depósitos do peptídeo A β , hiperfosforilação da *tau* e danos sinápticos em pacientes com a DA e em modelos animais da mesma (Kremer et al., 2011; Darocha-Souto et al., 2012; Hurtado et al., 2012; Reddy, 2013). Além do fato de a GSK-3 β ser o principal mediador da fosforilação da *tau* (Ryder et al., 2004), ela também pode fosforilar a β -catenina, gerando um elo entre as vias da PI3K e Wnt/ β -catenina. Essa reação encaminha a β -catenina para o sistema proteassomo para degradação mediada por ubiquitinação, promovendo a degeneração neuronal observada na DA. Um distúrbio na sinalização da Wnt/ β -catenina pode ser uma ligação direta entre a toxicidade do peptídeo A β e a hiperfosforilação da *tau*, levando a uma diminuição da plasticidade sináptica e/ou degeneração neuronal (Inestrosa et al., 2012). Sendo assim, nossos resultados demonstraram que a exposição das culturas por um período de 48h à concentração de 2 μ M dos A β O_s foi capaz de diminuir significativamente o imunoconteúdo total da β -catenina no citoplasma das fatias de tecido. Entretanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis de fosforilação da β -catenina, nem da GSK-3 β . Uma razão que poderia explicar o motivo de não terem sido observadas alterações nas fosforilações da β -catenina e da GSK-3 β nas culturas organotípicas expostas aos A β O_s por 48h pode ser o fato de que essas mudanças podem ocorrer mais precocemente (6-24h de exposição), o que não foi realizado neste estudo. Embora as alterações nos níveis de fosforilação dessas proteínas possam ser transientes em nosso modelo *in vitro* de toxicidade dos A β O_s, mostraram ser suficientes para transmitir sinais que culminaram na diminuição dos níveis de sinaptofisina.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que:

- a) A cultura organotípica mantida por um longo período de maturação é um bom modelo para estudar a toxicidade e as cascatas de sinalização desencadeadas pelos A β Os.
- b) Este modelo *in vitro* de toxicidade dos A β Os foi capaz de causar uma diminuição no conteúdo sináptico nas culturas organotípicas, uma das primeiras características neuropatológicas evidenciadas na DA.
- c) O dano sináptico pôde ser observado inclusive em concentrações nanomolares dos A β Os, similares às encontradas em pacientes com a DA.
- d) Este efeito parece ser mediado pela alteração nos níveis de fosforilação das proteínas JNK e ERK, bem como no imunoconteúdo da proteína β -catenina.
- e) Embora mais estudos sejam necessários para compreender o preciso mecanismo de toxicidade dos A β Os nas culturas organotípicas, este é um bom modelo para estudar fatores bioquímicos e compostos farmacológicos com potencial para o tratamento da DA.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar o conteúdo de sinaptofisina nas fatias hipocâmpais expostas aos oligômeros do peptídeo A β (A β Os) por imunohistoquímica.
- Estudar o envolvimento da morte celular por apoptose nas culturas expostas aos A β Os através da marcação com anexina V, bem como utilizando um ensaio de caspases.
- Avaliar o efeito dos A β Os nas culturas organotípicas de hipocampo de ratos utilizando moduladores seletivos da via das MAPKs.
- Avaliar o efeito do resveratrol em uma formulação nanoencapsulada na possível prevenção da toxicidade dos A β Os nas culturas organotípicas.
- Estabelecer um modelo *in vivo* através da injeção intracerebroventricular dos A β Os, comparando as alterações morfológicas desencadeadas com o modelo *in vitro*.
- Avaliar os efeitos oxidativos e sobre o metabolismo energético mitocondrial dos A β Os em culturas organotípicas hipocâmpais e em modelo *in vivo* por infusão intracerebroventricular em ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. P.; ROBERSON, E. D.; ENGLISH, J. D.; SELCHER, J. C..SWEATT, J. D. MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 60, n. 3, p. 377-394, 2000.

BALARAMAN, Y.; LIMAYE, A.; LEVEY, A..SRINIVASAN, S. Glycogen synthase kinase 3 β and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 11, p. 1226-1235, 2006.

BATE, C..WILLIAMS, A. Amyloid- β 1-40 Inhibits Amyloid- β 1-42 Induced Activation of Cytoplasmic Phospholipase A 2 and Synapse Degeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 3, p. 985-993, 2010.

BELL, K. A.; O'RIORDAN, K. J.; SWEATT, J. D..DINELEY, K. T. MAPK recruitment by β -amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time. **Journal of neurochemistry**, v. 91, n. 2, p. 349-361, 2004.

BENILOVA, I.; KARRAN, E..DE STROOPER, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 349-57, Mar 2012.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; MENEGHETTI, A.; HOPPE, J. B.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S..SALBEGO, C. G. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 4927, 2012.

BETTENS, K.; SLEEGERS, K..VAN BROECKHOVEN, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 1, p. 92-104, 2013.

BOZYCZKO-COYNE, D.; O'KANE, T. M.; WU, Z. L.; DOBRZANSKI, P.; MURTHY, S.; VAUGHT, J. L..SCOTT, R. W. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with A β -induced cortical neuron apoptosis. **Journal of neurochemistry**, v. 77, n. 3, p. 849-863, 2001.

BRUCE, A. J.; MALFROY, B..BAUDRY, M. beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 6, p. 2312-2316, 1996.

BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 333-344, 2009.

CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R..COLÍN-BARENQUE, L. Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects? **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

CAVALLUCCI, V.; D'AMELIO, M..CECCONI, F. A β toxicity in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 366-378, 2012.

CHIANG, H.-C.; WANG, L.; XIE, Z.; YAU, A..ZHONG, Y. PI3 kinase signaling is involved in A β -induced memory loss in Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 15, p. 7060-7065, 2010.

CHONG, Y. H.; SHIN, Y. J.; LEE, E. O.; KAYED, R.; GLABE, C. G..TENNER, A. J. ERK1/2 activation mediates A β oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 20315-20325, 2006.

COLEMAN, P. D..YAO, P. J. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 8, p. 1023-1027, 2003.

DAROCHA-SOUTO, B.; COMA, M.; PEREZ-NIEVAS, B.; SCOTTON, T.; SIAO, M.; SÁNCHEZ-FERRER, P.; HASHIMOTO, T.; FAN, Z.; HUDRY, E..BARROETA, I. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 1, p. 425-437, 2012.

DE FELICE, F. G.; WU, D.; LAMBERT, M. P.; FERNANDEZ, S. J.; VELASCO, P. T.; LACOR, P. N.; BIGIO, E. H.; JERECIC, J.; ACTON, P. J..SHUGHRUE, P. J. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 9, p. 1334-1347, 2008.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; HOPPE, J. B.; MENEGHETTI, A. B.; MATTÉ, A.; BATTASTINI, A. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S..SALBEGO, C. Neuroprotective effects of resveratrol against A β administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 3, p. 1066-1080, 2013.

FROZZA, R. L.; HORN, A. P.; HOPPE, J. B.; SIMÃO, F.; GERHARDT, D.; COMIRAN, R. A..SALBEGO, C. G. A comparative study of β -amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochemical research**, v. 34, n. 2, p. 295-303, 2009.

GHASEMI, R.; ZARIFKAR, A.; RASTEGAR, K..MOOSAVI, M. Insulin Protects Against A β -Induced Spatial Memory Impairment, Hippocampal Apoptosis and MAPKs Signaling Disruption. **Neuropharmacology**, 2014.

GILBERT, B. J. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of clinical pathology**, p. jclinpath-2013-201515, 2013.

GIUFFRIDA, M. L.; TOMASELLO, F.; CARACI, F.; CHIECHIO, S.; NICOLETTI, F.; COPANI, A. Beta-amyloid monomer and insulin/IGF-1 signaling in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 46, n. 3, p. 605-613, 2012.

GLABE, C. G. Structural classification of toxic amyloid oligomers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29639-29643, 2008.

GSCHWIND, M.; HUBER, G. Apoptotic Cell Death Induced by β -Amyloid₁₋₄₂ Peptide Is Cell Type Dependent. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 1, p. 292-300, 1995.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, 1992.

HOLOPAINEN, I. E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. **Neurochemical research**, v. 30, n. 12, p. 1521-1528, 2005.

HOPPE, J. B.; CORADINI, K.; FROZZA, R. L.; OLIVEIRA, C. M.; MENEGHETTI, A. B.; BERNARDI, A.; PIRES, E. S.; BECK, R. C.; SALBEGO, C. G. Free and nanoencapsulated curcumin suppress β -amyloid-induced cognitive impairments in rats: Involvement of BDNF and Akt/GSK-3 β signaling pathway. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 134-144, 2013.

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

HOPPE, J. B.; FROZZA, R. L.; PIRES, E. N. S.; MENEGHETTI, A. B.; SALBEGO, C. The curry spice curcumin attenuates beta-amyloid-induced toxicity through beta-catenin and PI3K signaling in rat organotypic hippocampal slice culture. **Neurological research**, v. 35, n. 8, p. 857-866, 2013a.

HOPPE, J. B.; HAAG, M.; WHALLEY, B. J.; SALBEGO, C. G.; CIMAROSTI, H. Curcumin protects organotypic hippocampal slice cultures from A β ₁₋₄₂-induced synaptic toxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 8, p. 2325-2330, 2013b.

HORWOOD, J. M.; DUFOUR, F.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 3375-3384, 2006.

HURTADO, D. E.; MOLINA-PORCEL, L.; CARROLL, J. C.; MACDONALD, C.; ABOAGYE, A. K.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.-Y. Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 21, p. 7392-7402, 2012.

INESTROSA, N. C.; MONTECINOS-OLIVA, C.; FUENZALIDA, M. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 788-807, 2012.

ITTNER, L. M.; GÖTZ, J. Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 67-72, 2010.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.

KIM, D.; CHUNG, J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 106-115, 2002.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KLEIN, W. L. Synaptic targeting by A β oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 2, n. 1, p. 43-55, 2006.

KOO, E. H.; KOPAN, R. Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. 2004.

KREMER, A.; LOUIS, J. V.; JAWORSKI, T.; VAN LEUVEN, F. GSK3 and Alzheimer's disease: facts and fiction.... **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, 2011.

LACOR, P. N.; BUNIEL, M. C.; FURLOW, P. W.; CLEMENTE, A. S.; VELASCO, P. T.; WOOD, M.; VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 796-807, 2007.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 499-509, 2007.

LAMBERT, M.; BARLOW, A.; CHROMY, B.; EDWARDS, C.; FREED, R.; LIOSATOS, M.; MORGAN, T.; ROZOVSKY, I.; TROMMER, B.; VIOLA, K. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous

system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6448-6453, 1998.

LAMBERT, M. P.; VELASCO, P. T.; CHANG, L.; VIOLA, K. L.; FERNANDEZ, S.; LACOR, P. N.; KHUON, D.; GONG, Y.; BIGIO, E. H.; SHAW, P. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . **Journal of neurochemistry**, v. 100, n. 1, p. 23-35, 2007.

LAMBERT, M. P.; VIOLA, K. L.; CHROMY, B. A.; CHANG, L.; MORGAN, T. E.; YU, J.; VENTON, D. L.; KRAFFT, G. A.; FINCH, C. E.; KLEIN, W. L. Vaccination with soluble A β oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. **Journal of neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 595-605, 2001.

LARSON, M. E.; LESNÉ, S. E. Soluble A β oligomer production and toxicity. **Journal of neurochemistry**, v. 120, n. s1, p. 125-139, 2012.

LEE, J.; CULYBA, E. K.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 9, p. 602-609, 2011.

LI, S.; JIN, M.; KOEGLSPERGER, T.; SHEPARDSON, N. E.; SHANKAR, G. M.; SELKOE, D. J. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 18, p. 6627-6638, 2011.

LI, X.; BIJUR, G. N.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2002.

LUE, L.-F.; KUO, Y.-M.; ROHER, A. E.; BRACHOVA, L.; SHEN, Y.; SUE, L.; BEACH, T.; KURTH, J. H.; RYDEL, R. E.; ROGERS, J. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 3, p. 853-862, 1999.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-639, 2004.

MAZANETZ, M. P.; FISCHER, P. M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 464-479, 2007.

MCLEAN, C. A.; CHERNY, R. A.; FRASER, F. W.; FULLER, S. J.; SMITH, M. J.; VBEYREUTHER, K.; BUSH, A. I.; MASTERS, C. L. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, v. 46, n. 6, p. 860-866, 1999.

MEDINA, M..AVILA, J. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 540-547, 2014.

MEHAN, S.; MEENA, H.; SHARMA, D..SANKHLA, R. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 376-390, 2011.

MIELKE, M. M.; VEMURI, P..ROCCA, W. A. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 37, 2014.

MORISHIMA, Y.; GOTOH, Y.; ZIEG, J.; BARRETT, T.; TAKANO, H.; FLAVELL, R.; DAVIS, R. J.; SHIRASAKI, Y..GREENBERG, M. E. β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7551-7560, 2001.

MUCKE, L.; MASLIAH, E.; YU, G.-Q.; MALLORY, M.; ROCKENSTEIN, E. M.; TATSUNO, G.; HU, K.; KHOLODENKO, D.; JOHNSON-WOOD, K..MCCONLOGUE, L. High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **The Journal of neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 4050-4058, 2000.

MÜLLER, U.; WINTER, P..GRAEBER, M. B. A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 129-130, 2013.

NISTICÒ, R.; PIGNATELLI, M.; PICCININ, S.; MERCURI, N. B..COLLINGRIDGE, G. Targeting synaptic dysfunction in Alzheimer's disease therapy. **Molecular neurobiology**, v. 46, n. 3, p. 572-587, 2012.

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

O'BRIEN, R. J..WONG, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annual review of neuroscience**, v. 34, p. 185, 2011.

OGISHIMA, S.; MIZUNO, S.; KIKUCHI, M.; MIYASHITA, A.; KUWANO, R.; TANAKA, H..NAKAYA, J. A map of Alzheimer's disease-signaling pathways: a hope for drug target discovery. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 93, n. 5, p. 399-401, 2013.

OVERK, C. R..MASLIAH, E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 508-516, 2014.

PATEL, A. N..JHAMANDAS, J. H. Neuronal receptors as targets for the action of amyloid-beta protein (A β) in the brain. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 14, p. e2, 2012.

PERRIN, R. J.; FAGAN, A. M..HOLTZMAN, D. M. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 461, n. 7266, p. 916-922, 2009.

PIKE, C. J.; WALENCEWICZ, A. J.; GLABE, C. G..COTMAN, C. W. In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. **Brain research**, v. 563, n. 1, p. 311-314, 1991.

POZUETA, J.; LEFORT, R..SHELANSKI, M. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. **Neuroscience**, v. 251, p. 51-65, 2013.

PURRO, S. A.; GALLI, S..SALINAS, P. C. Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. **Journal of molecular cell biology**, p. mjt049, 2014.

QUERFURTH, H. W..LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

REDDY, P. H. Amyloid beta-induced glycogen synthase kinase 3 β phosphorylated VDAC1 in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction and neuronal damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 1913-1921, 2013.

REITZ, C..MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640-651, 2014a.

ROSEN, L. B.; GINTY, D. D.; WEBER, M. J..GREENBERG, M. E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. **Neuron**, v. 12, n. 6, p. 1207-1221, 1994.

ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacological research**, v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012.

RYDER, J.; SU, Y..NI, B. Akt/GSK3 β serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. **Cellular signalling**, v. 16, n. 2, p. 187-200, 2004.

SAKONO, M..ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. **FEBS journal**, v. 277, n. 6, p. 1348-1358, 2010.

SCLIP, A.; ANTONIOU, X.; COLOMBO, A.; CAMICI, G. G.; POZZI, L.; CARDINETTI, D.; FELIGIONI, M.; VEGLIANESE, P.; BAHLMANN, F. H..CERVO, L. c-Jun N-terminal kinase regulates soluble A β oligomers and cognitive impairment in AD mouse model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43871-43880, 2011.

SCLIP, A.; TOZZI, A.; ABAZA, A.; CARDINETTI, D.; COLOMBO, I.; CALABRESI, P.; SALMONA, M.; WELKER, E..BORSELLO, T. c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo. **Cell death & disease**, v. 5, n. 1, p. e1019, 2014.

SEBOLLELA, A.; FREITAS-CORREA, L.; OLIVEIRA, F. F.; PAULA-LIMA, A. C.; SARAIVA, L. M.; MARTINS, S. M.; MOTA, L. D.; TORRES, C.; ALVES-LEON, S..DE SOUZA, J. M. Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7436-7445, 2012.

SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 6, n. 4, p. 487-498, 1991.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789-791, 2002.

SHANKAR, G. M.; LI, S.; MEHTA, T. H.; GARCIA-MUNOZ, A.; SHEPARDSON, N. E.; SMITH, I.; BRETT, F. M.; FARRELL, M. A.; ROWAN, M. J..LEMERE, C. A. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature medicine**, v. 14, n. 8, p. 837-842, 2008.

SHEN, H.; LIU, Z. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and mitogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 928-939, 2006.

SILVA, T.; REIS, J.; TEIXEIRA, J..BORGES, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing research reviews**, v. 15, p. 116-145, 2014.

SIMÃO, F.; MATTÉ, A.; PAGNUSSAT, A. S.; NETTO, C. A..SALBEGO, C. G. Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3 β and CREB through PI3-K/Akt pathways. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 7, p. 2899-2905, 2012.

SIMÕES PIRES, E. N.; FROZZA, R. L.; HOPPE, J. B.; MENEZES, B. D. M..SALBEGO, C. G. Berberine was neuroprotective against an *in vitro* model of brain ischemia: Survival and apoptosis pathways involved. **Brain research**, v. 1557, p. 26-33, 2014.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 1, p. 1-10, 2001.

TAMAGNO, E.; GUGLIELMOTTO, M.; GILIBERTO, L.; VITALI, A.; BORGHI, R.; AUTELLI, R.; DANNI, O..TABATON, M. JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 10, p. 1563-1573, 2009.

TOWNSEND, M.; MEHTA, T..SELKOE, D. J. Soluble A β inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 46, p. 33305-33312, 2007.

VAN DER FLIER, W. M.; PIJNENBURG, Y. A.; FOX, N. C..SCHELTENS, P. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing ϵ 4 allele. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 3, p. 280-288, 2011.

VARGAS, J. Y.; FUENZALIDA, M..INESTROSA, N. C. In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2191-2202, 2014.

VERGHESE, P. B.; CASTELLANO, J. M..HOLTZMAN, D. M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 3, p. 241-252, 2011.

WANG, J.-Z.; XIA, Y.-Y.; GRUNDKE-IQBAL, I..IQBAL, K. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, p. S123-S139, 2013.

WORTZEL, I..SEGER, R. The ERK cascade distinct functions within various subcellular organelles. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 195-209, 2011.

ZHANG, H.; MA, Q.; ZHANG, Y. W..XU, H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. **Journal of neurochemistry**, v. 120, n. s1, p. 9-21, 2012.

ZHANG, L.; XIE, J. W.; YANG, J..CAO, Y. P. Tyrosine phosphatase STEP61 negatively regulates amyloid β -mediated ERK/CREB signaling pathways via α 7 nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 12, p. 1581-1590, 2013.

ZHANG, Y.-W.; THOMPSON, R.; ZHANG, H..XU, H. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular brain**, v. 4, n. 1, p. 3, 2011.

ZHOU, Z.-D.; CHAN, C. H.-S.; MA, Q.-H.; XU, X.-H.; XIAO, Z.-C..TAN, E.-K. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to

pathogenesis and therapy of Alzheimer disease (AD). **Cell adhesion & migration**, v. 5, n. 4, p. 280, 2011.

ZHU, X.; LEE, H.-G.; RAINA, A. K.; PERRY, G..SMITH, M. A. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. **Neurosignals**, v. 11, n. 5, p. 270-281, 2003.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Mecanismo de formação dos emaranhados neurofibrilares.....	12
Figura 2. Processamento proteolítico da APP.....	14
Figura 3. Esquema de interconversão entre as diferentes espécies naturais e sintéticas do peptídeo A β	17
Figura 4. Mecanismos de toxicidade de oligômeros extracelulares.....	18
Figura 5. Mecanismos moleculares de sinaptotoxicidade do peptídeo A β	20

8. ANEXOS

7.1. Carta de aprovação da CEUA

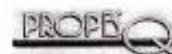


U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23521

Título: Investigação do efeito neuroprotetor de nanocápsulas contendo resveratrol sobre um modelo in vitro de toxicidade induzida por oligômeros do peptídeo β -amilóide

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO - coordenador desde 01/08/2012
BRUNA DE MELO MENEZES - pesquisador desde 01/08/2012
Juliana Bender Hoppe - Aluno de Doutorado desde 01/08/2012
Leon de Moraes Lisboa - Aluno de Mestrado desde 01/08/2012
André Bevilacqua Meneghetti - Aluno de Mestrado desde 01/08/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 42 ratos, Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 13 de Novembro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

7.2. Normas do periódico *Neurobiology of aging*, no qual o artigo científico será submetido.



Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Negative results

Negative results will be published as one journal page (3 double-spaced typed manuscript pages), with supplementary material to be posted at the journal website. The 3 double-spaced pages should include a brief abstract, a brief introduction, a few sentences of methods, core data and discussion of the data. If room allows, an abbreviated reference list with the most critical references should also be included in these 3 double-spaced pages.

Supplementary material for the website should include a more detailed introduction, more details of the methods, the complete reference list and any additional data. The supplementary material should be sufficient to convince the interested reader of the validity and reliability of the results. It should be made clear which material is for printing in the journal and which is supplementary material for the website. Since the net effect of a Negative Result is to discourage repetition, the standards for acceptance as a Negative Result will be highly demanding (see Announcement "Negative results can be valuable", *Neurobiol. Aging* 25(10):iii;2004).

Length of paper

The Editors insist upon clear, concise statements of facts and conclusions. Regular manuscripts should be no longer than 10 printed journal pages (30 double-spaced pages, including references, figures and tables) and should include only the most essential figures and tables. Brief Communications should be restricted to eight double-spaced pages (including references, figures and tables) and should not present more than one figure and one table, or two figures, or two tables. Fragmentation of material into numerous short reports is discouraged.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract, not to exceed 170 words, should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular

screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system.

Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use

fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

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

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

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

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).