

CARLOS EDUARDO BENEVENTO

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR PEPTÍDEOS
BETA-AMILÓIDE**

CAMPINAS

2011

CARLOS EDUARDO BENEVENTO

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR PEPTÍDEOS
BETA-AMILÓIDE**

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica. Área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

CAMPINAS

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

B435d Benevento, Carlos Eduardo
Disfunção mitocondrial induzida por peptídeos beta-amilóide
/ Carlos Eduardo Benevento. Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Roger Frigério Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Mitocôndria. 3. Amilóide.
4. Consumo de oxigênio. I. Castilho, Roger Frigério . II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Título em inglês : Mitochondrial dysfunction induced by beta-amyloid peptides

Keywords: • Alzheimer's disease
• Mitochondria
• Amyloid
• Oxygen consumption

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

**Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento**

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Roger Frigério Castilho
Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura**

Data da defesa: 26-01-2011

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Carlos Eduardo Benevento

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Roger Frigerio Castilho

| Membros: |
|---|
| Prof(a). Dr(a). Roger Frigerio Castilho -  |
| Prof(a). Dr(a). Rodrigo Ramos Catharino-  |
| Prof(a). Dr(a). Sérgio Akira Uyemura-  |

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/01/2011

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioenergética e de Metabolismo Energético em Neurodegeneração, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, UNICAMP) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Obesidade e Diabetes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pela singular orientação, discussões científicas, valiosos aprendizados e contribuição para o meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pelas discussões pertinentes à literatura.

Aos professores membros da pré-banca e banca Dr. Li Li Min, Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto, Dra. Wanda Pereira Almeida, Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dr. Rodrigo Ramos Catharino pelas revisões e sugestões.

Aos meus pais, Zenaide e Francisco, por proporcionarem condições para que eu pudesse estudar e que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando minhas escolhas.

À minha irmã Cláudia pela cumplicidade, amizade, amor e respeito.

Aos meus sobrinhos por me proporcionarem momentos de alegria e pelo amor e carinho.

À minha Vó Jorgina (*In Memoriam*) pelo amor incondicional, carinho, compreensão e respeito.

À Pâmella Faby, Priscila Lira Men, Tatiane Tanaka, Wellyngton Panerari Ramos, Ricardo Sandri, Álida Buzzo e Jeferson Malgarin pela sinceridade de uma amizade, onde vimos que a distância não é suficiente para separar os amigos.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética pela convivência durante estes anos. Agradeço especialmente ao que se tornaram indispensáveis e amigos: Thiago, Juliana, Felipe, Franco, Vinícius, Rute, Bruno, Luciane, Mariana, Ana Catarina e Karina. Agradeço em especial à Daniela Melo e Paolo La Guardia que se tornaram meus irmãos do coração.

Aos técnicos Roberto, Edilene, Elisângela, Carol e Guilherme pela paciência e pelo ensinamento das técnicas de isolamento de mitocôndrias e cuidados com os animais.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento desta dissertação.

À Deus, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito,
não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser,
mas graças a Deus não somos o que éramos.”*

Martin Luther King

| | |
|---|-------|
| RESUMO | xvi |
| ABSTRACT | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1. Função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo | 22 |
| 1.2. Transporte mitocondrial de Ca^{2+} e transição de permeabilidade mitocondrial | 24 |
| 1.3. Mitocôndria e morte celular | 26 |
| 1.4. Doença de Alzheimer | 27 |
| 1.5. Epidemiologia e sintomatologia da doença de Alzheimer | 28 |
| 1.6. Aspectos genéticos da doença de Alzheimer | 29 |
| 1.7. Peptídeos beta-amilóide ($\text{A}\beta$) e neurodegeneração | 30 |
| 1.8. Peptídeos $\text{A}\beta$ e mitocôndrias | 32 |
| 1.9. Tratamento na doença de Alzheimer | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 2.1. Objetivo Geral | 36 |
| 2.2. Objetivos específicos | 36 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1. Reagentes | 38 |
| 3.2. Preparação dos filmes peptídicos | 38 |
| 3.3. Preparação das soluções do peptídeo $\text{A}\beta$ | 39 |
| 3.4. Incubação das mitocôndrias com o peptídeo $\text{A}\beta$ | 40 |
| 3.5. Animais de experimentação | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6. Isolamento das frações mitocondriais (fração contendo mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais)..... | 40 |
| 3.7. Isolamento de frações enriquecidas de mitocôndrias sinaptossomais ou não-sinaptossomais..... | 41 |
| 3.8. Determinação de proteína..... | 42 |
| 3.9. Medida do consumo de oxigênio | 43 |
| 3.10. ADP/O | 43 |
| 3.11. Captação de Cálcio | 44 |
| 3.12. Espécies reativas de oxigênio..... | 44 |
| 3.13. Ultrafiltração | 44 |
| 3.14. SDS-PAGE..... | 45 |
| 3.15. Medidas de fluidez de membrana | 45 |
| 3.16. Análise estatística | 46 |
| 4. RESULTADOS..... | 47 |
| 5. DISCUSSÃO | 65 |
| 6. CONCLUSÕES | 72 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |
| 8. ANEXOS | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| Aβ | Beta-amilóide |
| ADP | Adenosina 5'-difosfato |
| apo E | Apolipoproteína E |
| ATP | Adenosina 5'-trifosfato |
| BM | Mitocôndria de cérebro de rato |
| BSA | Albumina de soro bovina |
| CaG-5N | Calcium Green-5N |
| Cu,Zn-SOD | Enzima superóxido dismutase dependente de cobre e zinco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPH | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno |
| $\Delta\psi$ | Potencial elétrico de membrana mitocondrial |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético |
| EGTA | Etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FADH₂ | Flavina adenina dinucleotídeo reduzido |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanossulfônico |
| HFIP | 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol |
| HRP | Peroxidase de raiz forte |
| K₂HPO₄ | Fosfato de potássio dibásico |
| KCl | Cloreto de potássio |
| MgCl₂ | Cloreto de magnésio |
| MnSOD | Enzima superóxido dismutase dependente de manganês |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido |
| NMDA | Receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato |
| O₂^{•-} | Radical ânion superóxido |

| | |
|------------------------|--|
| OH[·] | Radical hidroxila |
| PPA | Proteína precursora amilóide |
| PES 1 e 2 | Presenilinas 1 e 2 |
| <i>r</i> | Anisotropia |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOD | Enzima superóxido dismutase |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina |
| TPM | Transição de permeabilidade mitocondrial |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| UQ | Coenzima Q |
| UQH[·] | Semiquinona |
| UQH₂ | Coenzima Q reduzida |

LISTA DE TABELAS

| | PÁG. |
|---|-------------|
| TABELA I - Avaliação do efeito da solução utilizada nos experimentos com 24 μ M de A β 40 monomérico ou de A β 42 oligomérico..... | 52 |
| TABELA II - Avaliação do efeito da solução utilizada nos experimentos com 24 μ M de A β 42 fibrilar. | 52 |

| | PÁG. |
|--|-------------|
| FIGURA 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 17% dos peptídeos A β | 49 |
| FIGURA 2 – Efeito dos peptídeos A β na respiração mitocondrial..... | 51 |
| FIGURA 3 – Efeito do peptídeo A β 40 na razão ADP/O. | 53 |
| FIGURA 4 – Estímulo do estado 4 pelo peptídeo A β 40 em mitocôndrias não-sinaptossomais. | 55 |
| FIGURA 5 – Efeito do peptídeo A β 40 em mitocôndrias não-sinaptossomais e sinaptossomais. | 57 |
| FIGURA 6 – Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias tratadas com os peptídeos A β 40 e A β 42..... | 58 |
| FIGURA 7 – Efeitos do peptídeo A β 40 na respiração mitocondrial após ultrafiltração do meio. | 60 |
| FIGURA 8 – Peptídeo A β 40 não altera a captação de Ca ²⁺ por mitocôndrias isoladas. | 62 |
| FIGURA 9 – Alteração da fluidez de membrana induzida pelo peptídeo A β 40..... | 64 |

Resumo

É proposto que a neurodegeneração que ocorre na doença de Alzheimer seja decorrente do acúmulo intra e extracelular de peptídeos beta-amilóide (A β), num processo que envolve comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial. O objetivo do presente trabalho foi investigar e comparar os efeitos das formas agregada (oligomérica e fibrilar) de A β 42 e da forma não agregada (monomérica) de A β 40 na função mitocondrial. Mostrou-se, em eletroforese em gel de poliacrilamida, que o protocolo de preparo das formas agregadas e não-agregada dos peptídeos estava de acordo com o perfil de agregação descrito na literatura. Estimou-se o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos, na presença ou ausência de peptídeos A β , utilizando como substratos malato e glutamato. Não houve efeito significativo de 12 μ M dos peptídeos A β na respiração mitocondrial em estado de repouso (estado 4) ou durante a fosforilação oxidativa (estado 3), porém observou-se um estímulo do estado 4 quando os peptídeos foram utilizados na concentração de 24 μ M. O estímulo mais significativo na respiração mitocondrial em estado 4 foi observado com o A β 40 (39%), quando comparado aos estímulos observados na presença das formas oligomérica (31%) e fibrilar (29%) de A β 42. O maior efeito de A β 40 pode ser devido a sua característica hidrofóbica, permitindo sua maior interação na membrana mitocondrial. A partir destes resultados, avaliou-se o efeito de A β 40 (24 μ M) na razão ADP/O, sendo observada uma redução de 11% neste parâmetro. Ao se comparar o efeito de A β 40 (24 μ M) em mitocôndrias cerebrais sinápticas e não-sinápticas, observou-se que as organelas sinápticas foram mais suscetíveis ao peptídeo, apresentando um estímulo do estado 4 de 38%, enquanto que as não-sinápticas apresentaram um estímulo de apenas 15%. Quando o meio de reação contendo A β 40 foi ultrafiltrado (corte > 3 kDa) o estímulo da respiração mitocondrial foi abolido. Observou-se uma redução de 71% na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no estado 4 da respiração na presença de A β 40 (24 μ M) e quando o peptídeo A β 42 oligomérico foi testado a redução foi de 29%. A redução observada na produção de EROs pode ser explicada pelo desacoplamento parcial da respiração mitocondrial provocada pelos peptídeos A β . Não houve diferença na capacidade de retenção de Ca²⁺ por mitocôndrias na presença de peptídeos A β . Por fim, verificou-se que o peptídeo A β 40 leva a uma diminuição da fluidez das membranas mitocondriais. Conclui-se que peptídeos A β podem ser diretamente tóxicos a mitocôndrias neuronais, o que pode ter um papel na fisiopatologia da doença de Alzheimer.

Abstract

Neurodegeneration in Alzheimer's disease involves intra- and extracellular accumulation of beta-amyloid peptides (A β) in a process leading to impairment of mitochondrial oxidative metabolism. The aim of the present study was to investigate and compare the effects of the aggregated forms of A β 42 (oligomers and fibrils) and the unaggregated form of A β 40 (monomers) on mitochondrial function. Polyacrylamide gel electrophoresis was run as a control and showed that our preparation protocols generated aggregated and unaggregated forms of the peptides in agreement with the patterns reported in the literature. Oxygen consumption by isolated rat brain mitochondria was measured in the presence or absence of A β peptides, using malate and glutamate as substrates. A β peptides at 12 μ M did not have a significant effect on respiratory state 4 (resting respiration) or state 3 (ADP-stimulated respiration). However, a higher state 4 respiration was observed when the peptides were used at a concentration of 24 μ M. The most significant increase in mitochondrial state 4 respiration was observed with A β 40 (39%) followed by A β 42 oligomers (31%) and fibrils (29%). The bigger effect found with A β 40 may be due to its hydrophobicity, which enables greater interaction with the inner mitochondrial membrane. We then evaluated the effect of A β 40 (24 μ M) on the ADP/O ratio and found an 11% reduction in this parameter. Comparing the effect of A β 40 (24 μ M) on synaptic and non-synaptic mitochondria, we observed that the former were more susceptible to A β 40, with an increase in the state 4 respiration of 38%, while the latter showed only a 15% increase. After ultrafiltration (3 kDa cutoff) of the reaction medium containing A β 40, no effect on mitochondrial respiration was observed. We found 71% and 29% inhibition of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production in state 4 in the presence of the A β 40 monomer and A β 42 oligomer at 24 μ M, respectively. The inhibition of ROS production may be explained by the partial mitochondrial respiratory uncoupling caused by the A β peptides. These peptides were not observed to have any effect on mitochondrial Ca²⁺ uptake or retention. Lastly, our results indicated that A β 40 leads to a decrease in mitochondrial membrane fluidity. We conclude that A β peptides may be directly toxic to neuronal mitochondria, this may play an important role in the pathophysiology of Alzheimer's disease.

1. Introdução

Doenças neurodegenerativas fazem parte de um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por uma perda seletiva e gradual de sistemas neuronais, de ordem anatômica e/ou funcional, por exemplo, as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

Com os avanços recentes da genética molecular, alguns genes relacionados a doenças neurodegenerativas foram localizados e caracterizados em detalhe (Bertoli-Avella et al., 2004; Bossy-Wetzel et al., 2004; Bettens et al., 2010; Wollmer, 2010). Essa identificação molecular consiste na avaliação da estrutura de componentes do DNA. As alterações nesta molécula podem ser de diferentes extensões como a perda de grandes porções do DNA, a simples troca de um de seus componentes ou outros rearranjos mais complexos. Em decorrência de uma mutação, um gene pode deixar de exercer a sua função ou adquirir funções distintas da original, levando ao aparecimento de doenças (Bertoli-Avella et al., 2004; Bossy-Wetzel et al., 2004). O uso de ferramentas moleculares, que permite a identificação pré e pós-sintomática dessas doenças, tem gerado perspectivas de novas possibilidades terapêuticas.

São diversos os fatores passíveis de causar lesões neurológicas. Destacam-se, entre elas, além de doenças hereditárias e neurodegenerativas, o traumatismo encéfalo craniano, infecções, doenças vasculares e isquemia cerebral. Em geral, as lesões no sistema nervoso central (SNC) são permanentes e causam deterioração irreversível do tecido nervoso (Lipton, 1999). A disfunção mitocondrial pode participar nesse processo através da participação em vias que podem levar à morte celular por apoptose ou necrose (Kroemer et al., 2007; Tait e Green, 2010).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela respiração celular e síntese de ATP. Participam também da homeostase intracelular de cálcio, síntese de esteróides, geração de radicais livres e morte celular. Recentemente tem sido demonstrado sua interação com algumas proteínas específicas relacionadas a doenças genéticas e neurodegenerativas (Lin e Beal,

2006; Tillement et al., 2010).

Há vários estudos que comprovam a participação de alterações do metabolismo energético e da mitocôndria na morte celular e que a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) possui um papel regulatório sobre a viabilidade celular (Lin e Beal, 2006; Vercesi et al., 2006; Kroemer et al., 2007; Tait e Green, 2010). Diante disto, o foco desta dissertação foi verificar alterações mitocondriais relacionadas a mecanismos fisiopatológicos da doença de Alzheimer.

1.1. Função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo

Em organismos aeróbicos, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos converge em uma etapa final que envolve a doação dos elétrons removidos desses nutrientes para o oxigênio molecular. Esse processo ocorre na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) mitocondrial, gerando água e liberando energia. A energia liberada é convertida primeiramente na forma de um gradiente transmembrana de prótons e, posteriormente, utilizada para a síntese de ATP via fosforilação oxidativa mitocondrial (Mitchell, 1966).

Os elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH₂, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (complexo I) e coenzima Q, respectivamente. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). A UQH₂ é, então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o complexo III. A seguir o citocromo c será reduzido e irá transferir elétrons à citocromo c oxidase (complexo IV). Este

complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Devlin, 2003).

O ATP formado durante este processo é essencial para a manutenção de atividades celulares dependentes de energia, como a contração muscular, formação de impulsos nervosos, transporte iônico e síntese de macromoléculas. Deste modo, não é surpreendente que falhas do metabolismo energético mitocondrial estejam associadas à disfunção e morte celular por causas diversas incluindo infarto cardíaco, acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas (Vercesi et al., 2006; Kowaltowski et al., 2009).

O sistema de transporte de elétrons mitocondrial é uma importante fonte de EROs, sendo a produção mitocondrial de EROs um processo contínuo e fisiológico. Dependendo do tecido, condição respiratória e substratos utilizados, 0,02 a 2% do total do consumo mitocondrial de oxigênio (O_2) resulta na geração de radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) *in vitro* (Boveris, 1977; St-Pierre et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009; Murphy, 2009). Este processo é devido à redução monoelétrica de O_2 sobretudo nos complexos I e III da cadeia respiratória. Estes complexos respiratórios estão localizados na membrana mitocondrial interna e a produção de $O_2^{\cdot-}$ ocorre no lado matricial no complexo I e nos espaços matricial e intermembrana no complexo respiratório III (Turrens, 2003; Murphy, 2009). Outros trabalhos também mostram que desidrogenases solúveis presentes na matriz mitocondrial, como as pirúvica e α -cetoglutárica, podem ser importantes fontes de produção de $O_2^{\cdot-}$ (Starkov et al., 2004; Tretter e Adam-Vizi 2004).

O radical livre $O_2^{\cdot-}$ apresenta reatividade química moderada em solução aquosa, e pode sofrer diversas reações na mitocôndria, gerando outros produtos da redução parcial do O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). Superóxido dismutases (SODs), presentes na matriz mitocondrial (Mn-SOD) (Weisiger e Fridovich, 1973; Fridovich, 1995) e no espaço intermembranas (Cu,Zn-SOD) (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001),

catalizam a geração de H_2O_2 a partir da dismutação de $O_2^{\cdot-}$. O H_2O_2 é uma espécie química permeável por membranas e mais estável, podendo ser removida por diferentes enzimas com atividade peroxidásica, como a catalase, glutathiona peroxidase e peroxiredoxina (Kowaltowski et al., 2009). Alternativamente, H_2O_2 pode gerar HO^{\cdot} , uma ERO altamente oxidativa e citotóxica. A maior parte do HO^{\cdot} gerado *in vivo* provavelmente provém da reação de H_2O_2 com ferro ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$) (Halliwell e Gutteridge, 1992).

EROs geradas pela mitocôndria podem oxidar macromoléculas tanto destas organelas como de outras estruturas intracelulares. De fato, oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e dano oxidativo de DNA por EROs geradas pela mitocôndria já foram mostrados em diversos estudos (Bindoli, 1988; Castilho et al., 1995; Richter et al., 1995; Lenaz, 1998; Cadenas e Davies, 2000).

1.2. Transporte mitocondrial de Ca^{2+} e transição de permeabilidade mitocondrial

Há diversas evidências que alterações na homeostase mitocondrial de Ca^{2+} estão relacionadas com estresse oxidativo celular e podem ser causas da morte celular em diversas doenças neurodegenerativas (Nicholls e Budd 2000; Vercesi et al., 2006). A mitocôndria capta íons Ca^{2+} utilizando o potencial elétrico protônico transmembrana ($\Delta\Psi$) como força de transporte e através da atividade de um canal específico da membrana interna, acumulando grandes quantidades deste cátion (Gunter et al., 1998). A captação mitocondrial de Ca^{2+} ocorre sobretudo mediada pelo fluxo deste íon por um canal da membrana interna sensível ao vermelho de rutênio (Gunter et al., 1998; Kirichok et al., 2004; Perocchi et al., 2010). O efluxo de Ca^{2+} da matriz mitocondrial ocorre através de trocadores Ca^{2+}/Na^+ e Ca^{2+}/H^+ (Gunter et al., 2004).

A captação mitocondrial de Ca^{2+} foi descrita há aproximadamente 50 anos (Chance,

1965; Rizzuto et al., 1992; Carafoli, 2003), mas por muito tempo acreditou-se que mitocôndrias não captariam Ca^{2+} em condições fisiológicas, já que a afinidade do canal é significativamente mais alta que a concentração do Ca^{2+} intracelular em situação de repouso (Gunter et al., 1998). Entretanto, mostrou-se que, de fato, mitocôndrias têm um importante papel na homeostase de Ca^{2+} intracelular em condições fisiológicas, e captam Ca^{2+} principalmente pela existência de micro-compartimentos, com altas concentrações deste íon, localizados próximos a estas organelas (Rizzuto et al., 1993). Em condições de maior demanda energética, a captação mitocondrial de Ca^{2+} está associada à ativação das enzimas intramitocondriais desidrogenases pirúvica, isocítrica e α -cetoglutárica (Hansford, 1991). A mitocôndria também age como um estoque intracelular com grande capacidade para Ca^{2+} em condições patológicas (Gunter et al., 1998; Nicholls e Budd, 2000). No entanto, um grande acúmulo mitocondrial de Ca^{2+} pode levar a uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (Kowaltowski et al., 2001), um fenômeno que pode levar à morte celular por necrose ou apoptose.

A TPM é uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida por estresse oxidativo e acúmulo excessivo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, num processo que pode ser estimulado ou inibido por uma variedade de compostos ou condições (Zoratti e Szabo, 1995; Lemasters et al., 1998; Crompton, 1999; Kowaltowski et al., 2001; Gunter et al., 2004; Vercesi et al., 2006; Saito e Castilho, 2010). Na TPM, a permeabilização da membrana mitocondrial interna resulta em perda de componentes da matriz mitocondrial, comprometimento da função mitocondrial e inchamento mitocondrial, com consequente ruptura da membrana mitocondrial externa e liberação de proteínas do espaço intermembranas (Zoratti e Szabo, 1995; Lemasters et al., 1998; Crompton, 1999; Kowaltowski et al., 2001; Green e Kroemer, 2004). Como resultado, a TPM pode participar ativamente de eventos que iniciam a morte celular por necrose ou apoptose.

As alterações de membrana que levam a TPM ainda não estão totalmente esclarecidas. A TPM claramente envolve proteínas da membrana mitocondrial interna, provavelmente um grupo de proteínas da membrana mitocondrial interna que se agregaria em consequência de alterações estruturais (Kowaltowski et al., 2001; He e Lemasters, 2002; Ronchi, Castilho e Vercesi, resultados não publicados).

Uma grande variedade de antioxidantes protege contra a TPM causada por condições distintas, sugerindo que este processo é o resultado de estresse oxidativo mitocondrial levando a oxidação de tióis (Fagian et al., 1990; Valle et al., 1993; Castilho et al., 1995; Kowaltowski et al., 1998; Kowaltowski et al., 2009). Íons Ca^{2+} podem ainda modular diretamente a abertura do poro de TPM, como indicado por experimentos mostrando que o Ca^{2+} é necessário para a TPM mesmo após a oxidação de tióis (Kowaltowski e Castilho, 1997; Kowaltowski et al., 1997).

1.3. Mitocôndria e morte celular

A apoptose mediada pela mitocôndria é iniciada quando proteínas participantes deste processo, por exemplo citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF), são liberadas da organela para o citosol (Tait e Green, 2010). Como proteínas pró-apoptóticas mitocondriais estão localizadas no espaço intermembranas, a liberação destas proteínas geralmente envolve somente a permeabilização da membrana mitocondrial externa, uma situação que tem a vantagem de manter a integridade da membrana interna e, conseqüentemente, da fosforilação oxidativa (Crompton, 1999). A permeabilização da membrana mitocondrial externa geralmente é um processo promovido por proteínas pró-apoptóticas da família do Bcl-2, incluindo o Bax, Bid e Bad (Kelekar e Thompson, 1998; Lovell et al., 2008).

A mitocôndria também pode liberar fatores pró-apoptóticos para o citosol após lesão da membrana mitocondrial interna ou indução da TPM, como resultado do inchamento da matriz com rompimento da membrana externa (Kroemer et al., 1998; Lemasters et al., 1998;

Crompton, 1999). Esta forma de apoptose pode ocorrer quando há uma lesão ou estresse celular que de alguma forma induz a TPM, e geralmente aparece associada com morte celular por necrose. Nestas condições, o fator determinante entre a morte celular por apoptose ou necrose será a disponibilidade de concentrações fisiológicas de ATP no meio intracelular (Leist et al., 1997; Crompton, 1999; Tait e Green, 2010).

A via mitocondrial, ou via intrínseca de apoptose, pode agir independentemente da via extrínseca, que é mediada pela ativação de receptores de morte celular da membrana plasmática. Alternativamente, a via mitocondrial de apoptose pode participar amplificando passos da via extrínseca (Wajant, 2002).

1.4. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada por perda progressiva de memória e diminuição de múltiplas funções cognitivas, num processo associado com a perda de neurônios, de sinapses e função sináptica, com respostas inflamatórias e anormalidades mitocondriais (Reddy e Beal, 2008). Os defeitos mais consistentes nos componentes mitocondriais, na doença de Alzheimer, são deficiências em várias enzimas chaves do metabolismo oxidativo, incluindo os complexos α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase e a citocromo c oxidase (Wang et al., 2007; Reddy e Beal, 2008; Tillement et al., 2010).

Na doença de Alzheimer ocorre o metabolismo anormal da proteína precursora de amilóide (PPA) e níveis elevados de peptídeos beta-amilóide ($A\beta$), fatores chaves na neuropatologia desta doença, cujas maiores características patológicas são as placas extracelulares contendo peptídeos $A\beta$ e os emaranhados neurofibrilares intracelulares (Atamna e Frey, 2007; Reddy e Beal, 2008). O acúmulo intraneural de peptídeos $A\beta$ também ocorre e é um evento precoce na progressão da doença de Alzheimer, podendo preceder a formação de

depósitos extracelulares de peptídeos A β (LaFerla et al., 2007). Em adição, tem sido demonstrado que os níveis de peptídeos A β intraneural diminuem com o acúmulo de placas extracelulares (LaFerla et al., 2007).

1.5. Epidemiologia e sintomatologia da doença de Alzheimer

De acordo com o relatório publicado em 2009 pela *Alzheimer's Disease International* 35,6 milhões de pessoas apresentam quadro de demência, sendo que 60 a 80% desses casos correspondem a doença de Alzheimer. A incidência da doença de Alzheimer aumenta com a idade, dobrando a cada intervalo de 5-10 anos. Para pessoas com idades entre 65 e 69, 70 e 74, 75 e 79, 80 e 84 e 85 anos ou mais idosos a incidência da doença de Alzheimer tem sido estimada em 0,6%, 1,0%, 2,0%, 3,3% e 8,4% respectivamente (Hebert et al., 1995). A prevalência também cresce exponencialmente com a idade, aumentando de 3% entre as pessoas com 65 e 74 anos para quase 50% entre os idosos com 85 anos ou mais. Segundo o *National Institute of Health* (NIH)¹, 5,1 milhões de pessoas com mais de 65 anos são afetadas pela doença de Alzheimer nos Estados Unidos da América. A partir dos dados do Censo norte-americano de 2000 foi estimado que 4,5 milhões de pessoas tinham a doença de Alzheimer e que este número aumentaria para 13,2 milhões de pessoas em 2050 (Hebert et al., 2003). Herrera et al. (1998) em estudo realizado em uma cidade do interior do estado de São Paulo, Brasil, encontrou uma prevalência de demência de 7,1% em pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, sendo que 54% dos casos de demência foram diagnosticados como doença de Alzheimer. Além da idade, existem outros fatores de risco como, histórico familiar de demência, traumatismo craniano, fatores genéticos, gênero feminino, baixo nível educacional, doenças vasculares e fatores ambientais. A partir do diagnóstico da doença de Alzheimer a

¹<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/ADProgress2008/rapid/epidemiology.htm>

sobrevida média atual dos pacientes é de 3 a 4 anos se a pessoa tem idade superior a 80 anos quando feito o diagnóstico, podendo chegar a mais de 10 anos se a pessoa for mais jovem².

1.6. Aspectos genéticos da doença de Alzheimer

Uma proporção substancial de indivíduos com doença de Alzheimer apresenta evidências significativas de componentes genéticos. Parentes de primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer têm uma maior incidência para a doença do que a população em geral e 15 a 35% dos pacientes com doença de Alzheimer têm parentes de primeiro grau afetados (Breitner e Folstein, 1984). Até 25 % dos casos de doença de Alzheimer podem estar relacionados com disfunções genéticas já conhecidas³.

Estudos genéticos da forma familiar da doença de Alzheimer são uma importante fonte de informação sobre a hipótese amilóide. Mutações na PPA, presenilinas 1 e 2 (PES1 e PES2) correspondem por todos os casos da forma familiar da doença, enquanto o alelo $\epsilon 4$ no gene da apolipoproteína E (apo E) aumenta o risco de se ter a doença. Até o momento, aproximadamente 180 mutações na forma familiar da doença de Alzheimer foram identificadas na PES1, 20 mutações para a PES2 e 36 para a PPA⁴. A maioria das mutações na PPA e nas presenilinas parece estar associada com o aumento na produção do peptídeo A β . As mutações na PPA são localizadas dentro ou próximas ao sítio de clivagem do peptídeo A β gerando um aumento na sua produção, embora algumas mutações foram identificadas no meio do peptídeo A β e podem ser responsáveis pelo aumento na fibrilização. Mutações na PS1 e PS2 são distribuídas por toda a molécula. A questão se estas mutações representam um ganho de toxicidade ou uma perda da função da PPA e das presenilinas ainda não está solucionada.

A maioria dos casos de doença de Alzheimer familiar de início precoce está associada

²<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/AlzheimersInformation/GeneralInfo/>

³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301340>

⁴<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>

com mutações em 2 genes, PES1 e PES2, localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Estas presenilinas fazem parte do complexo da γ -secretase, necessária para a síntese dos peptídeos A β . Mutações nesses sítios eventualmente alteram o processamento da PPA o favorecendo um aumento da produção e deposição do peptídeo A β (Selkoe, 1997).

Um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer é ser portador do alelo ϵ 4 da apo E, situado no cromossomo 19 (Sherrington et al., 1995). O mecanismo pelo qual a apo E influencia na patogênese da doença de Alzheimer ainda permanece desconhecido, mas pode estar relacionado com um menor *clearance* dos peptídeos A β formados. De fato, a apo E, possivelmente pelo sequestro através de ligações protéicas, elimina a neurotoxicidade do peptídeo A β em culturas de células de hipocampo (Whitson et al., 1994). De forma interessante, o estresse oxidativo também seria importante na ação da apo E, porque a formação de complexos apo E/A β está aumentada em tampões oxigenados e completamente abolida sob condições redutores (Strittmatter et al., 1993).

1.7. Peptídeos beta-amilóide (A β) e neurodegeneração

O peptídeo A β é produzido em qualquer local onde a proteína precursora de amilóide (PPA) e β - e γ -secretases estejam presentes. A maior parte do peptídeo A β produzido é de uma cadeia de 40 resíduos (A β 40), enquanto uma pequena proporção (aproximadamente 10%) é de uma variante de 42 resíduos (A β 42), sendo esta mais propensa a formação fibrilar do que A β 40 (Hardy e Selkoe, 2002; Reddy e Beal, 2008; Querfurth e LaFerla, 2010). Um desbalanço entre a produção e a eliminação do peptídeo A β causa seu acúmulo, que é indicado como um importante fator para o início da doença de Alzheimer (Hardy e Selkoe 2002; Querfurth e LaFerla, 2010). Notadamente, oligômeros solúveis têm se mostrado como as formas mais tóxicas do peptídeo A β (Ferreira et al., 2007).

A PPA é uma proteína transmembrana tipo I que se localiza principalmente na membrana plasmática, mas também pode ser encontrada no complexo de Golgi, retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e nas membranas mitocondriais (Reinhard et al., 2005; LaFerla et al., 2007).

A PPA exerce papel importante como molécula receptora de superfície e de adesão entre células e entre o neurônio e a matriz cerebral; na regulação do processo neuronal, da divisão de células-tronco neuronais, da homeostase de cálcio e de metais e da sobrevivência celular. Aparentemente a PPA não tem função essencial durante a embriogênese, sendo que sua função é mais importante na fase adulta, por exemplo, nos casos de reparação cerebral após estresse traumático (Reinhard et al., 2005; Zheng e Koo, 2006).

A clivagem e o processamento da proteína precursora amilóide (PPA) podem ser divididos em uma via não-amiloidogênica e em uma via amiloidogênica. Pela via não-amiloidogênica a PPA é clivada pela α -secretase produzindo um fragmento denominado sAPP α que é secretado para o meio extracelular. O fragmento da PPA retido na membrana plasmática é posteriormente clivado pela γ -secretase, produzindo um pequeno fragmento denominado p3. De uma forma muito importante, a clivagem pela α -secretase ocorre dentro da região A β , prevenindo a formação do peptídeo A β (LaFerla et al., 2007).

A via amiloidogênica é uma via alternativa de clivagem, onde a PPA é submetida a proteólises sequenciais pela β - e γ -secretase, resultando no fragmento A β que é tóxico e se acumula no espaço extracelular e em compartimentos celulares prejudicando funções celulares (Reddy e Beal, 2008). O acúmulo de peptídeos A β está associado à disfunção mitocondrial e sináptica e hiperfosforilação do *tau*.

1.8. Peptídeos A β e mitocôndrias

Apesar da maior parte dos estudos focarem no efeito tóxico do acúmulo extracelular do peptídeo A β , resultado da clivagem de PPA localizada na membrana plasmática ou da secreção celular deste peptídeo, o acúmulo intracelular de peptídeos A β é possível (Gouras et al., 2000; LaFerla et al., 2007; Querfurth e LaFerla, 2010). Sítios intracelulares de produção de peptídeos A β também são descritos, incluindo no aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e corpos multivesiculares (Busciglio et al., 1993; Cook et al., 1997; Hartmann et al., 1997; Wild-Bode et al., 1997). Os endossomos são provavelmente um sítio importante de geração de peptídeos A β (Kinoshita et al., 2003). Foi demonstrado que bloqueando a internalização de PPA, tanto pela remoção do seu domínio citoplasmático ou pela retirada de potássio do meio, levou a uma redução significativa dos níveis de peptídeos A β , indicando que a endocitose de PPA é uma importante via de geração destes peptídeos (Koo e Squazzo, 1994).

O peptídeo A β danifica diretamente as membranas das organelas intracelulares, incluindo a membrana interna da mitocôndria. Como a cadeia respiratória está acoplada a esta membrana, sua consequente disfunção estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocasiona uma perda de potencial de membrana, e compromete a viabilidade neuronal como um resultado da depleção energética (Moreira et al., 2002; Aleardi et al., 2005; Caspersen et al., 2005). A mudança na estrutura da membrana mitocondrial afetaria sua permeabilidade ocasionando aumento da liberação do citocromo *c* e, conseqüentemente, a ativação da apoptose (Moreira et al., 2002; Wang et al., 2007; Reddy e Beal, 2008). Além disso, peptídeos A β ocasionam diminuição da respiração mitocondrial (estado 3 e 4), redução na atividade de enzimas mitocondriais (α -cetoglutarato desidrogenase e aconitase), além de alterar a atividade da piruvato desidrogenase (Wang et al., 2007).

A atuação direta do peptídeo A β na disfunção mitocondrial ainda não está totalmente estabelecida, sendo necessários experimentos nessa área que possam elucidar os mecanismos

pelos quais a A β interfere na respiração mitocondrial, nas enzimas da cadeia respiratória, na formação do poro de transição de permeabilidade e na capacidade de captação e acúmulo de Ca²⁺.

1.9. Tratamento na doença de Alzheimer

O tratamento da doença de Alzheimer envolve estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. No campo do tratamento farmacológico, inúmeras substâncias psicoativas têm sido propostas para preservar ou restabelecer a cognição, o comportamento e as habilidades funcionais do paciente com demência. Contudo, os efeitos das drogas hoje aprovadas para o tratamento da doença de Alzheimer limitam-se ao retardo da evolução natural da doença, permitindo apenas uma melhora temporária do estado funcional do paciente.

Entre as abordagens farmacológicas, o órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou dois tratamentos para os sintomas cognitivos da doença de Alzheimer: inibidores de colinesterases (donepezil, rivastigmina e galantamina) e a memantina.

O uso dos inibidores de colinesterases baseia-se no pressuposto déficit colinérgico que ocorre na doença, e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil e a butirilcolinesterase. Tem efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando também certas alterações não-cognitivas da demência.

O uso da memantina reside nos seus efeitos sobre a neurotransmissão glutamatérgica que, assim como a colinérgica, encontra-se alterada nessa doença. As regiões corticais e subcorticais que contêm neurônios e receptores glutamatérgico sofrem perdas estruturais e funcionais na evolução da doença de Alzheimer (Li et al., 1997; Rogawski e Wenk, 2003). A

memantina é um antagonista não-competitivo de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), permitindo sua ativação fisiológica durante os processos de formação da memória, porém bloqueando a abertura dos canais e sua ativação patológica (Parsons et al., 1993).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

É proposto que a neurodegeneração na doença de Alzheimer seja decorrente do acúmulo e da agregação do peptídeo A β . Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar a disfunção mitocondrial causada diretamente pelo peptídeo A β .

2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar as formas de agregação do peptídeo A β por SDS-PAGE.
- b) Estudar o efeito das formas monomérica, oligomérica e fibrilar do peptídeo A β na respiração de repouso e durante a fosforilação oxidativa em uma suspensão de mitocôndrias isoladas de cérebro.
- c) Caracterizar o efeito das formas monomérica, oligomérica e fibrilar do peptídeo A β na geração de H₂O₂ por mitocôndrias de cérebro.
- d) Avaliar o efeito *in vitro* do peptídeo A β na captação e retenção de Ca²⁺ por mitocôndrias isoladas de cérebro.
- e) Identificar alterações na fluidez de membrana em mitocôndrias isoladas tratadas *in vitro* com o peptídeo A β .

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes – A maioria dos produtos químicos, incluindo 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, >99%), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2'-etanosulfônico (HEPES), ácido glutâmico, ácido málico, adenosina difosfato (ADP), albumina de soro bovino (BSA), bis-acrilamida, digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO; D2650), dodecil sulfato de sódio (SDS), etileno glicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), Laemmli buffer, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), oligomicina, Percoll[®], peroxidase de raiz forte (HRP) e persulfato de amônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os peptídeos beta-amilóide (Aβ40 e Aβ42) foram adquiridos da American Peptide (Sunnyvale, CA, USA). Peptídeos dos seguintes lotes foram utilizados: T11123T1, W12022T1, X03076C1, X03076C1, X08023C1, Y03011T1 e Y03022C1 para Aβ40; e T03080X1, U10152X1, W11057T1, W09017X1, X04032T1, X06062C1 e X12021C1 para Aβ42. Amplex Red, Calcium Green-5N e Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cloreto de magnésio (MgCl₂) e cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da ECIBRA (Santo Amaro, São Paulo, Brasil). Fosfato de potássio dibásico triidratado (K₂HPO₄ × 3H₂O) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O meio de cultura Ham's F-12 (sem fenol e sem glutamina) foi obtido da Vitrocell (Campinas, São Paulo, Brasil), manitol da Casa da Química (Diadema, São Paulo, Brasil) e sacarose da Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil). Os outros reagentes utilizados nos experimentos desta dissertação foram de alto grau de pureza.

3.2. Preparação dos filmes peptídicos – Os peptídeos liofilizados foram estocados a -20°C e antes da solubilização destes, cada frasco contendo 1 mg foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir os peptídeos Aβ40 e Aβ42 foram dissolvidos em 231 µL e 222 µL de HFIP para se obter soluções 1 mM dos peptídeos. O HFIP foi adicionado utilizando-se uma

seringa Hamilton GASTIGHT (1001LTN) de 1 mL com êmbolo de teflon. Os frascos foram mantidos fechados em temperatura ambiente por 60 minutos. Logo após este período, os frascos foram colocados em banho de gelo por 5-10 minutos e depois esta solução foi aliquotada em 6 tubos de microcentrifuga utilizando uma seringa Hamilton GASTIGHT (1705N) de 50 μ L com êmbolo de teflon. Os tubos foram mantidos por 90 minutos em uma capela para permitir a evaporação do HFIP. Os filmes peptídicos resultantes foram centrifugados a vácuo por 10 minutos em temperatura ambiente utilizando uma centrífuga Eppendorf Vacufuge Concentrator, modelo 5301 (1400 rpm fixos; vácuo 20 mbar) e estocados a -80°C por até 60 dias (Parks et al., 2001; Klein, 2002; Stine et al., 2003).

3.3. Preparação das soluções do peptídeo A β – Os filmes dos peptídeos A β 40 e A β 42 foram ressuspensos para uma concentração de 6 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) com auxílio de uma pipeta monocal de volume variável Eppendorf Research e posteriormente foram mantidos em um banho sonicador (Microsonic SX-20) por 10 minutos. O peptídeo A β 42 oligomérico foi preparado diluindo sua solução 6 mM em DMSO para uma solução final de 1 mM em meio de cultura (Ham's F-12 sem fenol e sem glutamina) sendo imediatamente homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada a 4°C por 24 horas. A forma fibrilar do peptídeo A β 42 foi obtida pela diluição da solução 6 mM em DMSO para uma solução 1 mM em ácido clorídrico (HCl) 10 mM, sendo imediatamente homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada a 37°C por 24 horas. Para a condição monomérica, o peptídeo A β 40 6 mM em DMSO foi diluído para 1 mM em meio de cultura (Ham's F-12 sem fenol e sem glutamina), homogeneizado por 30 segundos em vórtex e utilizado em até 4 horas (Parks et al., 2001; Klein, 2002; Stine et al., 2003). Soluções controles, sem os peptídeos A β , foram preparadas em paralelo, seguindo todos os passos descritos acima.

3.4. Incubação das mitocôndrias com o peptídeo A β – Para avaliar o efeito do peptídeo A β na respiração mitocondrial, captação de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio e na fluidez de membrana, mitocôndrias foram incubadas com o peptídeo A β em diferentes concentrações (12 ou 24 μ M) a 30°C. Para cada experimento, soluções controles também foram utilizadas.

3.5. Animais de experimentação – Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), FCM/UNICAMP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (protocolo nº 1536-1 de 19 de maio de 2008). Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos, pesando entre 250 a 300 g, obtidos no biotério central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica). Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em sala climatizada a 22 \pm 2°C, com ciclo de 12 horas claro e escuro, com livre acesso a água e ração Nuvilab CR-1 irradiada da Nuvital (Dois Vizinhos, Paraná, Brasil).

3.6. Isolamento das frações mitocondriais (fração contendo mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais) – Cérebros de dois animais foram rapidamente removidos (1 minuto), sendo que o cerebelo e o tronco encefálico foram descartados. Para o isolamento de uma fração contendo uma mistura de mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais de cérebro, utilizamos o método de centrifugação diferencial descrito por Rosenthal et al. (1987) com algumas modificações. O tecido cerebral foi removido e colocado num recipiente com 10 mL de meio de isolamento contendo manitol 220 mM, sacarose 75 mM, EGTA-K⁺ 1 mM, BSA 0,1% e HEPES-K⁺ 5 mM (pH 7,4). Os cérebros foram cortados em pequenos pedaços e extensivamente lavados. Estes fragmentos foram homogeneizados manualmente em homogeneizadores tipo Dounce por aproximadamente 6 vezes com pistilo frouxo e 8 vezes com o pistilo apertado para provocar lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea. A

suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 2.000 x g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a 12.000 x g. O sedimento resultante foi ressuspensão em 20 mL do mesmo meio de isolamento com adição de 40 µL de digitonina 10% e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante e o *pellet* mais externo e superior (parte clara) foram descartados e apenas o *pellet* central (escuro) foi ressuspensão em meio contendo manitol 220 mM, sacarose 75 mM, HEPES-K⁺ 5 mM e BSA 0,1% (pH 7,4) e novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O sedimento foi ressuspensão e mantido em banho de gelo.

3.7. Isolamento de frações enriquecidas de mitocôndrias sinaptossomais ou não-sinaptossomais – Cérebros de dois animais foram rapidamente removidos (1 minuto), sendo que o cerebelo e o tronco encefálico foram descartados. Para o isolamento de frações enriquecidas de mitocôndrias sinaptossomais ou não-sinaptossomais, utilizamos o método de centrifugação diferencial descrito por Sims (1990) com algumas modificações. O tecido cerebral foi removido e colocado num recipiente com 10 mL de meio de isolamento I (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EDTA-K⁺ 1 mM e HEPES-K⁺ 10 mM; pH 7,4). Os cérebros foram cortados em pequenos pedaços e extensivamente lavados. Estes fragmentos foram homogeneizados manualmente em homogeneizadores tipo Dounce por aproximadamente 6 vezes com pistilo frouxo e 8 vezes com o pistilo apertado para provocar lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 1.300 x g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. O sobrenadante foi separado (S1) e o *pellet* foi ressuspensão e centrifugado novamente como descrito na etapa anterior. Após essa centrifugação, o sobrenadante obtido (S2) foi adicionado ao S1 e centrifugado por 10 minutos a 20.000 x g. O sedimento resultante foi ressuspensão em aproximadamente 16 mL do gradiente de Percoll 15% e distribuído em 6 tubos

com gradientes descontínuos de Percoll, 23 e 40% (pH 7,2). Os gradientes de Percoll foram preparados em meio I. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 30.000 x *g*, com aceleração e desaceleração lentas. Três bandas de material foram formadas sobre os gradientes de Percoll, sendo que a banda sobre o gradiente de Percoll 23% (Fração 2) corresponde a fração enriquecida de sinaptossomas e a fração formada sobre o gradiente de Percoll 40% (Fração 3) é enriquecida de mitocôndrias não-sinaptossomais. Para a obtenção de mitocôndrias não-sinaptossomais, a Fração 3 é separada, diluída em meio de isolamento I e centrifugada por 10 minutos a 17.000 x *g*. O sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuspense em BSA 1% e meio de isolamento II (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EDTA-K⁺ 200 µM e HEPES-K⁺ 10 mM; pH 7,4) e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x *g*. O sedimento obtido foi ressuspense em meio de isolamento 3 (manitol 225 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K⁺ 10 mM; pH 7,4) e mantido em banho de gelo. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C.

Para experimentos comparativos entre mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais, as Frações 2 e 3 descritas acima, obtidas após a centrifugação do gradiente de Percoll, foram separadas e tratadas com digitonina 0,01% para promover a permeabilização dos sinaptossomas. Foram adicionados 10 µL de digitonina 10% aos *pellets* ressuspensos em BSA 1% e meio de isolamento II (10 mL), que foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 x *g*. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em meio de isolamento II e novamente centrifugados por 10 minutos a 10.000 x *g*. Os sedimentos enriquecidos de mitocôndrias sinaptossomais ou não-sinaptossomais foram ressuspensos em meio 3 e mantidos em banho de gelo.

3.8. Determinação de proteína – As concentrações de proteína das suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949) na presença de colato 0,2%.

O método é baseado na reação de sulfato de cobre em meio alcalino (reativo de biureto) com proteínas e peptídeos, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, quantificado a 540 nm em espectrofotômetro. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.9. Medida do consumo de oxigênio – O consumo de O₂ por suspensões de mitocôndrias isoladas de cérebro foi monitorado polarograficamente utilizando-se um eletrodo tipo Clark marca Hansatech com o uso do software Oxygraph Plus V 1.01 (Hansatech Instruments Ltd England). Considerou-se que a solubilidade do O₂ em água é de 235 μmol × L⁻¹, a 30°C e 1 atm (Reynafarje et al., 1985). As suspensões foram adicionadas ao meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K⁺ 20 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM e EGTA 200 μM (pH 7,2) e mantidas em câmara fechada (0,75 mL), termostaticada a 30°C, sob agitação constante, na presença ou ausência dos peptídeos Aβ. A qualidade das mitocôndrias foi avaliada pela determinação do controle respiratório (CR), calculado pela razão entre as velocidades de consumo de O₂ nos estados de fosforilação oxidativa (estado 3) e repouso (estado 4). A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para o uso quando esta razão foi superior a 5,0 utilizando malato 5 mM e glutamato 5 mM como substratos.

3.10. ADP/O – A razão ADP/O indica o número de moléculas de ADP fosforiladas para ATP quando dois elétrons são transferidos de um substrato através da cadeia respiratória para a redução de um oxigênio ($\frac{1}{2}$ O₂). Esse valor foi calculado a partir da adição de 300 μM de ADP em suspensões mitocondriais (0,5 mg/mL) em meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K⁺ 20 mM, K₂HPO₄ 2 mM e EGTA 200 μM (pH 7,2) e mantidas em câmara fechada (0,75 mL), termostaticada a 30°C, sob agitação constante, na presença ou ausência dos peptídeos Aβ.

3.11. Captação de Cálcio – A concentração de Ca^{2+} extramitocondrial foi monitorada utilizando-se o sal de hexapotássio Calcium Green-5N (CaG-5N). Mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram suspensas em meio de reação (KCl 130 mM, HEPES- K^+ 20 mM, K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 4 mM; pH 7,2) contendo EGTA 15 μM , malato 5 mM e glutamato 5 mM, ADP 50 μM , oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$ e CaG-5N 0,2 μM , na presença ou ausência dos peptídeos A β . A fluorescência foi continuamente monitorada a 30°C usando um espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301_{PC}) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 506 e 532 nm, respectivamente, com largura das fendas de 5 nm (Murphy et al., 1996).

3.12. Espécies reativas de oxigênio – A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada fluorimetricamente através da conversão de Amplex Red[®] 10 μM na presença de peroxidase de raiz forte (HRP) 1 U/mL, a um composto altamente fluorescente, resorufina (Zhou et al., 1997). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301_{PC} usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente, com largura das fendas de 5 nm. Sob estas condições, um aumento linear na fluorescência indica um aumento da taxa de produção do H_2O_2 pelas mitocôndrias. Uma curva de calibração foi feita através da adição de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

3.13. Ultrafiltração – Soluções controle e dos peptídeos A β foram adicionados ao meio de reação (KCl 130 mM, HEPES- K^+ 20 mM, K_2HPO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM e EGTA 200 μM ; pH 7,2) contendo malato e glutamato 5 mM e aliqüotadas em 2 Filtros Amicon[®] Ultra - 0,5 mL 3K Ultracel[®] (Millipore, Carrigtwohill, Co. cork, Ireland. Lot# R9EN02788), que foram centrifugados por 20 minutos a 14.000 x g (Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415 R - rotor de ângulo fixo; 45°). Para a recuperação do material retido, os filtros foram invertidos e centrifugados por 2

minutos a 1.000 x g. Ao volume obtido após a centrifugação foi adicionado meio de reação, malato 5 mM e glutamato 5 mM.

3.14. SDS-PAGE – Quantidades iguais dos peptídeos A β 40 monomérico, A β 42 oligomérico e A β 42 fibrilar (7 μ g), após incubações por até 24 horas, foram homogeneizadas em tampão Laemmli 2x concentrado contendo 2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50% de glicerol e 0,005% de azul de bromofenol, em uma razão de amostra/tampão de 1:1. Os peptídeos foram caracterizados eletroforeticamente em SDS-PAGE 17%, em tampão contendo 0,25 M de Tris (pH 8,3), 1,92 M de glicina e 1% de SDS. Utilizou-se como padrão de peso molecular o PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671 (Fermentas, Lot# 00049756). Os géis foram submetidos a uma amperagem constante (20 mA) durante 2,5 a 3,5 horas utilizando uma fonte BIO-RAD Power Pac 200. A eficácia da caracterização por eletroforese foi verificada através da coloração por prata, utilizando o kit Pierce® Silver Stain (Thermo Scientific, Lot # LA140640A), de acordo com as instruções do fabricante.

3.15. Medidas de fluidez de membrana – Mudanças na fluidez de membranas mitocondriais de cérebro de rato foram avaliadas por mudanças na anisotropia fluorescente (r) de marcador ligado a mitocôndria. Foi utilizado como sonda o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) que monitora a fluidez de fases altamente hidrofóbicas (Kawato et al., 1977). DPH 5 μ M foi adicionado em suspensões de mitocôndrias 0,5 mg/mL sob agitação em meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K⁺ 20 mM, K₂HPO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM e EGTA 200 μ M (pH 7,2) e a mistura foi incubada por 40 minutos a 30°C antes de se medir a fluorescência polarizada. A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301_{PC} usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 460 nm, respectivamente, com largura das fendas de 5 nm. Os valores de anisotropia foram obtidos pelas medidas de I_{vv} e I_{vh} , isto é,

as intensidades do plano horizontal e perpendicular ao plano vertical da polarização da fonte de excitação, respectivamente.

A Anisotropia (r) foi definida pela equação:

$$r = (I_{vV} - GI_{vh}) / (I_{vV} + 2GI_{vh})$$

Onde G é igual a I_{vh}/I_{hh} e é o fator de correção de artefatos instrumentais.

Quanto maior a anisotropia observada, menor é a fluidez de membrana.

3.16. Análise estatística – As análises estatísticas foram determinadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (San Diego, USA). Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores \pm erro padrão da média (média \pm e.p.m.), submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste t de Student quando apenas um parâmetro foi comparado entre dois grupos. Todas as figuras apresentadas nos resultados são representativas de pelo menos três experimentos independentes.

4. Resultados

Primeiramente, para verificar se o protocolo de preparação e agregação dos peptídeos A β estava funcionando de acordo com o reportado na literatura (Parks et al., 2001; Klein, 2002; Stine et al., 2003), realizamos avaliações em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Aplicamos no gel de poliacrilamida 7 μ g de cada forma do peptídeo A β para que pudessemos observar as formas agregadas do peptídeo A β 42 e a forma não-agregada do peptídeo A β 40. Os resultados da **Figura 1** mostram a forma monomérica do peptídeo A β 40 como uma banda abaixo do marcador de peso molecular de 10 kDa, o que está de acordo com o peso molecular deste peptídeo que é de 4.329 Da. Em relação ao peptídeo A β 42, conseguimos visualizar a presença de tetrâmeros correspondentes a forma oligomérica (cabeça de seta), quando este foi preparado em meio de cultura Ham's F-12 (sem fenol e sem glutamina) e incubado por 24 horas a 4°C. As setas menores indicam a forma fibrilar do peptídeo A β 42, obtida quando este foi preparado em HCl 10 mM e incubado por 24 horas a 37°C. Observa-se ainda a presença da forma monomérica do peptídeo A β 42 juntamente com as formas oligomérica ou fibrilar. Estes resultados demonstram que o protocolo de preparo das formas agregadas e não-agregadas dos peptídeos está de acordo com perfil de agregação reportado na literatura (Mason et al., 1999; Dahlgren et al., 2002; Stine et al., 2003; Sanz-Blasco et al., 2008). A seguir, iniciamos a avaliação do efeito das diferentes formas de agregação dos peptídeos A β em mitocôndrias isoladas.

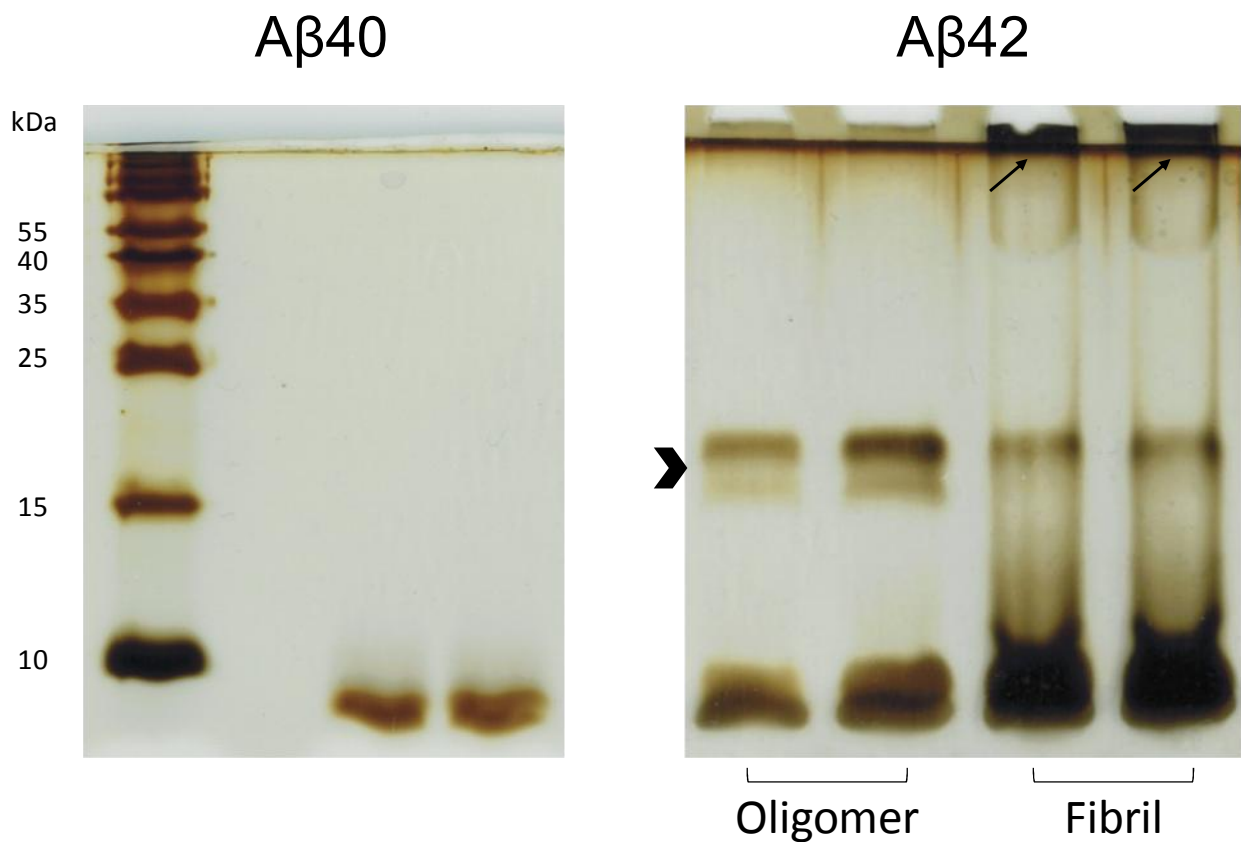


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 17% dos peptídeos A β . Perfil dos peptídeos A β 40 e A β 42 após um período de 0 e 24 horas de incubação, respectivamente. Para a condição “Oligomer” o peptídeo A β 42 foi incubado em meio de cultura Ham’s F-12 (sem fenol e sem glutamina), enquanto para a condição “Fibril” o peptídeo A β 42 foi mantido em HCl 10 mM. A cabeça de seta indica as bandas referentes a forma oligomérica (tetrâmeros) e as setas pequenas indicam os agregados da forma fibrilar do peptídeo A β 42. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Os resultados mostrados na **Figura 2** são referentes ao estudo do efeito de diferentes formas de agregação de peptídeos A β , nas concentrações de 12 e 24 μ M, no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato na presença de substratos para o complexo I da cadeia respiratória. O consumo de oxigênio mitocondrial foi acompanhado no estado respiratório 3 (Chance e Williams, 1955), isto é, durante a fosforilação de ADP, quando ocorre um estímulo da respiração mitocondrial e na presença de oligomicina (estado 4), um inibidor da fosforilação oxidativa.

A velocidade de consumo de oxigênio durante o estado respiratório 3, utilizando malato e glutamato como substratos respiratórios, não apresentou redução significativa na presença dos peptídeos A β nas concentrações de 12 e 24 μ M. No entanto, os peptídeos A β apresentaram efeito estimulatório na respiração no estado 4, sendo o peptídeo A β 42 fibrilar responsável por um estímulo de 29,2%, o A β 42 oligomérico de 31,0% e o A β 40 pelo maior estímulo, de 39,3%. Este estímulo do consumo de oxigênio no estado respiratório 4 se refletiu em redução do controle respiratório. O traçado representativo da respiração (**Painel D**) mostra o estímulo do estado respiratório 4 na presença de 24 μ M do peptídeo A β 40.

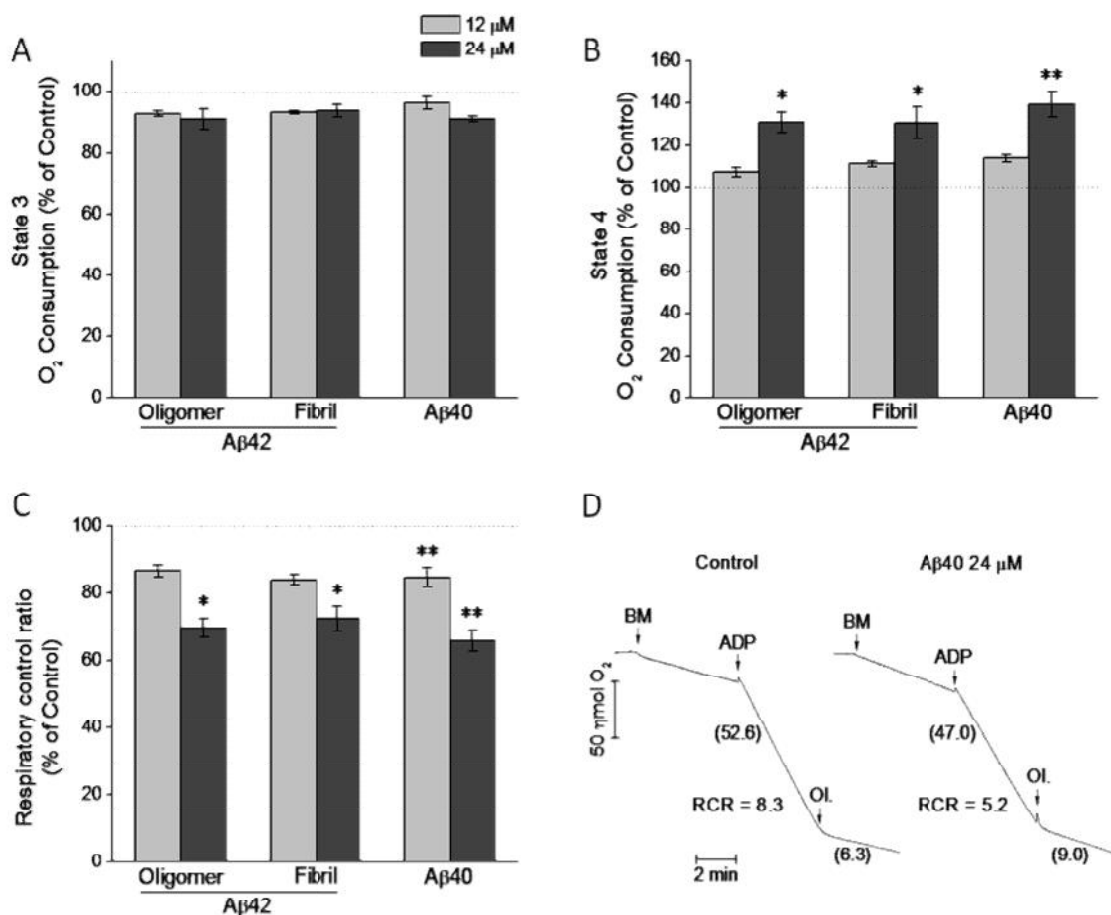


Figura 2 – Efeito dos peptídeos Aβ na respiração mitocondrial. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM na presença ou ausência de concentrações variadas dos peptídeos Aβ (12 ou 24 μM). ADP 800 μM e oligomicina 1 μg/mL foram adicionados posteriormente para se estimar o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, respectivamente. **Painéis A e B:** Efeito dos peptídeos Aβ nas concentrações de 12 e 24 μM no consumo de oxigênio durante o estado 3 (A) e estado 4 (B) da respiração. **Painel C:** Efeito dos peptídeos Aβ nas concentrações de 12 e 24 μM no controle respiratório (estado 3/estado 4). **Painel D:** Traçados representativos dos experimentos controle e na presença do peptídeo Aβ40 monomérico 24 μM. Dados dos **Painéis A, B e C** representam a média ± e.p.m. de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,05$. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$. BM = mitocôndria de cérebro de rato; Ol. = oligomicina; RCR = controle respiratório.

Os dados mostrados nas **Tabelas I e II** são referentes a experimentos onde avaliamos o efeito das soluções controles dos peptídeos A β na respiração mitocondrial. Verifica-se que estas soluções controles não alteraram significativamente as velocidades de respiração nos estados 3 e 4.

Tabela I

Avaliação do efeito da solução utilizada nos experimentos com 24 μ M de A β 40 monomérico ou de A β 42 oligomérico.

| | Estado 3 (η mol O ₂ /mg/min) | Estado 4 (η mol O ₂ /mg/min) | CR (estado 3/estado 4) |
|------------------|---|---|---------------------------------------|
| Sem adições | 49,49 \pm 2,48 (100,0 \pm 5,0%) | 6,04 \pm 0,18 (100,0 \pm 2,9%) | 8,19 \pm 0,31 (100,0 \pm 3,8%) |
| Solução controle | 49,68 \pm 2,74 (100,4 \pm 2,4%) | 5,88 \pm 0,19 (97,4 \pm 1,2%) | 8,43 \pm 0,33 (102,9 \pm 3,1%) |

Tabela II

Avaliação do efeito da solução utilizada nos experimentos com 24 μ M de A β 42 fibrilar.

| | Estado 3 (η mol O ₂ /mg/min) | Estado 4 (η mol O ₂ /mg/min) | CR (estado 3/estado 4) |
|------------------|---|---|---------------------------------------|
| Sem adições | 49,04 \pm 3,07 (100,0 \pm 6,3%) | 6,74 \pm 0,63 (100,0 \pm 9,4%) | 7,46 \pm 0,62 (100,0 \pm 8,3%) |
| Solução controle | 46,21 \pm 3,08 (92,2 \pm 2,2%) | 6,27 \pm 0,46 (93,1 \pm 4,6%) | 7,44 \pm 0,46 (99,7 \pm 3,1%) |

Considerando que a forma monomérica do peptídeo A β 40 foi a que induziu alterações mais marcantes na respiração mitocondrial (**Figura 2**), os próximos estudos utilizaram principalmente este peptídeo. Para avaliar o efeito deste peptídeo na eficiência da fosforilação de ADP para ATP, estimamos a razão ADP/O. Foram conduzidos experimentos a 30°C sob agitação magnética constante, em meio de reação (750 μ L) contendo substratos respiratórios e na ausência ou presença do peptídeo A β 40 24 μ M (**Figura 3**). A fosforilação do ADP foi iniciada pela adição de ADP 300 μ M após 5 minutos de pré-incubação da suspensão mitocondrial (0,5 mg/mL) na presença de solução controle ou de peptídeo A β 40.

A razão ADP/O em suspensões mitocondriais na condição controle e na presença do peptídeo A β 40 24 μ M foi de $2,18 \pm 0,08$ e $1,94 \pm 0,06$, respectivamente. Esta diferença indica uma perda da eficiência da fosforilação oxidativa de 11%.

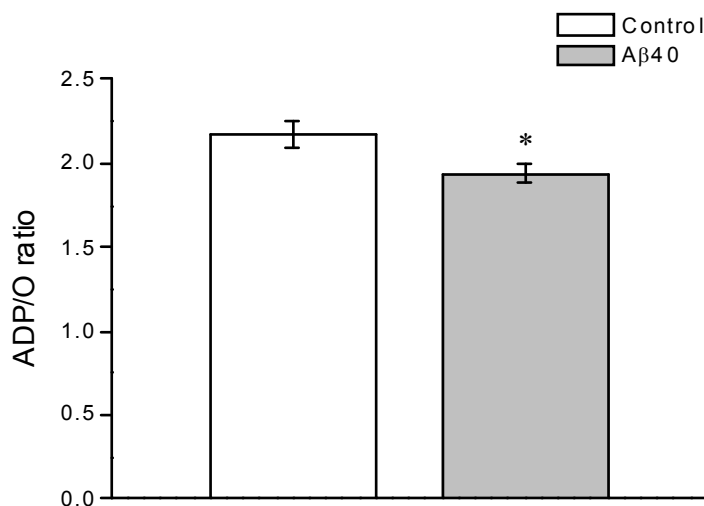


Figura 3 – Efeito do peptídeo A β 40 na razão ADP/O. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C, em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM na presença ou ausência do peptídeo A β 40 (24 μ M). ADP 300 μ M foi adicionado após 5 minutos de pré-incubação para iniciar a fosforilação oxidativa. Dados representam a média \pm e.p.m. de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,05$.

Com o objetivo de verificar o efeito do peptídeo A β 40 em mitocôndrias cerebrais purificadas, sem o uso do detergente digitonina no isolamento, estudamos o efeito deste peptídeo em experimentos de consumo de oxigênio com mitocôndrias não-sinaptossomais (**Figura 4**). Essa fração mitocondrial quando incubada com a solução controle apresentou valores absolutos de consumo de oxigênio de $51,90 \pm 1,47$ e $8,81 \pm 0,35$ $\eta\text{mol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente para os estados 3 e 4 da respiração; e controle respiratório de $5,91 \pm 0,11$. Na presença do peptídeo A β 40, na concentração 24 μM , os valores foram de $49,01 \pm 1,34$ e $10,02 \pm 0,37$ $\eta\text{mol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente para os estados 3 e 4 da respiração, enquanto o valor do controle respiratório foi de $4,91 \pm 0,13$. A partir destes valores constatou-se que na presença do peptídeo A β 40 houve uma redução do estado 3 de 5,6% e um estímulo de 13,4% do estado 4, culminando em uma redução de 16,9% do controle respiratório.

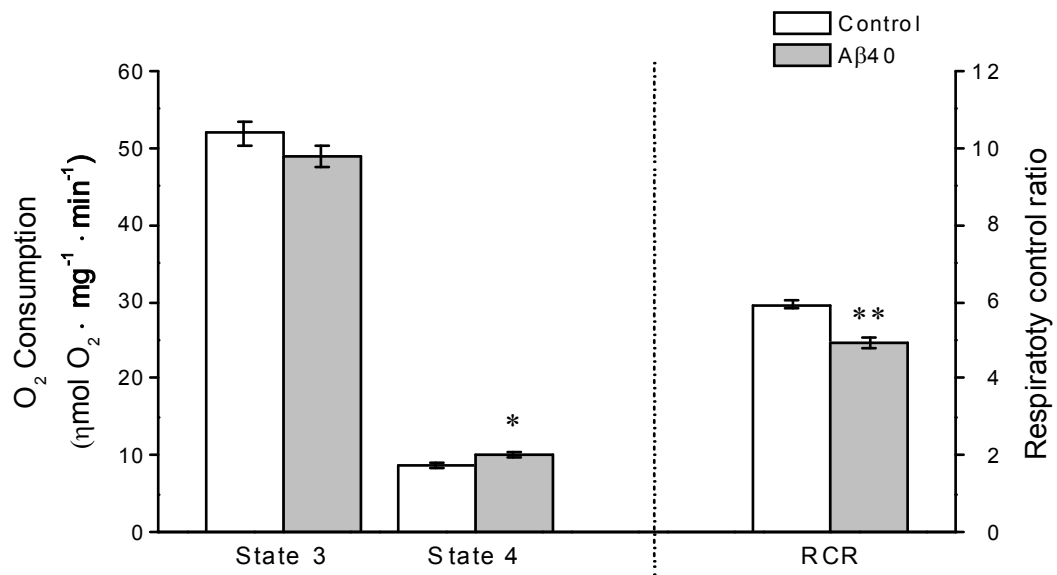


Figura 4 – Estímulo do estado 4 pelo peptídeo Aβ40 em mitocôndrias não-sinaptossomais. Mitocôndrias não-sinaptossomais isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL), sem o uso de digitonina no isolamento, foram incubadas a 30°C, em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM, na presença ou ausência do peptídeo Aβ40 24 μM. ADP 800 μM e oligomicina 1 μg/mL foram adicionados posteriormente para se estimar o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, respectivamente. Dados representam a média ± e.p.m. de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,05$. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$.

Como nos experimentos com mitocôndrias não-sinaptossomais o peptídeo A β 40 apresentou um pequeno efeito estimulatório do estado 4, surgiu a hipótese de que uma fração de mitocôndrias sinápticas seria mais suscetível ao peptídeo A β 40. Desta forma, conduzimos experimentos comparativos entre frações enriquecidas de mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais. Digitonina 0,01% foi utilizada para permeabilizar os sinaptossomas e obtenção de uma fração enriquecida de mitocôndrias sinaptossomais. Para padronizar as condições experimentais, digitonina também foi utilizada na obtenção de uma fração enriquecida de organelas não-sinaptossomais.

Os resultados da **Figura 5** mostram que na presença do peptídeo A β 40, mitocôndrias sinápticas tiveram uma redução de 8,5% no consumo de oxigênio durante o estado 3, estímulo de 37,6% do estado 4 da respiração e redução de 32,4% do controle respiratório quando comparadas ao controle. Já as mitocôndrias não-sinaptossomais apresentaram redução de 6,9% do estado 3, estímulo de 15,4% do estado 4 e redução de 18% do controle respiratório. Desta maneira, constata-se que, de fato, mitocôndrias sinaptossomais foram mais suscetíveis ao peptídeo A β do que mitocôndrias não-sinaptossomais.

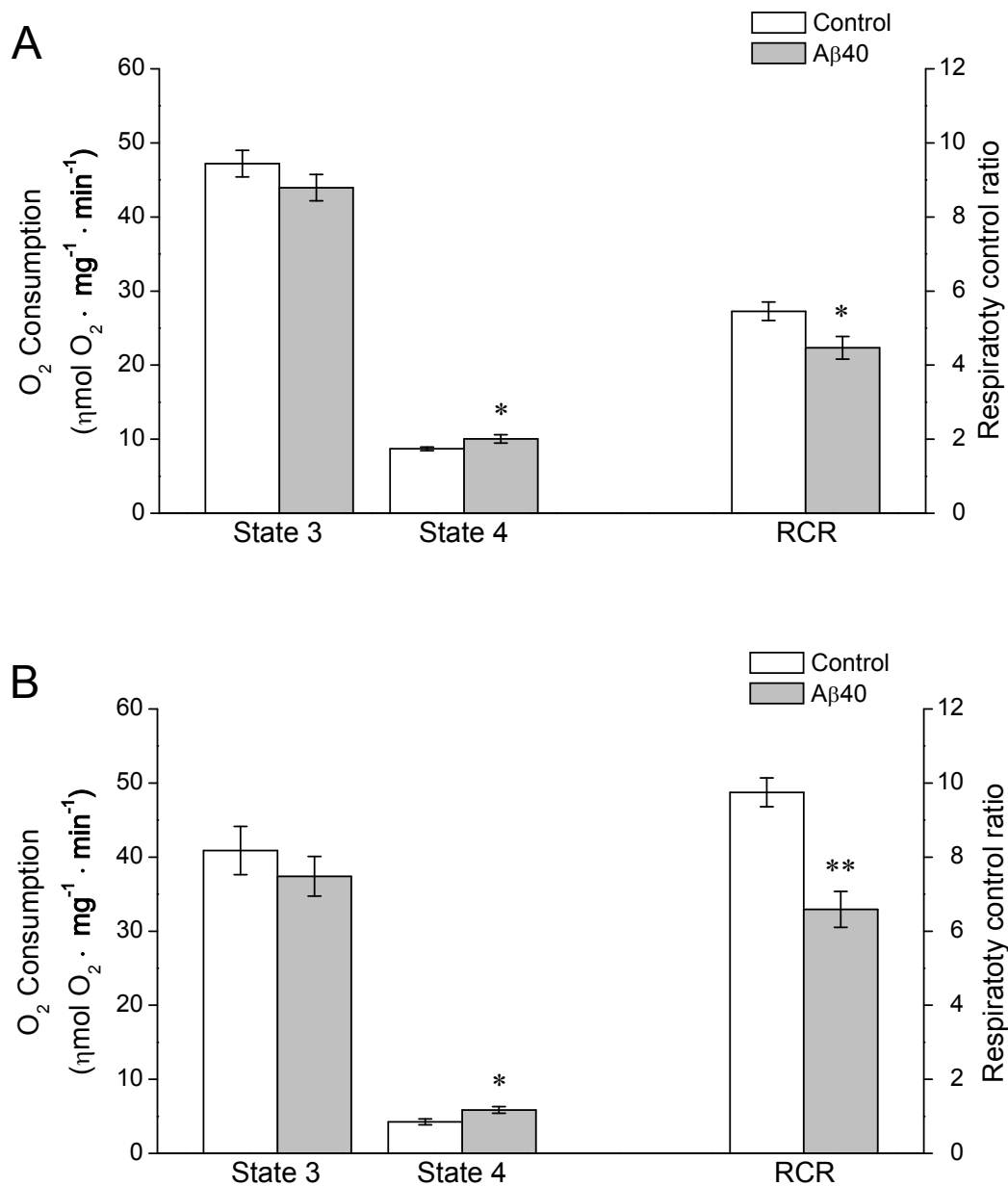


Figura 5 – Efeito do peptídeo Aβ40 em mitocôndrias não-sinaptossomais e sinaptossomais.

Mitocôndrias não-sinaptossomais e sinaptossomais isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL), com o uso de digitonina 0,01% no isolamento, foram incubadas a 30°C, em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM na presença ou ausência do peptídeo Aβ40 24 μM. ADP 800 μM e oligomicina 1 μg/mL foram adicionados posteriormente para se estimar o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, respectivamente. **Painel A:** Efeito do peptídeo Aβ40 24 μM no consumo de oxigênio por mitocôndrias não-sinaptossomais. **Painel B:** Efeito do peptídeo Aβ40 24 μM no consumo de oxigênio por mitocôndrias sinaptossomais. Dados representam a média ± e.p.m. de pelo menos 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,05$. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$.

Alterações na atividade respiratória mitocondrial podem reduzir a eficiência de transferência de elétrons, resultando não somente em uma diminuição da produção de ATP, mas também em aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Alexeyev et al., 2004). Com o intuito de verificar o efeito dos peptídeos A β na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio, realizamos experimentos para se estimar a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por mitocôndrias isoladas incubadas na presença dos peptídeos A β 40 e A β 42 oligomérico (**Figura 6**). Os resultados obtidos mostram que o peptídeo A β 40 reduziu a produção de H₂O₂ no estado 3 em 29,7% e no estado 4 em 71,5%. Já o peptídeo A β 42 mostrou um efeito menos significativo, com redução da produção de EROs no estado 3 de 13,1% e no estado 4 de 29,4%.

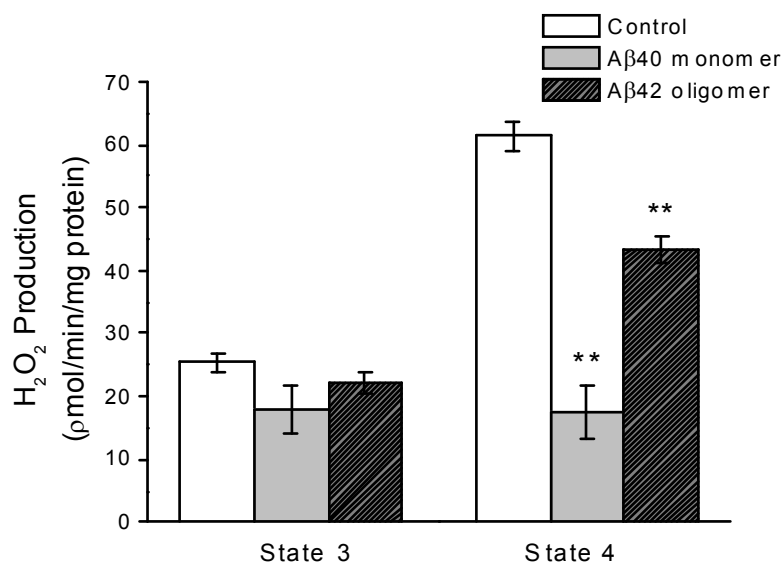


Figura 6 – Inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias tratadas com os peptídeos A β 40 e A β 42. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C, por um período de 5 minutos, em meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM, Amplex Red 10 μ M e HRP 1 U/mL na presença ou ausência do peptídeo A β 40 monomérico ou A β 42 oligomérico (24 μ M), ADP 800 μ M e oligomicina 1 μ g/mL. Dados representam a média \pm e.p.m. de 3 experimentos independentes. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$. O peptídeo A β 42 oligomérico na ausência de mitocôndrias isoladas produz $2,41 \pm 1,44$ pmol H₂O₂/min.

Para confirmar que os efeitos observados nos experimentos são de fato decorrentes do peptídeo A β e não de contaminantes da preparação (p. ex.: ácido trifluoracético, sódio, fosfato e ácido acético), realizamos um processo de ultrafiltração da solução contendo o peptídeo. A ultrafiltração consiste na separação de partículas extremamente pequenas e de moléculas dissolvidas em meio aquoso, sendo que o princípio básico deste processo consiste na separação pelo peso molecular. Neste experimento, o peptídeo A β 40 foi adicionado ao meio de reação contendo malato e glutamato e esta solução foi submetida à ultrafiltração utilizando-se um filtro para reter moléculas com peso molecular maior que 3 kDa. O **Painel A** da **Figura 7** mostra que a solução filtrada não apresenta o mesmo efeito do peptídeo A β 40 no consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas (ver **Figura 2**). De modo a recuperar o peptídeo retido durante a ultrafiltração, os filtros foram invertidos e centrifugados a 1.000 x *g* por 2 minutos. Um pequeno volume foi obtido depois deste processo e a este volume foi adicionado meio de reação e substratos (malato e glutamato) nas mesmas condições do experimento com a solução filtrada. O **Painel B** mostra que este processo de recuperação do peptídeo foi capaz de reproduzir parcialmente os efeitos observados anteriormente no consumo de oxigênio mitocondrial. Desta maneira, vimos que os efeitos observados na respiração mitocondrial são realmente atribuídos à presença do peptídeo A β .

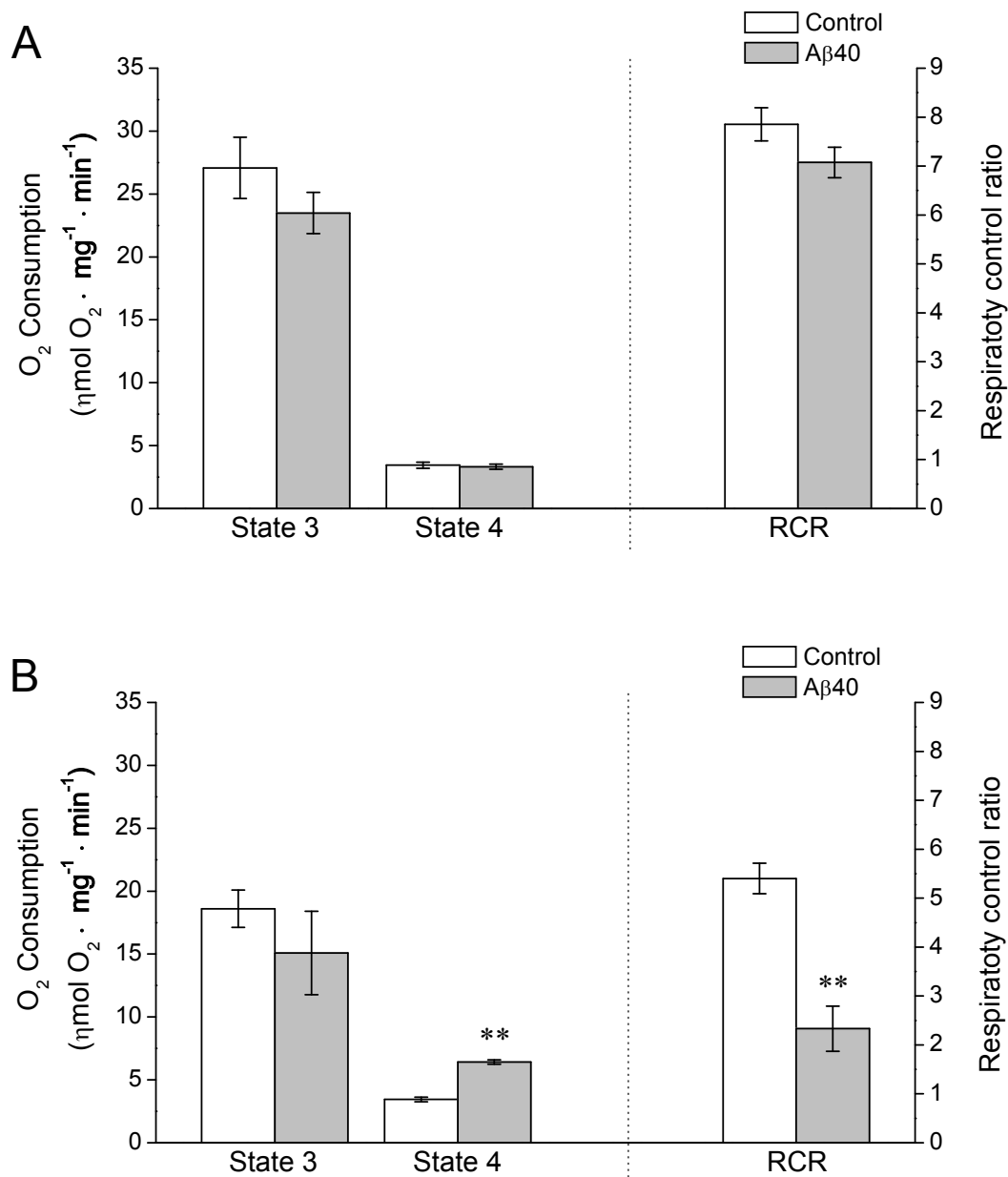


Figura 7 – Efeitos do peptídeo Aβ₄₀ na respiração mitocondrial após ultrafiltração do meio. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C, em uma solução ultrafiltrada (**Painel A**) obtida a partir da centrifugação a 14.000 x g por 20 minutos em temperatura ambiente do meio de reação padrão (pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM na presença ou ausência do peptídeo Aβ₄₀ 24 μM. A solução recuperada (**Painel B**) foi obtida a partir da centrifugação do tubo invertido a 1.000 x g por 2 minutos do volume retido da filtração do meio de reação na presença ou ausência do peptídeo Aβ₄₀ 24 μM. À solução recuperada foi adicionado meio de reação padrão contendo malato e glutamato. ADP 800 μM e oligomicina 1 μg/mL foram adicionados posteriormente para se estimar os valores dos estados 3 e 4, respectivamente. Dados representam a média ± e.p.m. de 4 experimentos independentes. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$.

Mitocôndria e retículo endoplasmático são as duas principais organelas responsáveis pela regulação da concentração de cálcio intracelular, sendo proposto que uma sobrecarga de cálcio mitocondrial teria um papel importante na ativação da morte celular em diversas desordens neurodegenerativas, como por exemplo, na doença de Alzheimer (Pivovarova e Andrews, 2010).

Assim, avaliamos a capacidade de captação e retenção de cálcio por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, utilizando o marcador molecular Calcium Green-5N. Não observamos diferença na captação e retenção de cálcio por mitocôndrias isoladas tanto na presença do peptídeo A β 40 (**Figura 8, Painel A**), quanto na presença do peptídeo A β 42 oligomérico (**Painel B**). Quando os experimentos foram realizados na presença ADP 200 μ M e ciclosporina 1 μ M, inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial (Zoratti e Szabo, 1995), as mitocôndrias foram capazes de reter 110% a mais de Ca²⁺ adicionado (dados não mostrados).

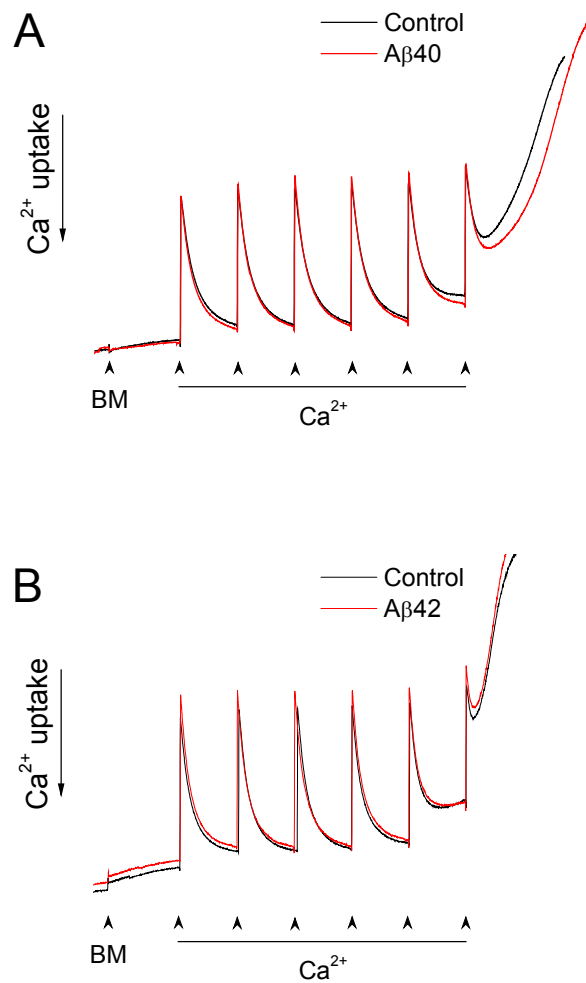


Figura 8 – Peptídeo Aβ40 não altera a captação de Ca²⁺ por mitocôndrias isoladas. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram incubadas a 30°C, em meio de reação (KCl 130 mM, K₂HPO₄ 2 mM, HEPES 20 mM, MgCl₂ 4 mM; pH 7,2) contendo malato 5 mM e glutamato 5 mM, ADP 50 μM, oligomicina 1 μg/mL, CaG-5N 0,2 μM e EGTA 15 μM. **Painel A:** O traçado vermelho representa um experimento conduzido na presença de peptídeo Aβ40 monomérico 24 μM. **Painel B:** O traçado vermelho representa um experimento conduzido na presença do peptídeo Aβ42 oligomérico 24 μM. Adições de Ca²⁺ 15 μM foram feitas a cada 4 minutos.

Uma explicação para as alterações observadas na respiração mitocondrial poderia ser que o peptídeo A β 40 interagisse com a membrana mitocondrial, uma vez que este possui características hidrofóbicas, ocasionando uma mudança na fluidez de membrana. Mason e colaboradores (1999) mostraram que o peptídeo A β 40 em sua forma solúvel localiza-se na região hidrofóbica, enquanto a sua forma agregada se associa sobretudo ao grupo hidrofílico de membranas plasmáticas sinápticas. Para verificar essa possibilidade, conduzimos experimentos para determinar alterações na fluidez de membrana mitocondrial induzidas pelo peptídeo A β . Neste experimento, mitocôndrias de cérebro de rato foram carregadas com DPH 5 μ M para as medidas de anisotropia na presença ou ausência do peptídeo A β 40. Verificou-se que mitocôndrias na presença do peptídeo A β 40 tiveram um valor de anisotropia (r) de $0,180 \pm 0,0018$, enquanto na condição controle o valor foi de $0,173 \pm 0,0008$ (Figura 9). Estes resultados indicam que o peptídeo A β 40 leva a um aumento da anisotropia e consequentemente uma diminuição da fluidez de membrana.

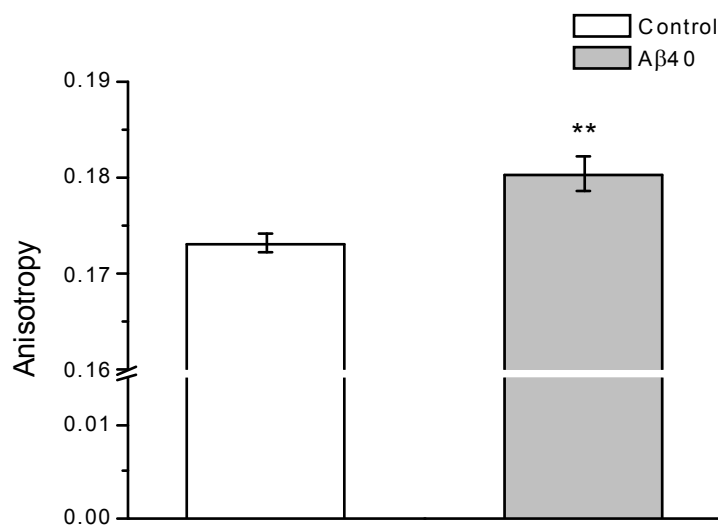


Figura 9 – Alteração da fluidez de membrana induzida pelo peptídeo Aβ40. Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (0,5 mg/mL) foram suspensas em meio de reação padrão (pH 7,2) e carregadas com DPH 5 μM. A anisotropia, como índice de fluidez de membrana, foi determinada na presença ou ausência do peptídeo Aβ40 monomérico (24 μM) conforme descrito em Materiais e Métodos. Dados representam a média ± e.p.m. de 4 experimentos independentes. **Significativamente diferente de seu respectivo controle, $p < 0,01$.

5. Discussão

A primeira etapa deste trabalho foi a caracterização das diferentes formas de agregação dos peptídeos A β . Os resultados obtidos (**Figura 1**) validaram o protocolo utilizado (Dahlgren et al., 2002), que empregou o peptídeo A β 40 para a obtenção da forma monomérica e o peptídeo A β 42 para as formas oligomérica e fibrilar. Conforme observado por outros grupos (Mason et al., 1999; Dahlgren et al., 2002; Stine et al., 2003; Sanz-Blasco et al., 2008), notamos a presença da forma monomérica juntamente com as formas oligomérica e fibrilar de A β 42 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Quando Stine et al. (2003) também analisaram a agregação de peptídeos A β por microscopia de força atômica, a presença da forma monomérica concomitantemente às formas oligomérica e fibrilar não foi observada. Desta forma, estes autores propuseram que algumas formas de agregação de A β 40 e A β 42, que foram preparadas sob condições de formação de oligômeros e fibrilas, podem se dissociar durante a eletroforese em gel de poliacrilamida (Dahlgren et al., 2002; Stine et al., 2003).

Com o protocolo de agregação dos peptídeos A β caracterizado, o próximo passo do trabalho foi estudar o efeito tóxico das formas oligomérica e fibrilar do peptídeo A β 42 e da forma monomérica do peptídeo A β 40 em mitocôndrias isoladas de cérebro. Foram avaliadas as velocidades de consumo de oxigênio durante a fosforilação de ADP (estado 3) e na respiração de repouso (estado 4), obtida pela inibição da fosforilação oxidativa por oligomicina. Observamos que os peptídeos A β na concentração de 12 e 24 μ M não causaram uma redução significativa do estado 3, porém estes peptídeos na concentração de 24 μ M estimularam a respiração de repouso (estado 4) (**Figura 2**). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre o efeito das formas oligomérica e fibrilar do peptídeo A β 42 e da forma monomérica do peptídeo A β 40 na respiração no estado 4, houve uma tendência do A β 40 monomérico promover um maior estímulo (39%). Como esperado, o estímulo da respiração de repouso pelo peptídeo A β levou a uma diminuição (de 11%) da razão ADP/O (**Figura 3**). Uma razão ADP/O menor pode ser entendida como uma diminuição na eficiência da mitocôndria em

fosforilar ADP em ATP, ou seja, mais oxigênio e tempo precisam ser despendidos para produzir uma determinada quantidade de ATP.

Nossos resultados indicando disfunção mitocondrial causada diretamente por peptídeo A β são complementares a vários estudos que já evidenciaram alterações mitocondriais pela exposição de células intactas a estes peptídeos (Abramov et al., 2003; Cardoso et al., 2004; Reddy e Beal, 2005; Woodhouse et al., 2006; Viña et al., 2007; Sanz-Blasco et al., 2008; Tillement et al., 2010). Em células intactas é mais provável que a disfunção mitocondrial seja secundária a alterações intracelulares e na membrana plasmática provocadas pelo peptídeo A β , como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e excitotoxicidade (Abramov et al., 2003; Demuro et al., 2005; De Felice et al., 2007; LaFerla et al., 2007; Sanz-Blasco et al., 2008). É importante ressaltar que, enquanto em células intactas a forma oligomérica do peptídeo A β é a mais tóxica (Dahlgren et al., 2002), em mitocôndrias isoladas notamos efeito semelhante com todas as formas. Apesar de que alguns estudos evidenciaram o acúmulo intracelular de peptídeos A β em tecido cerebral de pacientes com doença de Alzheimer (Gouras et al., 2000; Takahashi et al., 2002), a forma de agregação predominante destes peptídeos no meio intracelular ainda é desconhecida.

Nossos resultados estão de acordo com evidências de disfunções do metabolismo energético verificadas em pacientes com doença de Alzheimer. Alguns estudos mostraram uma menor concentração do aminoácido N-acetilaspártato (NAA), como um indicador de função mitocondrial neuronal e densidade (Kantarci, 2007; Moffett et al., 2007). Em um estudo multicêntrico realizado por Jessen e colaboradores (2009), utilizando espectroscopia de prótons por ressonância magnética (^1H -MRS), foi observado que concentrações de NAA e a razão metabólico NAA/Cr foram mais baixas no lobo temporal medial em pacientes com doença de Alzheimer em comparação com pacientes controles.

Notadamente, através do uso de isolamentos enriquecidos com mitocôndrias sinaptossomais e não-sinaptossomais (neurônios e não-neurônios), verificamos que mitocôndrias sinaptossomais foram mais suscetíveis ao efeito do peptídeo A β (**Figura 5**). De certa forma, este resultado se correlaciona com a neurodegeneração observada na doença de Alzheimer, onde há uma perda predominante de neurônios colinérgicos (Contran et al., 2005). Embora não tenhamos uma explicação molecular para a maior suscetibilidade de mitocôndrias sinápticas ao peptídeo A β , isto pode ser devido ao fato de mitocôndrias sinápticas apresentarem uma respiração em estado 4 mais acoplada do que mitocôndrias não-sinápticas, assim pequenas alterações na bioenergética mitocondrial podem ser suficientes para causar um estímulo significativo na respiração. Em adição, em estudo recente com camundongos transgênicos que super expressam a PPA/A β humana foi observado predominantemente em mitocôndrias sinápticas, quando comparadas a organelas não-sinápticas, um comprometimento do metabolismo oxidativo, representado por uma diminuição da respiração mitocondrial, níveis elevados de ciclofilina D, estresse oxidativo e maior vulnerabilidade à transição de permeabilidade mitocondrial (Du et al., 2010).

Quanto ao estímulo da respiração de repouso pelo peptídeo A β 40, propomos que isso se deva a alterações na estrutura da membrana mitocondrial interna causada por este peptídeo. Mostramos que na presença de concentrações micromolares do peptídeo A β 40 houve uma diminuição de fluidez da membrana mitocondrial (**Figura 9**), o que pode levar a um aumento da permeabilidade da membrana a prótons (Ricchelli et al., 1999). O efeito do peptídeo A β 40 na fluidez de membrana mitocondrial está de acordo com outros estudos (Muller et al., 1995; Mason et al., 1999) que demonstraram que peptídeos A β 40 se intercalam profundamente no núcleo de hidrocarbono da membrana sináptica levando a alterações, dose-dependente, da fluidez de membrana. Em adição, alguns trabalhos evidenciaram alterações na fluidez de membrana em material obtido de pacientes com doença de Alzheimer. Enquanto Mecocci e

colaboradores (1997) identificaram diminuição da fluidez de membrana mitocondrial, Ortiz e colaboradores (2008) descreveram uma redução na fluidez de membrana em partículas submitocondriais e eritrócitos de pacientes com doença de Alzheimer.

Vários estudos sugerem a ocorrência de estresse oxidativo na disfunção neuronal que ocorre na doença de Alzheimer (para revisões recentes ver: Moreira et al., 2008; Sultana e Butterfield, 2010). Este estresse oxidativo precede o surgimento das placas amilóides e uma maior quantidade de peptídeo A β poderia ser gerada como uma resposta compensatória pelos neurônios para atenuar este estresse (Goldsbury et al., 2008). Nossos resultados mostraram que os peptídeos A β 40 monomérico e A β 42 oligomérico reduziram a produção de EROs em mitocôndrias isoladas (**Figura 6**). Este fato se deve ao desacoplamento parcial promovido pelos peptídeos A β na respiração mitocondrial (estímulo do estado 4) (Votyakova e Reynolds, 2001). Conforme relatado na literatura (Huang et al., 1999), observamos que peptídeos A β 42 oligoméricos, na ausência de mitocôndrias, produzem uma pequena quantidade de H₂O₂ (2,41 pmol H₂O₂/min). Nossos resultados indicam que o estresse oxidativo observado na doença de Alzheimer não se deve a um efeito direto de peptídeos A β na produção mitocondrial de EROs.

Apesar dos resultados de consumo de oxigênio e geração de EROs mostrarem alterações no metabolismo mitocondrial, não observamos alterações na capacidade de captação e retenção de Ca²⁺ por mitocôndrias na presença de peptídeos A β 40 e A β 42 (**Figura 8**). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a quantidade total de Ca²⁺ captado não depende do potencial de membrana, quando este está acima de 130 mV (Nicholls, 1978). Portanto, uma pequena despolarização mitocondrial promovida pelos peptídeos A β não afeta a quantidade total de Ca²⁺ captado pelas mitocôndrias.

Trabalhos anteriores de outros grupos já avaliaram o efeito de peptídeos A β em mitocôndrias isoladas (Canevari et al., 1999; Rodrigues et al., 2000; Moreira et al., 2001; Casley

et al., 2002; Kim et al., 2002; Moreira et al., 2002; Aleari et al., 2005). Os principais resultados encontrados por estes autores serão apresentados e brevemente discutidos a seguir.

Moreira et al (2001 e 2002) demonstraram que, na presença de concentrações micromolares de Ca^{2+} , o fragmento 25-35 do peptídeo $A\beta$ ($A\beta_{25-35}$; 100 μM) causou uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial relacionada a indução da transição de permeabilidade mitocondrial. Mitocôndrias de cérebro foram mais suscetíveis ao efeito de $A\beta_{25-35}$ que organelas de fígado. O peptídeo $A\beta_{40}$ (2 μM) teve um efeito semelhante quando comparado ao peptídeo $A\beta_{25-35}$ (50 μM). Os autores atribuíram o maior efeito do peptídeo $A\beta_{40}$ ao fato deste ter sido pré-incubado para formação de agregados, mas não descreveram o modo de preparo e o tempo de incubação; e o peptídeo $A\beta_{25-35}$ foi utilizado nos experimentos sem pré-incubação. Os trabalhos de Moreira e colaboradores (2001 e 2002) focaram nos efeitos do peptídeo $A\beta_{25-35}$, sendo que apenas um resultado experimental com $A\beta_{40}$ foi reportado, o que dificulta uma comparação com o nosso protocolo, onde não obtivemos indução da transição de permeabilidade de membrana na presença deste peptídeo.

Rodrigues e colaboradores (2000) e Kim e colaboradores (2002) observaram inchamento mitocondrial e liberação de citocromo c em organelas expostas a concentrações micromolares dos peptídeos $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{40}$. A presença de ciclosporina A, um inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, teve pouco ou nenhum efeito protetor sobre as alterações mitocondriais observadas. Estes resultados indicam que estas alterações mitocondriais se devem a uma interação direta dos peptídeos $A\beta$ com a membrana mitocondrial, em sua maior parte não relacionada à indução de transição de permeabilidade mitocondrial.

Canevari e colaboradores (1999) e Casley e colaboradores (2002) observaram inibição da respiração de mitocôndrias não-sinaptossomais na presença de altas concentrações dos peptídeos $A\beta_{25-35}$ e $A\beta_{42}$. A inibição da respiração mitocondrial se mostrou associada a uma

inibição do complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia respiratória e das desidrogenases pirúvica e alfa-cetoglutárica. Estes resultados diferem dos nossos, que mostram que peptídeos A β (24 μ M) levam a estímulo da respiração de repouso (estado 4), com uma tendência não significativa de inibição da respiração durante a fosforilação oxidativa (estado 3). Acreditamos que as diferenças entre estes resultados e os reportados nesta Dissertação se devem ao fato dos trabalhos de Canevari et al. (1999) e Casley et al. (2002) terem utilizado mitocôndrias não-sinaptossomais com baixos controles respiratórios (CR = 3,3; utilizando malato e glutamato como substratos) e expostas a altas concentrações de peptídeos A β (\geq 50 μ M). Desta forma, estas condições experimentais foram mais propícias a observação de inibição da respiração, já a observação de um estímulo da respiração de repouso requereria condições experimentais mais brandas e o uso de mitocôndrias sinaptossomais bem acopladas.

Por fim, Aleardi e colaboradores (2005) também observaram inibição da respiração mitocondrial por peptídeos A β 25-35 e A β 42 (\geq 20 μ M), num mecanismo associado a inibição do complexo IV (citocromo c oxidase). Estes autores utilizaram preparações aparentemente contendo sinaptossomos e mitocôndrias não-sinaptossomais, que apresentaram um baixo controle respiratório (2,8, utilizando piruvato e malato como substratos). Apesar que Aleardi et al. (2005) utilizaram concentrações de peptídeos A β semelhantes aos resultados desta Dissertação, possivelmente as condições experimentais destes autores, assim como discutido acima para os trabalhos de Canevari et al. (1999) e Casley et al. (2002), foram mais propícias à observação de um efeito inibitório na respiração.

6. Conclusões

- As formas monomérica, oligomérica e fibrilar de peptídeos A β tiveram um efeito tóxico a mitocôndrias isoladas de cérebro, representado por um desacoplamento parcial da respiração mitocondrial de repouso.
- Mitocôndrias neuronais (sinápticas) se mostraram mais suscetíveis ao efeito tóxico de peptídeos A β que organelas não-neuronais (não-sinápticas).
- Os efeitos de peptídeos A β em mitocôndrias isoladas se correlacionaram com uma diminuição da fluidez (aumento de anisotropia) de membrana.
- Peptídeos A β levaram a uma diminuição da produção mitocondrial de EROs, provavelmente devido ao estímulo da respiração.
- Peptídeos A β não alteraram a capacidade de mitocôndrias isoladas de captarem e reterem Ca²⁺.
- Conclui-se que peptídeos A β em concentrações micromolares podem ser diretamente tóxicos a mitocôndrias neuronais, o que pode ter um papel na fisiopatologia da doença de Alzheimer.

7. Referências Bibliográficas

- Abramov, A. Y., L. Canevari, et al. (2003). "Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity." J Neurosci **23**(12): 5088-95.
- Aleardi, A. M., G. Benard, et al. (2005). "Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release." J Bioenerg Biomembr **37**(4): 207-25.
- Alexeyev, M. F., S. P. Ledoux, et al. (2004). "Mitochondrial DNA and aging." Clin Sci (Lond) **107**(4): 355-64.
- Atamna, H. and W. H. Frey, 2nd (2007). "Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease." Mitochondrion **7**(5): 297-310.
- Bertoli-Avella, A. M., B. A. Oostra, et al. (2004). "Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease." Hum Genet **114**(5): 413-38.
- Bettens, K., K. Sleegers, et al. (2010). "Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future." Hum Mol Genet **19**(R1): R4-R11.
- Bindoli, A. (1988). "Lipid peroxidation in mitochondria." Free Radic Biol Med **5**(4): 247-61.
- Bossy-Wetzel, E., R. Schwarzenbacher, et al. (2004). "Molecular pathways to neurodegeneration." Nat Med **10** Suppl: S2-9.
- Boveris, A. (1977). "Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide." Adv Exp Med Biol **78**: 67-82.
- Breitner, J. C. and M. F. Folstein (1984). "Familial Alzheimer Dementia: a prevalent disorder with specific clinical features." Psychol Med **14**(1): 63-80.
- Busciglio, J., D. H. Gabuzda, et al. (1993). "Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2092-6.
- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-30.
- Canevari, L., J. B. Clark, et al. (1999). "beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria." FEBS Lett **457**(1): 131-4.
- Carafoli, E. (2003). "Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship." Trends Biochem Sci **28**(4): 175-81.
- Cardoso, S. M., I. Santana, et al. (2004). "Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity." J Neurochem **89**(6): 1417-26.
- Casley, C. S., L. Canevari, et al. (2002). "Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities." J Neurochem **80**(1): 91-100.
- Caspersen, C., N. Wang, et al. (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease." FASEB J **19**(14): 2040-1.
- Castilho, R. F., A. J. Kowaltowski, et al. (1995). "Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria." Free Radic Biol Med **18**(3): 479-86.
- Chance, B. (1965). "The Energy-Linked Reaction of Calcium with Mitochondria." J Biol Chem **240**: 2729-48.

- Chance, B. and G. R. Williams (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization." J Biol Chem **217**(1): 383-93.
- Contran, R. S., V. Kumar, et al. (2005). Robbins & Cotran. Patologia. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Cook, D. G., M. S. Forman, et al. (1997). "Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells." Nat Med **3**(9): 1021-3.
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." Biochem J **341 (Pt 2)**: 233-49.
- Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, et al. (2002). "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability." J Biol Chem **277**(35): 32046-53.
- De Felice, F. G., P. T. Velasco, et al. (2007). "Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." J Biol Chem **282**(15): 11590-601.
- Demuro, A., E. Mina, et al. (2005). "Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers." J Biol Chem **280**(17): 17294-300.
- Devlin, T. (2003). Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. São Paulo, Edgard Blüthcher Ltda.
- Du, H., L. Guo, et al. (2010). "Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18670-5.
- Fagian, M. M., L. Pereira-da-Silva, et al. (1990). "Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants." J Biol Chem **265**(32): 19955-60.
- Ferreira, S. T., M. N. Vieira, et al. (2007). "Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases." IUBMB Life **59**(4-5): 332-45.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Annu Rev Biochem **64**: 97-112.
- Goldsbury, C., I. T. Whiteman, et al. (2008). "Oxidative stress increases levels of endogenous amyloid-beta peptides secreted from primary chick brain neurons." Aging Cell **7**(5): 771-5.
- Gornall, A. G., C. J. Bardawill, et al. (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." J Biol Chem **177**(2): 751-66.
- Gouras, G. K., J. Tsai, et al. (2000). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain." Am J Pathol **156**(1): 15-20.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Gunter, T. E., L. Buntinas, et al. (1998). "The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological-type Ca²⁺ transients." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 5-15.
- Gunter, T. E., D. I. Yule, et al. (2004). "Calcium and mitochondria." FEBS Lett **567**(1): 96-102.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update." FEBS Lett **307**(1): 108-12.
- Hansford, R. G. (1991). "Dehydrogenase activation by Ca²⁺ in cells and tissues." J Bioenerg Biomembr **23**(6): 823-54.

- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-6.
- Hartmann, T., S. C. Bieger, et al. (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides." Nat Med **3**(9): 1016-20.
- He, L. and J. J. Lemasters (2002). "Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?" FEBS Lett **512**(1-3): 1-7.
- Hebert, L. E., P. A. Scherr, et al. (1995). "Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population." JAMA **273**(17): 1354-9.
- Hebert, L. E., P. A. Scherr, et al. (2003). "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census." Arch Neurol **60**(8): 1119-22.
- Herrera Junior, E., P. Caramelli, et al. (1998). "Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva - estado de São Paulo - Brasil." Rev. Psiquiatr. Clin. **25**(2): 70-3.
- Huang, X., C. S. Atwood, et al. (1999). "The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." Biochemistry **38**(24): 7609-16.
- Jessen, F., O. Gur, et al. (2009). "A multicenter ¹H-MRS study of the medial temporal lobe in AD and MCI." Neurology **72**(20): 1735-40.
- Kantarci, K. (2007). "1H magnetic resonance spectroscopy in dementia." Br J Radiol **80 Spec No 2**: S146-52.
- Kawato, S., K. Kinoshita, Jr., et al. (1977). "Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques." Biochemistry **16**(11): 2319-24.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol **8**(8): 324-30.
- Kim, H. S., J. H. Lee, et al. (2002). "Amyloid beta peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria." Neuroreport **13**(15): 1989-93.
- Kinoshita, A., H. Fukumoto, et al. (2003). "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3339-46.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky, et al. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature **427**(6972): 360-4.
- Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-52.
- Koo, E. H. and S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." J Biol Chem **269**(26): 17386-9.
- Kowaltowski, A. J. and R. F. Castilho (1997). "Ca²⁺ acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide." Biochim Biophys Acta **1322**(2-3): 221-9.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, et al. (2001). "Mitochondrial permeability transition and oxidative stress." FEBS Lett **495**(1-2): 12-5.
- Kowaltowski, A. J., N. C. de Souza-Pinto, et al. (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **47**(4): 333-43.

- Kowaltowski, A. J., L. E. Netto, et al. (1998). "The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism." J Biol Chem **273**(21): 12766-9.
- Kowaltowski, A. J., A. E. Vercesi, et al. (1997). "Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca²⁺: correlation with mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1318**(3): 395-402.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, et al. (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annu Rev Physiol **60**: 619-42.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- LaFerla, F. M., K. N. Green, et al. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.
- Leist, M., B. Single, et al. (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." J Exp Med **185**(8): 1481-6.
- Lemasters, J. J., A. L. Nieminen, et al. (1998). "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 177-96.
- Lenaz, G. (1998). "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 53-67.
- Li, S., M. Mallory, et al. (1997). "Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression." J Neuropathol Exp Neurol **56**(8): 901-11.
- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." Nature **443**(7113): 787-95.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." Physiol Rev **79**(4): 1431-568.
- Lovell, J. F., L. P. Billen, et al. (2008). "Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax." Cell **135**(6): 1074-84.
- Mason, R. P., R. F. Jacob, et al. (1999). "Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes." J Biol Chem **274**(26): 18801-7.
- Mecocci, P., M. F. Beal, et al. (1997). "Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain." Mol Chem Neuropathol **31**(1): 53-64.
- Mitchell, P. (1966). "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation." Biol Rev Camb Philos Soc **41**(3): 445-502.
- Moffett, J. R., B. Ross, et al. (2007). "N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology." Prog Neurobiol **81**(2): 89-131.
- Moreira, P. I., A. Nunomura, et al. (2008). "Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease." Free Radic Biol Med **44**(8): 1493-505.
- Moreira, P. I., M. S. Santos, et al. (2001). "Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria." Biosci Rep **21**(6): 789-800.
- Moreira, P. I., M. S. Santos, et al. (2002). "Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study." J Neurosci Res **69**(2): 257-67.

- Muller, W. E., S. Koch, et al. (1995). "beta-Amyloid peptide decreases membrane fluidity." Brain Res **674**(1): 133-6.
- Murphy, A. N., D. E. Bredesen, et al. (1996). "Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9893-8.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.
- Nicholls, D. G. (1978). "The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria." Biochem J **176**(2): 463-74.
- Nicholls, D. G. and S. L. Budd (2000). "Mitochondria and neuronal survival." Physiol Rev **80**(1): 315-60.
- Okado-Matsumoto, A. and I. Fridovich (2001). "Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria." J Biol Chem **276**(42): 38388-93.
- Ortiz, G. G., F. Pacheco-Moises, et al. (2008). "Detection of membrane fluidity in submitochondrial particles of platelets and erythrocyte membranes from Mexican patients with Alzheimer disease by intramolecular excimer formation of 1,3 dipyrenylpropane." Dis Markers **24**(3): 151-6.
- Parks, J. K., T. S. Smith, et al. (2001). "Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro." J Neurochem **76**(4): 1050-6.
- Parsons, C. G., R. Gruner, et al. (1993). "Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan)." Neuropharmacology **32**(12): 1337-50.
- Perocchi, F., V. M. Gohil, et al. (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake." Nature **467**(7313): 291-6.
- Pivovarova, N. B. and S. B. Andrews (2010). "MINIREVIEW: Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons." FEBS J **277**(18): 3622-36.
- Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Alzheimer's disease." N Engl J Med **362**(4): 329-44.
- Reddy, P. H. and M. F. Beal (2005). "Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?" Brain Res Brain Res Rev **49**(3): 618-32.
- Reddy, P. H. and M. F. Beal (2008). "Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease." Trends Mol Med **14**(2): 45-53.
- Reinhard, C., S. S. Hebert, et al. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." EMBO J **24**(23): 3996-4006.
- Reynafarje, B., L. E. Costa, et al. (1985). "O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method." Anal Biochem **145**(2): 406-18.
- Ricchelli, F., S. Gobbo, et al. (1999). "Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition." Biochemistry **38**(29): 9295-300.
- Richter, C., V. Gogvadze, et al. (1995). "Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases." Biochim Biophys Acta **1271**(1): 67-74.
- Rizzuto, R., M. Brini, et al. (1993). "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria." Science **262**(5134): 744-7.
- Rizzuto, R., A. W. Simpson, et al. (1992). "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin." Nature **358**(6384): 325-7.

- Rodrigues, C. M., S. Sola, et al. (2000). "Bilirubin and amyloid-beta peptide induce cytochrome c release through mitochondrial membrane permeabilization." Mol Med **6**(11): 936-46.
- Rogawski, M. A. and G. L. Wenk (2003). "The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease." CNS Drug Rev **9**(3): 275-308.
- Rosenthal, R. E., F. Hamud, et al. (1987). "Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine." J Cereb Blood Flow Metab **7**(6): 752-8.
- Saito, A. and R. F. Castilho (2010). "Inhibitory Effects of Adenine Nucleotides on Brain Mitochondrial Permeability Transition." Neurochem Res.
- Sanz-Blasco, S., R. A. Valero, et al. (2008). "Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs." PLoS One **3**(7): e2718.
- Selkoe, D. J. (1997). "Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments." Science **275**(5300): 630-1.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-60.
- Sims, N. R. (1990). "Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation." J Neurochem **55**(2): 698-707.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.
- Starkov, A. A., G. Fiskum, et al. (2004). "Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species." J Neurosci **24**(36): 7779-88.
- Stine, W. B., Jr., K. N. Dahlgren, et al. (2003). "In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis." J Biol Chem **278**(13): 11612-22.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-81.
- Sultana, R. and D. A. Butterfield (2010). "Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **19**(1): 341-53.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-32.
- Takahashi, R. H., T. A. Milner, et al. (2002). "Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology." Am J Pathol **161**(5): 1869-79.
- Tillement, L., L. Lecanu, et al. (2010). "Alzheimer's disease: Effects of beta-amyloid on mitochondria." Mitochondrion.
- Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2004). "Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase." J Neurosci **24**(36): 7771-8.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-44.
- Valle, V. G., M. M. Fagian, et al. (1993). "The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants." Arch Biochem Biophys **307**(1): 1-7.

- Vercesi, A. E., A. J. Kowaltowski, et al. (2006). "Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias." Front Biosci **11**: 2554-64.
- Viña, J., A. Lloret, et al. (2007). "Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **11**(2): 175-81.
- Votyakova, T. V. and I. J. Reynolds (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria." J Neurochem **79**(2): 266-77.
- Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science **296**(5573): 1635-6.
- Wang, X., B. Su, et al. (2007). "Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." Free Radic Biol Med **43**(12): 1569-73.
- Weisiger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem **248**(13): 4793-6.
- Whitson, J. S., M. P. Mims, et al. (1994). "Attenuation of the neurotoxic effect of A beta amyloid peptide by apolipoprotein E." Biochem Biophys Res Commun **199**(1): 163-70.
- Wild-Bode, C., T. Yamazaki, et al. (1997). "Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42." J Biol Chem **272**(26): 16085-8.
- Wollmer, M. A. (2010). "Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1801**(8): 762-73.
- Woodhouse, A., J. C. Vickers, et al. (2006). "Cytoplasmic cytochrome c immunolabelling in dystrophic neurites in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **112**(4): 429-37.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Mol Neurodegener **1**: 5.
- Zhou, M., Z. Diwu, et al. (1997). "A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases." Anal Biochem **253**(2): 162-8.
- Zoratti, M. and I. Szabo (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1241**(2): 139-76.

8. Anexos



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1536-1**, sobre "**Avaliação dos efeitos do peptídeo beta-amilóide na disfunção mitocondrial na doença de Alzheimer**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Roger F. Castilho / Carlos Eduardo Benevento**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **19 de maio de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1536-1**, entitled "**Evaluation of beta-amyloid effects in the mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 19, 2008**.

Campinas, 19 de maio de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>