

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que leva a uma perda progressiva e irreversível das funções cognitivas. Sua patogênese envolve a cascata amilóide, via pela qual a proteína precursora amilóide (APP), ao ser alvo da beta-secretase (BACE1), inicia um processo de clivagem proteolítica através do qual é produzido o peptídeo beta-amilóide. Ao sofrer processo de agregação, este peptídeo na forma oligomérica ou fibrilada, passa a exercer efeitos neurotóxicos importantes. Os mecanismos que regulariam a cascata amilóide ainda não foram completamente elucidados, porém dados sugerem que a organização lipídica das membranas, e a dinâmica de seus microdomínios poderiam modular a cascata. O início do processamento amiloidogênico da APP por BACE1 estaria condicionado a uma colocalização destas proteínas em microdomínios de membrana (*rafts*), ambiente no qual a enzima BACE1 teria maior atividade. Bioquimicamente caracterizados por seu enriquecimento em colesterol e esfingolipídios, os *rafts* funcionam como plataformas lipídicas especializadas, capazes de compartimentalizar eventos celulares ao nível de membrana, bem como regular a atividade das mais diversas enzimas. Os métodos classicamente empregados para a extração e purificação de *rafts* utilizam detergentes não iônicos (Triton X-100), que a baixas temperaturas, solubilizariam seletivamente os domínios não-*rafts* das membranas, permitindo o posterior isolamento dos microdomínios *rafts* por meio de gradiente de densidade. A crítica que se faz a esta metodologia é a possibilidade de que proteínas, originalmente não associadas aos *rafts*, poderiam ser recuperadas nestes microdomínios, como efeito artefato da utilização do detergente, gerando assim, falsas interpretações. Os objetivos deste trabalho foram: 1) padronizar e comparar duas técnicas de extração e purificação de *rafts* (com e sem o uso de detergente); 2) avaliar a distribuição das proteínas APP e BACE1 nos diferentes microdomínios. Para isso, foram utilizados córtex cerebrais de ratos Wistar machos de 6 meses de idade. Amostras de 100mg de tecido foram homogeneizadas em tampão de lise com ou sem detergente Triton X-100 (1%), a temperatura de 4°C. Os homogeneizados foram submetidos a um gradiente descontínuo de sacarose, sob centrifugação refrigerada a 200.000xg por 18h. Quatorze frações foram coletadas a partir do topo do gradiente. Em cada fração foram determinados os conteúdos de colesterol (kit fluorimétrico) e de GM1 (dosagem por *dotblot*). Também foram analisadas as distribuições das proteínas flotilina-1, clatrina, APP e BACE1 em cada fração (*western-blot*). A técnica com emprego de detergente resultou em melhor extração e purificação dos microdomínios *rafts*, uma vez que permitiu o isolamento de frações mais enriquecidas em colesterol, com maior concentração de GM1 e com melhor distribuição das proteínas marcadoras de *raft* (flotilina) e de não-*raft* (clatrina). Além disso, ambos os processos extrativos permitiram identificar uma parcela das proteínas amiloidogênicas APP e BACE1 nas frações correspondentes aos microdomínios *rafts* de membrana, indicando que estas localizações não são artefatos do uso de Triton X-100. A metodologia, aqui padronizada, representa uma importante ferramenta para a identificação de drogas capazes de modular a distribuição das proteínas amiloidogênicas nos *rafts* lipídicos, e desta forma, afetar cascata amilóide, e possivelmente a progressão da doença de Alzheimer. (PIBIC/CNPq-UFRGS, PROBIC/FAPERGS-UFRGS, CNPq).