Vanessa de Jesus Rodrigues de Paula

**Inibição da fosfolipase A₂ e fosforilação da proteína Tau
em culturas primárias de neurônios hipocampais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2009

Vanessa de Jesus Rodrigues de Paula

**Inibição da fosfolipase A₂ e fosforilação da proteína Tau
em culturas primárias de neurônios hipocampais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente Forlenza

São Paulo

2009

Para minha Mãe,
pelo amor incondicional, carinho
e apoio durante o árduo caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Orestes Vicente Forlenza, meu orientador, pela iniciação ao mundo da ciência. Professor dedicado e paciente, Pesquisador entusiasmante e fascinante.

A Leda Talib, pelo estímulo constante a pesquisa, exemplo de competência e dedicação.

A Maria Carolina, pequena Grande cientista, pelos conselhos, críticas e risadas. Carolina Prado pelas conversas duradouras e menina Helena pela exacerbada paciência.

A Evelin pela ajuda científica.

A Edivani pelos cafés e a Sandra, por adoçar nossas tardes.

Aos profissionais do ambulatório, pelo carinho. A Mariana Flaks, Luciane Viola, Letícia, Glenda, Gisele, Roberta e Karisa.

A todos os alunos e funcionários do LIM-27.

A Elisa, secretária da pós-graduação pela estimável ajuda ao decorrer destes anos.

Ao Prof. Wagner Farid Gattaz, pela oportunidade de desfrutar e desenvolver o projeto no laboratório.

“... Sucesso, reconhecimento, fama, glória. Muitos de nós lutamos por motivos assim. Mas não se constrói um bom nome da noite para o dia. É preciso trabalhar muito. Ainda que haja tropeços e quedas, é preciso superar os obstáculos, ter motivação, perseverar, insistir... A vida é uma sucessão de batalhas. No entanto, as reviravoltas do destino nos surpreendem. Nem sempre dá para se fazer só o que gostamos, mas aquele que gosta do que faz e sente orgulho em fazer o melhor, a cada dia vai mais longe...

A verdade é que os problemas e os reveses ocorrem com maior frequência do que gostaríamos. Surgem desafios e novos objetivos. O modo como encaramos as dificuldades é que faz a diferença. Às vezes nos perguntamos: - Como enfrentar as mudanças radicais que se apresentam diante de nós? - Como atuar num novo cenário onde coisas que fazíamos tão bem precisam ser reaprendidas?- Como lutar sem deixar para trás valores fundamentais? E mais:- Como saber a medida exata a ser tomada no momento certo? O incrível é que justamente diante de situações adversas muitos redescobrem o que têm de melhor. A ética, a amizade, a capacidade de criar novas estratégias, fundamentadas na experiência, o talento para promover alianças positivas, o espírito de liderança, a consciência da força que reside no verdadeiro trabalho em equipe. Tudo isso aflora quando as circunstâncias exigem, quando se sabe que existe um objetivo maior a ser alcançado. Não é fácil adaptar-se aos novos meios, ou usar recursos aos quais não estávamos familiarizados. Mas pessimismo e insegurança nessa hora só atrapalham; ainda que a ameaça venha de vários lados, com agilidade, força e determinação, podemos alcançar o resultado. A combinação de energia e inteligência, assim como o equilíbrio entre a razão e a emoção são fundamentais para o sucesso. É uma sensação extremamente agradável chegar ao fim de uma etapa com a consciência do dever cumprido. E obter a consagração, o respeito de todos, o reconhecimento dos colegas, a admiração das pessoas que amamos... Ouvir o próprio nome com orgulho. Aquele orgulho de quem viu nos obstáculos a oportunidade de crescer, de quem soube enfrentar as turbulências da vida e crescer. Orgulho de ser um vencedor que não abriu mão dos seus valores fundamentais...”

Trecho extraído do filme “O Gladiador”, 2000.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *Internatonal Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed.

São Paulo: Serviço de biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XIII
Resumo	XV
Summary	XVII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Doença de Alzheimer	01
1.1.2. <i>Cascata do beta-amilóide</i>	03
1.1.3. <i>Glicogenio Sintase Kinase 3 beta (GSK3B)</i>	04
1.1.4 <i>Pré- senilinas 1 e 2</i>	05
1.1.5. <i>Apolipoproteína E</i>	05
1.2. Fosfolipase A₂	06
1.2.1. <i>Subgrupos de fosfolipase A₂</i>	07
1.2.2. <i>Subgrupos de PLA₂ identificados no cérebro de ratos</i>	14
1.3. Proteína Tau	14
1.3.1. <i>Proteína Tau e doença de Alzheimer</i>	20
1.3.2. <i>Fosfolipase A₂ e doença de Alzheimer</i>	22
1.3.3. <i>Fosfolipase A₂ e proteína Tau</i>	23
2. OBJETIVOS e HIPÓTESES	25
3. MATERIAIS e MÉTODOS	27
3.1. Culturas primárias de neurônios	27
3.1.1. <i>Obtenção das culturas</i>	27

3.1.2.	<i>Tratamentos</i>	33
3.1.3.	<i>Determinação da viabilidade celular</i>	34
3.2.	Métodos de análise	35
3.2.1.	<i>Obtenção de extratos celulares</i>	35
3.2.2.	<i>Determinação de proteínas totais</i>	36
3.2.3.	<i>Eletroforese em gel e Western-blotting</i>	37
3.2.4.	<i>Imunoblotting</i>	39
3.2.5.	<i>Reação de quimioluminescência amplificada (ECL)</i>	42
3.3.	Curva de inibição da PLA₂ com PACOCF₃	43
3.3.1.	<i>Tratamentos</i>	43
3.3.2.	<i>Determinação da atividade da PLA₂ por ensaio radioenzimático</i>	44
3.4.	Determinação da viabilidade celular segundo o método do MTT	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	Curva de inibição com PACOCF₃	47
4.1.1.	<i>Efeitos da inibição da PLA₂ sobre a viabilidade neuronal</i>	48
4.2.	Controle interno do Blotting com Actina	50
4.3.	Efeitos da inibição da PLA₂ sobre a fosforilação da Tau	51
4.3.1.	<i>Inibição da PLA₂ com MAFP</i>	52
4.3.2.	<i>Inibição da PLA₂ com BEL</i>	56
4.3.3.	<i>Inibição da PLA₂ com PACOCF₃</i>	60
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÕES	70
7.	ANEXOS	71

8.	ASPECTOS ÉTICOS	89
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Atrofia cerebral na doença de Alzheimer, redução volumétrica do córtex e do hipocampo.	02
FIGURA 2	Placas senis e emaranhados neurofibrilares, achados histopatológicos característicos da doença de Alzheimer	03
FIGURA 3	Fosfolipase A_2 humana. orientação do domínio sobre interação com a membrana biológica	08
FIGURA 4	Estrutura da cPLA ₂ , domínio dependente de cálcio (C2)	11
FIGURA 5	Proteína Tau e estabilização dos microtúbulos, e formação dos emaranhados neurofibrilares.	16
FIGURA 6	As seis diferentes isoformas da proteína Tau com a presença e ausência do exon 10	17
FIGURA 7	Diferentes sítios de fosforilação da proteína Tau em serina e treonina.	18
FIGURA 8	Obtenção do tecido cerebral de rato.	28
FIGURA 9	Dissecção do hemisfério cerebral, remoção da meninge, remoção da estrutura hipocampal e remoção da meninge do hipocampo.	29
FIGURA 10	Imagens representativas de culturas primárias de neurônios corticais e hipocámpais de ratos após quatro dias em cultura.	32
FIGURA 11	Eletroforese de proteínas para separação por peso molecular em gel de poliacrilamida 12%.	38
FIGURA 12	Transferência da proteína do gel de acrilamida para membrana de	40

nitrocelulose por carga e reação da membrana de nitrocelulose com anticorpo primário.

FIGURA 13	Mecanismo de formação de vesículas lipídicas.	45
FIGURA 14	Efeitos de diferentes doses do PACOCF-3 sobre a atividade da PLA ₂ em neurônios corticais.	48
FIGURA 15	Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de MAFP, durante 30 minutos.	49
FIGURA 16	Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de BEL, durante 30 minutos.	49
FIGURA 17	Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de PACOCF ₃ , durante 30 minutos.	50
FIGURA 18	Valores densitométricos, das culturas tratadas com MAFP, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.	50
FIGURA 19	Valores densitométricos, das culturas tratadas com BEL, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.	51
FIGURA 20	Valores densitométricos, das culturas tratadas com PACOCF-3, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.	51
FIGURA 21	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratadas com MAFP	53
FIGURA 22	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo S396, obtidos com cultura de neurônios	53

corticais e hipocampais tratados com MAFP

FIGURA 23	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo AT-8, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com MAFP.	54
FIGURA 24	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratados com MAFP.	55
FIGURA 25	Representação gráfica dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (fosfo-Ser199/202), obtidos em cultura de neurônios corticais tratadas com MAFP.	55
FIGURA 26	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	56
FIGURA 27	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo S396, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	57
FIGURA 28	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser214, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	57
FIGURA 29	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (S199/202), obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	58
FIGURA 30	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser202/205 , obtidos em culturas de	59

neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.

FIGURA 31	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo T181, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	59
FIGURA 32	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	60
FIGURA 33	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (S199/202), obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL.	61
FIGURA 34	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser396, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF3.	61
FIGURA 35	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo AT-8, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF3.	62
FIGURA 36	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser214, obtidos em culturas de neurônios hipocampais tratadas com PACOCF3.	63
FIGURA 37	Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo T181, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF3.	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Anticorpos utilizados para detecção dos diferentes sítios de fosforilação da proteína Tau em neurônios corticais e hipocampus.	41
TABELA 2	Diluição e tempo de incubação dos anticorpos utilizados para detecção da proteína Tau em neurônios corticais e hipocampus.	42
TABELA 3	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo C-terminal, MAFF	71
TABELA 4	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Tau-1, MAFF	72
TABELA 5	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser396, MAFF	73
TABELA 6	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser214, MAFF	74
TABELA 7	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo AT-8, MAFF.	75
TABELA 8	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo T-181, MAFF.	76
TABELA 9	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo C-terminal, BEL.	77

TABELA 10	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Tau-1, BEL.	78
TABELA 11	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser396, BEL.	79
TABELA 12	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser214, BEL.	80
TABELA 13	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo AT-8, BEL.	81
TABELA 14	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo T-181, BEL.	82
TABELA 15	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo C-terminal, PACOCF3.	83
TABELA 16	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Tau-1, PACOCF3.	84
TABELA 17	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser396, PACOCF3.	85
TABELA 18	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo Ser214, PACOCF3.	86
TABELA 19	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo At-8, PACOCF3.	87
TABELA 20	Valores densitométricos do <i>Western Blot</i> no epitopo T-181, PACOCF3.	88

RESUMO

De-Paula, V.J.R. Inibição da fosfolipase A₂ e fosforilação da Proteína Tau em culturas primárias de neurônios hipocampusais. São Paulo, 2009. 119p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A proteína Tau é um importante componente do citoesqueleto neuronal, encontrada fundamentalmente nos axônios e sendo responsável pela estabilização dos microtúbulos. Agregados de proteína Tau em estado hiperfosforilado dão origem aos filamentos helicoidais pareados, que por sua vez integram os emaranhados neurofibrilares. Estes, ao lado das placas senis, representam os achados patológicos característicos da doença de Alzheimer (DA). A superfamília das fosfolipases A₂ (PLA₂) compreende diversas enzimas que participam de processos fisiológicos importantes, tais como a digestão de fosfolípidios, a remodelação da membrana celular e a geração de mensageiros para a sinalização intracelular. Existem evidências indiretas de que o estado de fosforilação da Tau é modificado pelos produtos metabólicos da PLA₂, em processos de neuritogênese e plasticidade sináptica. O presente trabalho tem como objetivo investigar, em culturas primárias de neurônios, os efeitos da inibição da PLA₂ sobre o estado de fosforilação da proteína Tau. Foram utilizados inibidores de diferentes subtipos de PLA₂ para o tratamento das culturas, sendo os efeitos determinados pelo método de *Western Blot*, utilizando-se painel de anticorpos direcionados contra a proteína Tau sensíveis ao estado de

fosforilação de seus diferentes fosfoepítomos. Nossos achados mostram que a inibição da PLA₂ leva a um aumento dose-dependente e específico da fosforilação da Tau no resíduo de Serina 214. Isso sugere que a PLA₂ participa da regulação do estado de fosforilação da Tau em neurônios hipocampais por uma via independente da ação da enzima glicogênio sintase quinase (GSK), que é a principal quinase da proteína Tau em neurônios. Essas evidências reforçam o papel da PLA₂ na fisiopatologia da DA, na qual a redução da atividade enzimática correlaciona-se com parâmetros clínicos e neuropatológicos da demência.

Descritores: proteínas Tau, doença de Alzheimer e fosfolipases A₂.

SUMMARY

De-Paula, V.J.R. **phospholipase A₂ inhibition and Tau protein phosphorylation in primary cultures of hippocampal neurons.** São Paulo, 2009. 119p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Tau protein is an important cytoskeleton component, responsible for microtubules stabilization, found basically in axons of neurons. The abnormal aggregation of Tau protein in a hyperphosphorylated state could lead to paired helical filaments, which in turn integrate the neurofibrillary tangles present in many illnesses, such Alzheimer Disease (AD). Together with senile plaques, neurofibrillary tangles represent the histopathological findings of AD. Indirect evidences show that metabolic products of an important family of enzymes, phospholipase A₂ (PLA₂) are responsible for modifications in neuritogenesis processes, synaptic plasticity and in Tau phosphorylation state. The superfamily of PLA₂ comprehends many enzymes important in physiological processes, such as phospholipids digestion, cellular membrane remodeling and messengers of intracellular signaling. This way, the objective of this research is to investigate, in primary neurons cultures, the effect of PLA₂ inhibition on Tau phosphorylation state. Cultures were treated with PLA₂ inhibitors and the effects were analyzed by western-blot method using specific antibodies for some Tau phosphorylated residues. Our findings show that the PLA₂ inhibition increases Tau phosphorylation in Serine 214 residue in dose-dependent and specific manner. These findings suggest that PLA₂ participate in hippocampal neurons Tau phosphorylation regulation, in a

glycogen sintase quinase (GSK) independent manner. These evidences strengthen the possible role of PLA₂ in the physiopathology of AD and that the reduction of its enzymatic activity is correlated with clinical and neuropathology parameters of dementia.

Descriptors: Tau proteins, Alzheimer disease and phospholipases A₂

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Doença de Alzheimer:*

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, que corresponde à forma mais comum de demência em idosos. A doença afeta mais de 30 milhões de indivíduos em todo o mundo (Mazanetz et al., 2007). Em suas fases iniciais, a doença é caracterizada pela perda progressiva de memória e de pelo menos mais uma função cognitiva como linguagem, atenção, orientação ou raciocínio. Na sua evolução, que pode levar vários anos, os processos patogênicos subjacentes à DA causam comprometimento irreversível das regiões cerebrais responsáveis pelo funcionamento cognitivo-intelectual, resultando em um quadro demencial (Shahani e Brandt, 2002).

O processo patogênico da DA inicia-se nas porções mesiais do lobo temporal, mais precisamente no hipocampo e no córtex entorrinal (Braak e

Braak, 1991; Hof et al., 1992). A perda neuronal ocorre, sobretudo, nas camadas ricas em neurônios piramidais e afeta, principalmente, as estruturas límbicas e os córtices associativos, com relativa preservação das áreas corticais primárias (motora, somatossensitiva e visual) (Davies et al., 1992). Exame macroscópico do cérebro de indivíduos acometidos pela DA revelam atrofia cortical em graus variáveis e dilatação de fissuras (FIGURA1). Paralelamente à perda neuronal, ocorre intensa degeneração sináptica em regiões hipocampus (Heinonen et al., 1995) e neocorticais (Scheff e Price, 1993).

Figura 1: Atrofia cerebral na doença de Alzheimer, à direita em relação ao cérebro normal, à esquerda. Redução volumétrica do córtex e do hipocampo. (fonte: modificado www.rps.psu.edu/probing/alzheimers.html)

As placas senis (PS) e os emaranhados neurofibrilares (ENFs) são os achados histopatológicos característicos da doença (FIGURA 2). As PS foram descritas no início do século passado por Fischer em estudos com pacientes portadores de demência senil, e correspondem a formações extracelulares cujo componente principal é o peptídeo beta-amiloide ($A\beta$). Os

ENFs foram descritos por Alois Alzheimer em 1907, na análise microscópica do tecido cortical da paciente Auguste D., que faleceu acometida por grave demência pré-senil (Maurer et al., 1997; Goedert e Spillantini, 2006).

Figura 2. Placas senis e emaranhados neurofibrilares, achados histopatológicos característicos da doença de Alzheimer (fonte: modificada de www.realage.com/.../alzheimer/facts.aspx?topic=1)

1.1.2. Cascata do beta-amilóide

O beta-amilóide ($A\beta$) é um peptídeo altamente hidrofóbico, formado a partir da proteína precursora do amilóide (APP) que se agrega formando oligômeros. Os oligômeros, por sua vez se agregam formando fibras que se depositam no parênquima cerebral, dando origem às placas senis (Hass, 2004). O depósito do $A\beta$ é acompanhado por neurites distróficas, micróglias ativadas e astrócitos reativos. O $A\beta$ presente nas placas senis é uma mistura de uma grande porção de fibrilas de amilóide insolúveis (placas neuríticas) e uma pequena porção de formas não fibrilares do peptídeo (placas difusas). Existe uma grande correlação estatística entre a quantidade

de placas neuríticas (medidas *post-mortem*) e o grau de comprometimento cognitivo (Selkoe, 2004). As placas senis formadas nas regiões corticais e límbicas parecem induzir disfunções sinápticas e dendríticas, além de ativar micróglia e astrócitos, representando uma resposta inflamatória local. Estas alterações que no início são sutis e vão evoluindo em intensidade, são acompanhadas por alterações celulares e bioquímicas, como a formação de radicais livres, reações oxidativas, prejuízo na homeostase iônica e por último, morte neuronal (Selkoe, 2005).

1.1.3 *Glicogênio sintase quinase-3B*

Glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) é uma serina/treonina kinase com duas isoformas, α e β , altamente expressa no cérebro de mamíferos. A atividade da GSK-3 é regulada negativamente pela fosforilação de serina e positiva pela fosforilação de treonina (Liang and Chuang, 2007). GSK-3 β é distribuída em diferentes compartimentos subcelulares como citosol, núcleo e mitocôndria. Sua distribuição subcelular contribui para sua regulação funcional (Liang and Chuang, 2007). A desregulação da GSK-3 mediada pela fosforilação de substratos e caminhos de sinalização implicam em condições fisiopatológica de várias doenças, incluindo a doença de Alzheimer (Liang and Chuang, 2007).

A GSK-3 β é a principal Tau quinase, impedindo a ligação da Tau aos microtúbulos, mantendo-se dispersa no citoplasma (Lovestone et al., 1996)

1.1.4. *Pré-senilinas 1 e 2*

Mutações envolvendo os genes da pré-senilina 1 e 2 (PS-1; PS-2), determinam um padrão de herança dominante na DA (Sherrington et al., 1995). As PS-1 e PS-2 presentes no cromossomo 1 e 14, respectivamente, alteram o metabolismo da APP resultando em um aumento da formação do peptídeo A β (Iovestone, 2000). Estudos em cultura mostraram que as pré-senilinas e a APP colocalizam-se no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Takashima et al., 1996, de Strooper et al., 1997), organelas onde ocorrem modificações pós-translacionais do processamento de proteínas celulares. Todos os pacientes que apresentam mutações dos genes das PS-1 e 2 apresentam metabolismo alterado da APP, gerando cadeias mais longas e solúveis do peptídeo beta-amilóide (Hardy, 1997; da Silva e Patel, 1997).

1.1.5. *Apolipoproteína E*

A apolipoproteína E (apoE) é uma proteína que participa do transporte e metabolismo de lipídeos, particularmente do colesterol. É produzida em diversos órgãos, sendo abundante no fígado e no cérebro. No sistema nervoso, a apoE é produzida em células da glia, particularmente astrócitos e macrófagos (Farrer et al., 1997). Foram descritas quatro isoformas da apoE, mas apenas três (apoE2, E3 e E4) são usuais. As isoformas diferem entre si pela substituição de um aminoácido nos epítomos 112 e 158 (Goedert et al., 1994). O alelo e-4, que incide em cerca de 15%

da população, tem sua frequência aumentada em indivíduos com DA (Farrer et al., 1997).

1.2. Fosfolipase A₂

A denominação fosfolipaseA₂ (PLA₂) compreende uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise da posição *sn*-2 dos fosfolípidos de membranas celulares, plasmáticas e subcelulares, levando à produção de ácidos graxos livres e lisofosfolípidos. Os lisofosfolípidos possuem atividade lítica sobre a membrana celular, além de estarem envolvidos em diversas funções biológicas como quimiotaxia, mitogênese, contração da musculatura lisa (Nishizuka, 1992) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (Hanahan, 1986). A produção de ácidos graxos é também relevante para a regulação de diversos processos fisiológicos como, por exemplo, a síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico (AA) (Fenton et al., 2000; Kudo e Murakami, 2002). Embora o AA possa ser liberado dos fosfolípidos por processos que não envolvam PLA₂, as enzimas dessa família correspondem, em muitos tipos celulares, o principal sistema enzimático que regula essa função. Os lisofosfolípidos, o AA e seus subprodutos (tais como as prostaglandinas) são importantes mediadores da transmissão e do processamento de sinais neuronais (Piomelli, 1993; Bazan et al., 1993). Esse efeito se dá através da ação dos mesmos como segundos mensageiros e da modulação dos canais iônicos, da expressão gênica, e da liberação e captação de neurotransmissores (Lautens et al., 1998).

Vários subgrupos de PLA₂ foram identificados e caracterizados até o momento (Underwood et al., 1998). Em mamíferos, pelo menos 20 enzimas que possuem atividade compatível com essa família foram identificadas. Essas enzimas podem ser classificadas em três grupos principais:

- a) PLA₂ extracelular ou secretada, dependente de Ca²⁺: compreende os subgrupos 1B (PLA₂GIB), 2A (PLA₂GIIA), 2D (PLA₂GIID), 2E (PLA₂GIIE), 2F (PLA₂GIIF), 3 (PLA₂GIII), 5 (PLA₂GV), 10 (PLA₂GX), 12 (PLA₂GXII) e 13 (PLA₂GXIII).
- b) PLA₂ intracelular ou citosólica, dependente de Ca²⁺: compreende os subgrupos: 4A (PLA₂GIVA), 4B (PLA₂GIVB) e 4C (PLA₂GIVC).
- c) PLA₂ citosólica independente de Ca²⁺: compreende os subgrupos: 6A (PLA₂GVIA) e 6B (PLA₂GVIB).

As PLA₂ intracelulares parecem contribuir para a patogênese de doenças neuropsiquiátricas como: esquizofrenia, epilepsia, doença de Alzheimer, depressão, esclerose múltipla, entre outras. Nestas doenças já foram descritas alterações de metabolismo de fosfolípidos na membrana neuronal.

1.2.1. Subgrupos de fosfolipase A₂:

As PLA₂ extracelulares ou secretadas são muito semelhantes. Essas enzimas são caracterizadas por baixo peso molecular (12 a 18kDa), um domínio catalítico e um domínio fortemente ligado ao íon Ca⁺² (*calcium loop*), requerimento de Ca²⁺ em concentrações milimolares, e por não

apresentar nenhuma seletividade ao ácido graxo da posição *sn*-2. A hidrólise do substrato é precedida pela ativação e orientação de uma molécula de água através de uma ponte de hidrogênio com o sítio ativo histidina. Junto à histidina existe um resíduo de aspartato, que juntamente com o sítio de ligação ao cálcio retêm o íon (FIGURA 3). Membranas ricas em esfingomielina dificultam a penetração da sPLA₂. A presença de fosfolípides oxidáveis nas vesículas facilita a reação das sPLA₂.

Figura 3. Fosfolipase A₂ humana. As esferas representam os íons Ca⁺², os quais são requeridos para a atividade catalítica e para o aumento da integridade estrutural. A figura representa a orientação do domínio sobre interação com a membrana biológica (representada pelo plano). Representado em verde transparente estão os estados análogos da molécula lipídica sendo hidrolisadas no sítio catalítico. Os resíduos em azul representam mudanças de cargas positivas, as quais são importantes para a interação interfacial da enzima com a membrana biológica. Fonte brahms.chem.uic.edu/figures/pla2_lig.jpg

A oxidação dos fosfolípides altera o estado fisiológico das membranas, o qual por sua vez afeta a suscetibilidade dos resíduos de

ácidos graxos oxigenados e não oxigenados para o ataque da sPLA₂. As sPLA₂ estão envolvidas em vários processos biológicos tais como modificação na geração de eicosanóides, inflamação e defesa do hospedeiro (Kudo e Murakami, 2002).

No cérebro, as sPLA₂ estão presentes em todas as regiões, apresentando maior atividade no bulbo, hipocampo e córtex, e menor atividade no tálamo e hipotálamo (Farooqui et al., 2004).

Os subgrupos 4A, 4B e 4C de PLA₂ citosólica apresentam peso molecular de 85, 110 e 60kDa, respectivamente. A PLA₂GIVA é a forma melhor caracterizada até o momento. Essa PLA₂ consiste de dois domínios funcionalmente distintos: (1) domínio de ligação a lípidos de membrana, localizado no segmento aminoterminal (N-terminal), dependente de Ca²⁺, também conhecido como domínio C2 (138 aminoácidos); e (2) domínio catalítico independente de Ca²⁺ localizado no segmento carboxiterminal (C-terminal), que corresponde aos resíduos do sítio ativo (Nalefski et al., 1998) (FIGURA 4). É a única PLA₂ que mostra seletividade significativa para fosfolípidos que possuem ácido araquidônico na posição *sn*-2, sendo o grau de insaturação, a posição da dupla ligação e o tamanho da cadeia do ácido graxo na posição *sn*-2 os responsáveis pela especificidade da enzima ao substrato. Concentrações micromolares de Ca²⁺ ativam a PLA₂GIVA, onde o íon permite o deslocamento da enzima até a vesícula de fosfolípide para a hidrólise interfacial (Kudo e Murakami, 2002). O aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ ocorre pela mobilização desse íon armazenado internamente e ou pelo influxo de Ca²⁺ do espaço extracelular via canais

operados por voltagem ou por receptores (Hirabayashi e Shimizu, 2000). O domínio C2 isolado da PLA₂GIVA humana mostrou uma seletividade para a ligação às vesículas de fosfolípides com cabeça polar com características hidrofóbicas (cabeça polar neutra), como fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) (Nalefski e Falke, 1996; Nalefski et al., 1998).

As PLA₂GIVA são expressas na maioria das células e tecidos, incluindo plaquetas. Sem dúvida, a PLA₂GIVA desempenha um papel essencial na liberação do AA dos fosfolípides suprindo as cascatas das ciclo-oxigenases e das lipoxigenases para a produção de eicosanóides, além de regular a produção de mediadores derivados de lisofosfolípides como o fator ativador de plaquetas (PAF). Algumas linhas de pesquisa têm associado a PLA₂GIVA à regulação da apoptose por mecanismos pouco conhecidos. Presumivelmente certos produtos da PLA₂GIVA, como eicosanóides ou lisofosfolípides, devem secundariamente afetar a viabilidade celular e a sua proliferação (Kudo e Murakami, 2002).

A PLA₂GIVB também está localizada no citosol, porém, na presença de íons Ca²⁺ desloca-se para as membranas. A liberação de AA do substrato radioativo PC¹⁴C (L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina) pela PLA₂GIVB foi estritamente dependente de Ca²⁺, uma vez que não foi detectada atividade da enzima na presença do quelante de Ca²⁺ EGTA (Song et al., 1999). Adicionalmente, foi observada uma diminuição da atividade dessas PLA₂ de 5-10 vezes na presença de EDTA, um outro quelante de Ca²⁺, em relação à atividade observada na presença de Ca²⁺ 1,0 mM (Pickard et al., 1999). Tomados em conjunto, os achados descritos

sugerem que a PLA₂GIVB pode responder a agonistas que mobilizam Ca²⁺ de maneira similar à PLA₂GIVA. A sensibilidade da PLA₂GIVB ao Ca²⁺ é provavelmente devida a uma região na sua sequência de aminoácidos que possui uma semelhança ao domínio C2 da PLA₂GIVA (Song et al., 1999).

Figura 4. Estrutura da cPLA₂. O domínio dependente de cálcio (C2) está representado em rosa e o domínio catalítico C-terminal em azul. A superfície de ligação à membrana é representada pela parte superior da estrutura. A imagem foi gerada usando o programa Cn3D (NCBI) e é baseada na estrutura de (Dessen et al., 1999).

A PLA₂GIVC não contém o domínio C2 (Underwood et al., 1998; Pickard et al., 1999) o qual é importante para a ligação dependente de Ca²⁺ da PLA₂GIVA às membranas (Nalefski et al., 1994), indicando que a ativação da PLA₂GIVC é regulada por um mecanismo diferente daquele da PLA₂GIVA, bem como da PLA₂GIVB. Em células de ovário de hamster chinês (CHO) e células de insetos Sf9 transfectadas com o gene codificador da PLA₂GIVC humana, superexpressando a enzima, observou-se que a mesma localiza-se na fração de membranas, e não na fração sobrenadante (Underwood et al., 1998; Stewart et al., 2002). Para a determinação do

requerimento de Ca^{2+} para a atividade da PLA_2GIVC , lisados de células COS^1 superexpressando a enzima, foram incubados com o substrato PC^{14}C na ausência Ca^{2+} ou na presença de Ca^{2+} 10mM; observou-se que a atividade da enzima não é afetada pelo Ca^{2+} (Underwood et al., 1998). Além disso, a atividade da PLA_2GIVC não foi afetada pelo uso do EDTA (Pickard et al., 1999). Esses achados indicam que a PLA_2GIVC é uma enzima independente de Ca^{2+} , apesar de pertencer ao grupo das PLA_2 cálcio-dependentes. Isso se deve à semelhança estrutural com as enzimas desse grupo, principalmente no seu domínio catalítico, que é bem semelhante ao da PLA_2GIVA (Underwood et al., 1998).

Em membranas neuronais e em outros sistemas celulares, a ativação da PLA_2GIV (e a conseqüente liberação de AA) pode ocorrer através de diferentes mecanismos de ligação com receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos e glutamatérgicos, bem como pela ação de citocinas e de fatores de crescimento. Portanto, pelo acoplamento a diferentes cascatas de sinalização, a PLA_2GIV constitui-se em uma importante via para a liberação rápida de AA em neurônios, além de modular diversos processos intracelulares (Farooqui et al., 2004; Sun et al., 2004).

As enzimas do subgrupo das PLA_2 citosólicas independentes de Ca^{2+} (6A e 6B) têm peso molecular em torno de 80kDa e caracterizam-se por hidrolisar os ácidos graxos da posição *sn*-2 dos fosfolípidos, com a seguinte ordem de preferência: ácido linolêico > ácido palmítico > ácido olêico > ácido araquidônico. A PLA_2GVI tem uma única seqüência de aminoácidos

¹ COS é um acrônimo de linhagem de células originárias de macacos; do inglês: CV-1 (simian) in Origin, carrying the SV40 genetic material.

contendo uma lipase e sete ou oito repetições *ankyrin*² (Kudo e Murakami, 2002; Farooqui et al, 2004).

Embora a PLA₂GVI não tenha muita preferência em clivar fosfolípidos com AA na posição *sn*-2, está diretamente envolvida na regulação das reações de remodelamento de ácidos graxos nos fosfolípidos de membranas celulares, então deve influenciar a distribuição subcelular de AA entre os diferentes compartimentos, bem como a quantidade relativa de ácido graxo presente em cada compartimento celular (Balsinde et al., 1999).

Em homogenatos de células COS superexpressando a enzima, a atividade da PLA₂GVIA foi determinada a partir da incubação com os substratos PC¹⁴C e PE¹⁴C (fosfatidiletanolamina marcada com ¹⁴C); os autores demonstraram que a enzima localiza-se na fração de membranas, e não no citosol (Larsson et al., 1999). A determinação do requerimento de Ca²⁺ para a atividade da PLA₂GVIA humana em lisados de células COS que superexpressam a enzima, incubados com ambos os substratos PC¹⁴C e PE¹⁴C, na ausência de Ca²⁺ ou na presença de Ca²⁺ 5,0 mM, mostrou que a atividade da enzima foi significativamente maior na ausência de Ca²⁺ (Larsson et al., 1998).

Na determinação da atividade da PLA₂GVIIB no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células Sf9 ou de células COS superexpressando a enzima, foram observados, níveis similares tanto na fração citosólica de células controles quanto na de células que superexpressam a PLA₂GVIIB. A atividade dessa enzima foi detectada predominantemente na fração de

² Família de proteínas com cinco domínios funcionais

membranas. A determinação do requerimento de Ca^{2+} para a atividade da PLA_2GVIB humana no “pellet” de membranas de células Sf9 superexpressando a enzima, incubado com PC sintética como substrato, na ausência ou na presença de Ca^{2+} (variando de 0-10 mM), mostrou que a atividade da PLA_2GVIB foi independente de Ca^{2+} (Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000).

1.2.2. Subgrupos de PLA_2 identificados no cérebro de ratos:

No cérebro de ratos *Wistar* machos jovens adultos foi detectado o RNA mensageiro (RNAm) de pelo menos cinco grupos de PLA_2 , que são PLA_2GIIA , PLA_2GIIC , PLA_2GV , PLA_2GIVA e PLA_2GVI (Owada et al., 1994; Molloy et al., 1998; Kishimoto et al., 1999). O RNAm da PLA_2GIIA , PLA_2GIIC , PLA_2GV e PLA_2GVI foi detectado no córtex cerebral, hipocampo, estriado, tálamo, hipotálamo e cerebelo (Molloy et al., 1998). O RNAm da PLA_2GIVA foi detectado no córtex cerebral, hipocampo (regiões CA1, CA2 e CA3, e giro denteado), amígdala, estriado, diversos núcleos talâmicos e hipotalâmicos, cerebelo e bulbo olfatório (Owada et al., 1994; Molloy et al., 1998; Kishimoto et al., 1999).

1.3. Proteína Tau:

A Tau é uma fosfoproteína primariamente neuronal, amplamente encontrada no sistema nervoso central e periférico (Kosik, 1993). Trata-se de uma proteína associada aos microtúbulos, componentes essenciais do citoesqueleto neuronal (FIGURA 5). Em todos os tipos celulares, os

microtúbulos correspondem a uma estrutura dinâmica, fundamental para o processo de divisão celular. Em neurônios pós-mitóticos essa função, evidentemente, se perde e os microtúbulos especializam-se na manutenção da citoarquitetura e no transporte intraneural. Portanto, nos neurônios, além de seu envolvimento na manutenção da estrutura celular e nos processos que envolvem a plasticidade neurítica, os microtúbulos também são essenciais para o transporte axonal de organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático, lisossomos) e de vesículas, nas quais são deslocados neurotransmissores e proteínas do corpo celular para as sinapses distais (Cleveland e Hoffman, 1991). A polaridade neuronal também depende das propriedades dos microtúbulos presentes nos axônios e dendritos. Nos axônios, os microtúbulos encontram-se uniformemente orientados, graças ao papel da proteína Tau.

Nos dendritos proximais e distais, os microtúbulos apresentam orientações diversas e são estabilizados por uma proteína de alto peso molecular com função semelhante á da Tau, denominada tubulina (Mathus et al., 1981; Baas et al., 1989; Goedert et al., 1991). A proteína Tau interage *in vitro* e *in vivo* com as moléculas de α e β -tubulina, constituintes unitários dos microtúbulos, conferindo estabilidade aos seus polímeros (Lindwall e Cole., 1984).

Figura 5. Proteína Tau e estabilização dos microtúbulos, e formação dos emaranhados neurofibrilares. Fonte: Paula VJR, et al. 2009.

Seis isoformas da Tau foram descritas em mamíferos resultantes do *splicing* do RNA, oriundo da transcrição de um único gene localizado na espécie humana no cromossomo 17 (Goedert et al., 1989) (FIGURA 6). Diferem entre si pela existência de três ou quatro domínios de ligação à tubulina, havendo também diferenças menores na extremidade aminoterminal da molécula (Lovestone e Anderton, 1992; Trojanowsky e Lee, 1994; Lovestone e Reynolds, 1997; Shahani e Brandt, 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram que a interação entre Tau e tubulina é um processo dinâmico, em que a proteína Tau promove a sua polimerização e impede a despolimerização rápida de tubulina (Drechsel et al., 1992). Essa função é regulada fundamentalmente por seu estado de fosforilação (FIGURA 6). A Tau tem aproximadamente 79 sítios de fosforilação em resíduos de serina e treonina (Hernandez e Ávila, 2007), que promovem mudanças conformacionais na proteína pela ação de diferentes quinases

(Buée et al., 2000) (FIGURA 7). Nesse processo, grupos fosfato presentes em moléculas de ATP são transferidos enzimaticamente para radicais hidroxilas existentes nos resíduos de serina e treonina da Tau.

Figura 6: As seis diferentes isoformas da proteína Tau com a presença e ausência do exon 10.

Em células não neuronais, a hiperfosforilação da Tau é observada durante a mitose (Preuss et al., 1995). Em neurônios, a capacidade de estabilizar os microtúbulos depende do número e da localização dos resíduos fosforilados na molécula da Tau, sendo a estabilidade dos microtúbulos determinada pelo estado de fosforilação dos epítomos que flanqueiam o domínio de ligação da Tau à tubulina (Lovestone e Reynolds, 1994).

Figura 7: Diferentes sítios de fosforilação da proteína Tau em serina e treonina. Em destaque os sítios de maior importância para desestabilização dos microtubulos.

A proteína Tau hiperfosforilada é normalmente encontrada em neurônios fetais (Brion et al., 1993; Goedert et al., 1993), situação em que o citoesqueleto microtubular modifica-se de forma dinâmica para o crescimento e a diferenciação morfológica dos neurônios. O fenômeno da neuritogênese em culturas de neurônios corticais é acompanhado de hiperfosforilação da Tau (Brion et al., 1994; Johnson e Stoothoff, 2004), estado em que uma estrutura celular menos rígida, ou seja, com certa quantidade de tubulina não polimerizada, são necessárias. Em culturas de células de neuroblastoma humano, onde células neurais indiferenciadas encontram-se em franco processo de mitose, a proteína Tau também se encontra hiperfosforilada (Pope et al., 1994).

No sistema nervoso maduro, predominam as formas pouco fosforiladas da Tau, conferindo ao citoesqueleto a estabilidade necessária para a homeostase neural (Lovestone et al., 1994). Existe um gradiente de

fosforilação ao longo do axônio e em diferentes regiões cerebrais, sendo as porções distais do axônio as menos fosforiladas (Rebhan et al., 1995), particularmente na substância branca (De Ancos e Ávila, 1990). Mudanças do estado de fosforilação da Tau ocorrem no processo de remodelagem do citoesqueleto, situação em que os mecanismos reguladores da fosforilação da Tau tornam-se críticos para promover a plasticidade sináptica (Branblett et al., 1993; Iqbal et al., 1994). A fosforilação anormal da Tau compromete a sua capacidade de ligação à tubulina, instabilizando a estrutura dos microtúbulos (Johnson e Jenkins, 1999; Sanchez et al., 2001). Além disso, a Tau hiperfosforilada compromete o transporte axonal e o metabolismo das sinapses, causando disfunções que resultam em perda de viabilidade celular, colapso do citoesqueleto microtubular e morte neuronal (Johnson e Stoothoff, 2004).

A regulação do estado de fosforilação da Tau é um processo dinâmico e complexo, que envolve a ação de diversas quinases, contrabalançada pela ação das fosfatases. Em células eucarióticas, mais de 99% das proteínas apresentam grupos fosfato em resíduos de serina e treonina. O fosfato é adicionado a estes resíduos covalentes por quinases específicas e removido pelas respectivas fosfatases. Em humanos, 418 genes de proteínas quinase (PK) e somente 15 de proteínas fosfatases (PP) são conhecidos, mecanismo que regula aproximadamente 100.000 fosfoproteínas (Mansuy e Shenolikar, 2006). A fosforilação e defosforilação de sítios de serina e treonina regulam eventos pré - e pós sinápticos em neurônios excitatórios e inibitórios. Nestes sítios, os substratos das fosfatases incluem canais de íons e receptores de

proteína G, onde o tráfego e a organização sináptica são regulados pela fosforilação reversível de proteínas (Mansuy e Shenolikar, 2006).

1.3.1. Proteína Tau e doença de Alzheimer.

Nos tecidos cerebrais de pacientes com DA, a proteína Tau acumula-se intracelularmente em estado hiperfosforilado, na forma de filamentos helicoidais pareados (PHFs). Foram descritos pelo menos 25 sítios fosforilados de forma anormal (Mazanetz e Fisher, 2007), que servem como marcadores das lesões associadas à neurodegeneração (Iqbal et al., 2004). A fosforilação de resíduos de serina e treonina localizados próximos do domínio de ligação da proteína Tau à tubulina favorece a desagregação dos polímeros e a conversão da Tau em PHFs; este processo é mediado, sobretudo pela ação da GSK-3 β , que se encontra hiperativa em tecidos cerebrais de pacientes com DA (Biernat et al., 1992). Os PHFs, por sua vez, formam agregados, dando origem aos emaranhados neurofibrilares (ENFs), marcadores histopatológicos da doença (Johnson e Jenkins, 1999; Sanchez et al., 2001). Pode-se dizer, portanto, que os PHFs e os ENFs correspondem aos resíduos da desintegração do citoesqueleto neuronal que, nos cortes histopatológicos, podem ser reconhecidos como “neurônios-fantasmas” pela coloração com a prata. Além disso, a proporção de formas hiperfosforiladas da Tau em relação à concentração total de Tau no líquido cefalorraquidiano (LCR) distingue os indivíduos portadores de DA dos controles normais, sendo por esta razão considerada como um biomarcador da doença (Blennow, 2004).

Nos tecidos cerebrais de pacientes com DA, foi identificada uma diminuição da expressão de determinadas fosfatases, tais como PP1, PP2A e PP5 (Wang et al., 2007). A maioria dos resíduos de serina e treonina fosforilados na Tau fetal e nos FHP-tau são imediatamente seguidos de prolinas, o que sugere que as Tau-quinases são enzimas da família das *proline-directed kinases* (Vuillet et al., 1992). Entre estas, as *cyclin-dependent kinases* (CDC2, CDK5, TPKII) (Kobayashi et al., 1993), algumas enzimas da família das MAPK e principalmente, a glicogênio sintase-quinase (GSK) (Dreschsel et al., 1992, Hanger et al., 1992). Tais enzimas são capazes de fosforilar a Tau *in vitro* e foram detectadas em estratos celulares de tecido cerebral de indivíduos com DA (Lovestone, 1997). Outras quinases não orientadas por prolina também foram identificadas nos emaranhados neurofibrilares e são importantes para a regulação da fosforilação da tau, modulando a atividade das primeiras. Entre elas, destacam-se a PKC (Anderton et al., 1995), as caseína-quinases I e II (Lovestone e Reynolds, 1997), a cálcio calmodulina-quinase II (CaMPK-II) (Litsky et al., 1996) e proteínoquinase A (PKA).

Portanto, a hiperfosforilação da Tau é o ponto de partida para a perda funcional e o colapso da estrutura microtubular, decorrendo destes a disfunção e morte neuronal, como substratos teciduais da demência (Flament-Durand e Couck, 1995). Em estágios iniciais da DA, a proteína Tau hiperfosforilada pode ser encontrada em neurônios ainda morfologicamente preservados, isto é, antes da formação dos emaranhados neurofibrilares (Braak et al., 1994). A capacidade de formar microtúbulos estáveis é

recuperada com a desfosforilação da Tau (Bramblett et al., 1993). Portanto, o conhecimento dos mecanismos reguladores da fosforilação da Tau torna-se importante não só para a compreensão da patogenia da DA, mas também para futuras estratégias terapêuticas, visando a inibição da hiperfosforilação da Tau na DA e em outras tauopatias (Mazanetz e Fisher, 2007).

1.3.2. Fosfolipase A₂ e doença de Alzheimer:

Alterações do metabolismo da PLA₂ foram identificadas em diversas doenças neuropsiquiátricas. Na DA há indícios de hipoatividade da PLA₂ cerebral e plaquetária, que se correlacionam com um maior número de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, maior atrofia cerebral e maior gravidade clínica da demência (Gattaz et al., 1996). Adicionalmente, foi encontrada uma redução da atividade da PLA₂ citosólica dependente de Ca²⁺ e da PLA₂ independente de Ca²⁺ em homogenatos dos córtices temporal e parietal, e do hipocampo *post mortem* de pacientes com DA (Rossner et al., 1998). Esses achados foram corroborados por estudos realizados em nosso grupo, mostrando uma redução da fluidez de membranas no hipocampo *post-mortem* de pacientes com doença de Alzheimer (Eckert et al., 2000) e através da espectroscopia por ressonância magnética do fósforo (³¹P-MRS), uma redução *in vivo* do metabolismo e da reciclagem de membranas no córtex pré-frontal de pacientes com DA (Forlenza et al., 2005).

O metabolismo da fosfatidilcolina (PC) da membrana contribui para a síntese da acetilcolina. A PC é o substrato natural da PLA₂. Uma redução da

PC mediada pela inibição da PLA₂ resulta em uma redução dos níveis de colina livre, contribuindo para déficits de memória e aprendizado (Schaeffer e Gattaz, 2008). Esse déficit, resultante de uma degeneração de neurônios colinérgicos, é discutido como aspecto central do distúrbio cognitivo na DA, no qual a inibição intracerebral da PLA₂ causou um distúrbio da memória em animais de laboratório (Hölscher e Rose, 1994; Schaeffer e Gattaz, 2005).

Em culturas neuronais, demonstrou-se a participação da PLA₂ na modulação da clivagem da proteína precursora do amilóide (APP), de modo que a inibição da enzima favorece a amiloidogênese e a sua ativação está associada a uma potencialização da clivagem secretória da APP (Emerling et al., 1993; Nitsch et al., 1997), sugerindo que a atividade reduzida da PLA₂ pode contribuir para a produção de β -amilóide, através de uma redução da neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica e, assim, para a formação de placas neuríticas, as quais estão envolvidas na neurodegeneração na DA (Emmerling et al., 1993; Nitsch et al., 1997).

1.3.3. *Fosfolipase A₂ e proteína Tau:*

Há evidências de que o AA participa de processos moduladores do estado de fosforilação da Tau. Em culturas de neurônios cerebelares, mostrou-se que o AA é capaz de induzir o crescimento de neuritos e, em culturas de células de neuroblastoma, de favorecer o crescimento e a diferenciação em neuritos (Williams et al., 1994). Em modelos de neurodegeneração, mostrou-se também que o AA participa da hiperfosforilação da proteína Tau e da sua polimerização em emaranhados

neurofibrilares (Lukiw e Bazan, 2000). O AA, como um segundo mensageiro da sinalização intracelular, tem sido também implicado na indução da potenciação de longa duração (LTP), uma forma de plasticidade sináptica subsequente à estimulação elétrica de fibras excitatórias pré-sinápticas. Esse fenômeno foi observado na região CA1 do hipocampo, em estudo com culturas organotípicas dessa estrutura cerebral (Nishizaki et al., 1999; Fujita et al., 2001) e em neurônios piramidais dissociados do córtex cerebral de ratos (Nishikawa et al., 1994). Diante disso, são de interesse os achados sugerindo que a atividade reduzida da enzima PLA₂, como descrito no hipocampo e córtex cerebral de pacientes com DA (Gattaz et al., 1995; Rossner et al., 1998), pode favorecer mecanismos que conduzem à formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares.

Polímeros de proteína Tau são considerados tóxicos, não somente pela hiperfosforilação e pela perda do potencial para estabilizar os microtúbulos, mas porque acontece uma distribuição anormal da proteína em compartimentos somatodendríticos, restringindo o espaço físico e interferindo em alguns processos como no transporte intracelular de pequenas moléculas (García-Sierra, 2008).

2. OBJETIVOS e HIPÓTESES

Objetivo primário:

(1) Investigar, em culturas primárias de neurônios corticais e hipocampais de embriões de ratos, os efeitos da inibição da PLA₂ sobre a expressão e o estado de fosforilação da proteína Tau; para isso são utilizados inibidores de diferentes subtipos de PLA₂, tais como MAFP, BEL e PACOCF₃,

Hipótese: a inibição da PLA₂ leva a um aumento do estado de fosforilação da Tau em neurônios.

Objetivos secundários:

(2) Estabelecer uma curva de dose-resposta para a atividade da PLA₂ em culturas de neurônios corticais tratados com o inibidor reversível e dual PACOCF₃, a partir da qual serão definidas as concentrações desse fármaco

a serem utilizadas no objetivo acima; para tanto, a atividade da PLA₂ será determinada por meio de ensaio radioenzimático.

(3) Avaliar os efeitos de curto prazo da inibição da PLA₂ (com os fármacos acima) sobre a viabilidade das culturas de neurônios corticais e hipocampusais.

Hipótese: embora a inibição da PLA₂ não resulte em alterações morfológicas perceptíveis por microscopia, tal efeito compromete discretamente a viabilidade neuronal, podendo ser detectado pelo método do MTT.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. *Culturas primárias de neurônios:*

3.1.1. *Obtenção das culturas:*

Culturas de neurônios pós-mitóticos de embriões de ratos foram obtidas segundo protocolo utilizado no nosso grupo (Forlenza et al., 2000). Ratas prenhas (Wistar) fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) foram sacrificadas no 18º dia de gestação, obtendo-se assim os embriões com a idade desejada (E18).

Os animais foram sacrificados por meio de guilhotina. Após a assepsia abdominal com álcool etílico diluído em água (70% v/v), utilizando-se instrumentos e luvas cirúrgicas estéreis, extraiu-se, por laparotomia, o saco uterino contendo seus inúmeros embriões (geralmente de 10 a 16). O mesmo foi então acondicionado em placa de Petri estéril e levado para câmara de fluxo laminar, onde seguiu a dissecação dos tecidos, em ambiente

asséptico. Após a remoção das membranas gestacionais, os fetos obtidos foram submetidos à craniotomia occipitofrontal, sendo os respectivos cérebros então removidos com auxílio de espátula, e acondicionados em placa de Petri estéril (FIGURA 8). Os cérebros foram imersos em solução de meio Neurobasal (Gibco) contendo penicilina e estreptomicina, glutamina 20mM e suplemento B-27 (Gibco) aquecido à 37°C. Devido à grande quantidade de cérebros a serem dissecados, e o tempo necessário para este procedimento, metade dos cérebros foram mantidos em estufa perfundida com CO₂ 5% à 37°C, enquanto procedia-se à dissecação do córtex e hipocampo da outra metade, a fim de preservar a viabilidade dos tecidos dissecados após maior tempo de procedimento.

Figura 8: Obtenção do tecido cerebral de rato. Laparotomia da rata prenha (A), removendo-se o saco uterino (B). Em câmara de fluxo laminar procedeu-se à retirada dos embriões de 18 dias(C), e obtenção dos cérebros embrionários (D).

As etapas de dissecação foram feitas sob lupa de aumento médio (40_x), com o auxílio de instrumentos microcirúrgicos. Desse modo, realizou-se a separação dos hemisférios cerebrais, a remoção das membranas

meníngeas e a dissecação propriamente dita das formações hipocampais (FIGURA 9). Para a obtenção de culturas de neurônios corticais, procedimento mais simples, uma calota de tecido cortical foi removida de cada hemisfério cerebral intacto, seguida da simples remoção das meninges. Os tecidos obtidos foram então reduzidos a fragmentos menores (de aproximadamente 1mm^3), transferidos para o tubo de ensaio, a solução de HBSS foi removida, e foi adicionado solução de tripsina ($0,5\text{mg/ml}$ em HBSS) por 20 minutos em banho-maria a 37°C . Terminada a incubação, os fragmentos de tecido nervoso foram novamente lavados por três vezes em 5ml de solução de Hanks contendo aditivos (HBSS^+), a saber: cloreto de magnésio 8mM ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma), soro eqüino inativado 5% (v/v) (Sigma), tampão de Hepes 10mM (Gibco) e desoxirribonuclease $1\mu\text{g/ml}$ (DNase I).

Figura 9: Dissecação do hemisfério cerebral (A), remoção da meninge (B), remoção da estrutura hipocampal (C) e remoção da meninge do hipocampo (D).

Os fragmentos teciduais foram dissociados por ação hidromecânica em volume de 2-4ml de HBSS⁺. Para tanto, foi utilizado sucessivamente duas pipetas tipo Pasteur de vidro, com os respectivos orifícios de passagem reduzidos por fogo a aproximadamente 1,0 e 0,5mm de diâmetro. A suspensão de células isoladas foi então obtida pela dissociação dos fragmentos teciduais, aspirando-se os mesmos com o auxílio de bulbo de borracha acoplado à extremidade oposta da pipeta, e esgotando o seu conteúdo por repetidas vezes (20 a 30 vezes com cada pipeta), até se obter uma solução turva e homogênea a olho nu.

Para contagem e avaliação da viabilidade celular, foi retirada uma alíquota de 10 μ l dessa suspensão e diluída 20 vezes em solução contendo 90 μ l de HBSS e 100 μ l de corante azul Trypan. Uma alíquota de 10 μ l dessa nova solução foi transferida para hemôcitômetro (câmara de Neubauer), sob lamínula de vidro, e observada em microscópio 100 $\times$ de aumento (Eclipse E200; Nikon), com lente objetiva de 10 aumentos. Foi feita uma estimativa média do número de células não coradas nos quatro campos da câmara de contagem. Cada campo tem área de 1mm² (correspondente ao conjunto de 16 quadrados cujos lados medem 0,25 mm) e dá uma estimativa do número de células em 10⁻⁴ ml de suspensão. Multiplica-se o número (nº) obtido na contagem pelo respectivo fator de diluição (nº x 20 x 10⁻⁴), inferindo-se assim o número aproximado de células viáveis por mililitro da suspensão celular.

Para o preparo dos recipientes de cultura, foram utilizadas placas de Petri (Sarstedt Cell⁺) feitas em poliestireno tratado, estéreis prontas para o uso. Para a sensibilização dos poços de cultura foi utilizada poli-*D*-lisina

(PLL). Dois dias antes da dissecação, foi aplicada solução 5µg/ml de PLL em água deionizada estéril, em volume suficiente para cobrir a superfície de cultura. A solução de PLL foi mantida durante dois dias e removida imediatamente antes da semeadura da suspensão celular.

A suspensão celular foi diluída em meio de crescimento na densidade ideal de 1,0 ou $1,5 \times 10^7$ células/ml, para imediata semeadura nos recipientes de cultura. Utilizando-se placas de Petri, foram despejados 5ml da suspensão celular em cada poço, atingindo-se assim densidade aproximada de $1,5 \times 10^5$ células por cm² de superfície de cultura. O rendimento usual do procedimento é de aproximadamente 500.000 células por hipocampo, ou seja, de 1,0 a $1,5 \times 10^7$ células por animal sacrificado. Apesar da baixa necessidade de oxigênio dos neurônios a sobrevivência das células é função do tempo total do procedimento, que não deve exceder a duas horas, do sacrifício do animal até a semeadura e acondicionamento das culturas na incubadora (FIGURA 10).

As culturas foram mantidas à 37°C em incubadora perfundida com mistura úmida de ar e CO₂ (5%v/v). Como meio de crescimento, foi utilizado o meio Neurobasal acrescido de *L*-glutamina 0,1mM (Gibco 25030-024), antibióticos (solução de penicilina 50 UI/ml e estreptomicina 50µg/ml), e suplemento B-27 (Gibco 17504-036) (1:50 v/v).

Figura 10: Imagens representativas de culturas primárias de neurônios corticais (A) e hipocâmpais (B) de ratos após quatro dias em cultura, sob microscopia óptica de contraste de fase.

Nas primeiras 24 horas em cultura (apenas), o meio de crescimento foi enriquecido de soro fetal bovino (FCS). No segundo dia de incubação, o meio de crescimento foi substituído em sua totalidade por meio de cultura fresco sem FCS. A partir daí, metade do volume de sobrenadante de cada poço de cultura foi trocado a cada 48-72 horas por meio fresco; sempre sem FCS. Neurônios hipocâmpais em baixa densidade tendem a degenerar rapidamente se o meio de crescimento é trocado completamente, uma vez que os fatores secretados pelas células gliais presentes em cultura são necessários para o desenvolvimento e sobrevivência neuronais.

3.1.2. Tratamentos:

O tratamento dos neurônios em cultura foi realizado com diferentes inibidores da PLA₂:

(a) *metil-araquidonil-fluorofosfonato* (MAFP), inibidor irreversível das PLA₂ citosólica Ca²⁺-dependente e Ca²⁺-independente, nas concentrações 5μM, 10μM, 50μM, 100μM e 250μM por 30 minutos;

(b) *bromo-enol-lactona* (BEL), inibidor irreversível da PLA₂ citosólica Ca²⁺-independente, nas concentrações 1μM, 5μM, 10μM e 50μM por 30 minutos;

(c) *palmitoil-trifluorometilcetona* (PACOCF-3), o inibidor reversível das PLA₂ citosólica Ca²⁺-dependente e Ca²⁺-independente, nas concentrações 1μM, 10μM, 50μM e 100μM por 30 minutos.

As concentrações e o tempo dos tratamentos com BEL e MAFP foram baseados em curvas de dose-resposta disponíveis em trabalhos publicados previamente por nosso grupo (Forlenza et al., 2007; Mendes et al., 2005; Shaeffer et al., 2005). Para o tratamento com PACOCF-3, foi estabelecida uma nova curva dose-resposta para inibição da atividade da PLA₂.

Foram preparadas diferentes soluções contendo os inibidores da PLA₂, diluídos em meio de cultura, em concentrações duas vezes maiores do que as desejadas. Os tratamentos foram iniciados após a troca correspondente a metade do volume do meio de cultura de cada placa, adicionando-se então as soluções contendo os inibidores, para perfazerem assim as concentrações de trabalho desejadas. Para as condições-controle, foi realizada a troca da metade do volume do meio de cultura, como de

rotina, sendo repostado o meio de cultura fresco com o veículo utilizado para a diluição dos respectivos inibidores.

3.1.3. *Determinação da viabilidade celular:*

Para avaliar os efeitos da inibição da PLA₂ sobre a viabilidade das culturas, utilizou-se o método do MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O MTT é um sal tetrazólico solúvel em água que produz uma coloração amarelada quando preparado em soluções salinas na ausência de fenol vermelho. O MTT é convertido em um precipitado insolúvel da cor violeta, por meio da clivagem dos anéis tetrazólicos pelas desidrogenases mitocondriais. Essas enzimas ativas em células vivas convertem a solução amarelada em um precipitado insolúvel violeta; células mortas ou inviáveis, porém, não fazem essa conversão. O precipitado, insolúvel em água, pode ser solubilizado em isopropanol ou dodecil-sulfato de sódio (SDS), medindo-se então a absorbância da nova solução em 570nm.

Baseado no método descrito por Mosmann (1983) e Tada et al. (1986), foi adicionado 20µl de solução estoque de MTT (5mg/ml em PBS) em cada poço de uma placa de 96 wells contendo 1.0×10^7 células/ml por well e incubadas por três horas a 37°C e CO₂ 5%. Em seguida foram adicionados 200µl de solução de SDS 10% em 0,01N HCL. Após 18 horas de incubação, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placas em 570nm. Os ensaios foram feitos em quintuplicata, e os valores obtidos foram calculados em relação à condição controle (100%).

3.2. Métodos de análise:

3.2.1. Obtenção de extratos celulares:

Ao término de cada tempo de tratamento, foi removido e descartado o sobrenadante e feita uma breve lavagem das células aderidas às placas, com PBS (Phosphato Buffer Saline) gelado, a saber - NaCl 120mM, Na₂HPO₄ 15,3mM, KH₂PO₄ 1,46mM, KCL 1,98mM pH= 7,4, 2ml de PBS por placa, para a subsequente recuperação do conteúdo protéico intracelular. Para cada condição experimental, foram utilizados:

a) Seis placas de cultura (por condição de tratamento) para determinação do método radioenzimático. As placas foram raspadas, reunidas e resuspendidas em 800µl de Tris 5mM, uma alíquota de 20µL foi armazenada para determinação de proteínas totais (método de Lowry) a partir desta leitura foram diluídas, se necessário, para 1,5mg de proteínas por ml para ensaio radioenzimático, as amostras foram armazenadas em freezer -70°C;

b) Três placas (por condição de tratamento) para determinação da proteína Tau pelo método de *Western-blotting*, as placas eram reunidas e resuspendidas em 1mL de tampão MES-NaCL, a saber- Mes 100mM, MgCl₂6H₂O 0,5mM, EGTA 1mM, NaCl 1M pH=6,5, mais inibidores de proteases e fosfatases (1,4-dimercapto-2,3-butanodiol 2mM (DTT), fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM (PMSF), ortovanadato de sódio 0,1mM (Na₃VO₄) e fluoreto de sódio 1M (NAF), para preservar o estado de fosforilação da Tau alcançado ao término de cada tratamento. Na sequência as amostras foram aquecidas à 100°C por 5 minutos, centrifugadas brevemente e o

sobrenadante transferido para outro tubo tipo eppendorf. Considerando que existe uma inativação dos inibidores de protease e fosfatase quando aquecidos o protocolo foi adaptado para o tampão de lise RIPA (radio-immunoprecipitation assay), (50mM Tris HCL, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate e 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS). RIPA é um eficiente tampão que permite uma lise celular rápida de cultura de células de mamíferos aderentes e células em suspensão, extraindo proteínas de membrana, proteínas nucleares e proteínas citoplasmáticas. RIPA minimiza ligações inespecíficas de proteínas, apresentando um baixo background, permitindo estudos específicos de purificação de proteínas, imunoensaios e ensaios de proteínas.

As amostras foram armazenadas em freezer -70°C para posterior diluição em tampão de amostra (Laemmli) quatro vezes concentrado à base de solução aquosa de tris- a saber- 240mM pH6.8; dodecil sulfato de sódio (SDS) (Gibco) 0,8% (m/v); glicerol (Gibco) 40% (v/v); 2-mercaptoetanol (Sigma) 200mM e azul de bromofenol (Sigma) 0,02% (m/v).

3.2.2. *Determinação de proteínas totais:*

O ensaio Bio-Rad DC (Detergent compatible) Protein Assay é um ensaio colorimétrico para a determinação da concentração de proteínas com base no ensaio de Lowry (Lowry et al., 1951), mas que foi modificado para ser compatível com detergentes. O ensaio consiste na reação de proteínas com uma solução alcalina de tartarato de cobre (Reagente A) e com reagente de Folin (1,2-naphthquinone-4-sulfonate) (Reagente B). Como no

ensaio de Lowry, há dois passos que levam ao desenvolvimento da cor: a reação entre proteínas e o cobre em um meio alcalino, e a subsequente ligação do reagente de Folin às proteínas tratadas com cobre (Lowry et al 1951). Quando o reagente de Folin liga-se a essas proteínas, ele é reduzido pela perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio, e muda a cor do amarelo para azul característico, cuja absorbância pode ser lida utilizando um comprimento de onda entre 405 e 750nm (Peterson, 1979). Para a determinação das proteínas totais, foi utilizada uma curva padrão de proteínas utilizando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* ou BSA; Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (em temperatura ambiente), onde foi pipetado 25 µL do Reagente A, 5 µL do padrão de proteínas de BSA nas seis diferentes concentrações ou 5 µL das amostras ou branco (tris-sacarose) e 200 µL do Reagente B. Após incubação de 15 min em temperatura ambiente em um Agitador de placas (Wallac- PerkinElmer, Boston, MA), as absorbâncias das amostras foram lidas em um Leitor de microplacas (Spectracount; Packard, Meriden, CT) a 680 nm. Todas as determinações dos níveis de proteínas foram realizadas em triplicatas.

3.2.3. *Eletroforese em gel e Western Blot:*

As amostras e respectivos controles foram utilizados para carregar os géis de poliacrilamida-SDS, confeccionados no dia da corrida eletroforética. Os géis foram produzidos adicionando-se, em dH₂O, soluções

semi-prontas de (a) acrilamida 30% (m/v) +bisacrilamida 0,8% (m/v); (b) tris-HCL 1,5M = SDS 0,384% (m/v) pH 8,8; (c) tris-Hcl 0,5M+SDS 0,4% (m/v) pH 6,8; (d) per-sulfato de amônio (APS) 10% (m/v); e (e) N, N, N', N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED). Para a eletroforese dos géis de poliacrilamida, foi utilizado o sistema de mini-géis verticais Mini-Protean III (Bio-Rad). Foram selecionados marcadores de peso molecular da faixa condizentes ao da proteína estudada (20 – 70 KDa).

Os géis de poliacrilamida foram carregados com 20µg de proteínas de neurônios corticais e 15µg de proteínas de neurônios hipocampus. Durante a eletroforese (FIGURA 11) o sistema imerso em tampão de corrida (*running buffer*) constituído por solução aquosa de tris 25mM pH 8,6; glicina 192mM; e SDS 1% (m/v).

FIGURA 11. Eletroforese de proteínas para separação por peso molecular em gel de poliacrilamida 12%(fonte: <http://visiscience.com/scienceslides.php>).

A membrana de nitrocelulose (de tamanho pouco superior ao dos géis), as folhas de papel-filtro e as *fiber pads* (Bio-Rad) são imersas em tampão de equilíbrio constituído por solução aquosa de tris 25mM pH 8,6; glicina 192mM e Metanol 20% (v/v) por pelo menos 30 minutos, antes da transferência em cuba (Bio-Rad), por 120 minutos a 200mA.

3.2.4. *Imunoblotting*:

A técnica de *imunoblotting* destina-se à detecção, por meio de anticorpos específicos, das proteínas contidas em um preparado experimental. A técnica permite, a partir da transferência do conteúdo protéico do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, onde ocorre a reação entre os anticorpos que se ligam aos antígenos presentes na membrana (FIGURA 12).

A utilização de anticorpos específicos (geralmente IgGs, mas também IgMs) contra a proteína que se pretende identificar. A proteína em questão funciona assim como antígeno. Há inúmeros anticorpos disponíveis comercialmente. Os anticorpos monoclonais são mais específicos do que os policlonais, por ligarem apenas uma região do antígeno/proteína que nos interessa estudar. Como os policlonais ligam diversas regiões há a possibilidade de poderem reconhecer outras proteínas, com regiões semelhantes, dando origem a sinais inespecíficos. Por outro lado, o sinal obtido com anticorpos monoclonais é, também por isso, muitas vezes mais fraco do que o obtido com policlonais equivalentes, uma vez que, neste último caso, vários anticorpos podem reconhecer/ligar a mesma proteína (em diferentes regiões). Deve, pois, realizarem-se ensaios prévios para determinar o anticorpo mais adequado a um dado estudo, bem como as concentrações e o tempo de incubação ideal. Como o anticorpo primário não é marcado e a sua presença/localização não pode ser detectado diretamente, o sistema de detecção empregado em *Western Blot* consiste no

uso de um segundo anticorpo marcado que se liga ao primeiro. O anticorpo que reconhece o antígeno denomina-se anticorpo primário, enquanto o que contém o marcador e reconhece o anticorpo primário se denomina anticorpo secundário.

Figura 12: Transferência da proteína do gel de acrilamida para membrana de nitrocelulose por carga e reação da membrana de nitrocelulose com anticorpo primário, anticorpo secundário e um reagente quimioluminescente para gerar luz e velar o filme fotográfico.(apostila chemicon international 2º edição)

Após a transferência, as membranas são bloqueadas com solução de TBS-Tween 0,2%, com 5% de leite desnatado; os períodos de bloqueio são variáveis, dependendo do anticorpo utilizado. Adiciona-se o anticorpo primário (TABELA 1), cujo tempo de incubação varia de acordo com o substrato (Tau total, fosforilada e não fosforilada) e a afinidade dos anticorpos (TABELA 2).

Tabela1: Anticorpos utilizados para detecção dos diferentes sítios de fosforilação da proteína Tau em neurônios corticais e hipocampusais.

<i>Anticorpo</i>	<i>Especificação</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>
Anti-Tau 410	<i>Anticorpo monoclonal específico para o segmento C-terminal da Tau</i>	55 / 65
Fosfo-Ser202/205 (AT-8)	<i>Anticorpo monoclonal específico para Tau fosforilada Serina 202/205</i>	58,1
Fosfo-Ser396	<i>Anticorpo monoclonal específico para Tau fosforilada em Serina 396</i>	62 / 79
Fosfo-Ser214	<i>Anticorpo policlonal específico para Tau fosforilada em Serina 214</i>	62
Fosfo-Thr181	<i>Anticorpo policlonal específico para Tau fosforilada em Treonina 181</i>	47
Fosfo-Ser199/202	<i>Anticorpo policlonal específico para Tau não fosforilada em Serina 199/202</i>	45 / 68

Após cada incubação com anticorpos, as membranas foram lavadas com TBS-tween 0,2%. Quando o anticorpo secundário não for conjugado à peroxidase, será feita uma terceira incubação da membrana com um composto conjugado de horseradish-peroxidase, para que a detecção do complexo antígeno-anticorpo possa ser feita mediante reação de quimioluminescência amplificada (ECL).

Tabela 2: Diluição e tempo de incubação dos anticorpos utilizados para detecção da proteína Tau em neurônios corticais e hipocampusais.

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tempo de incubação</i>
Anti-Tau 410	1: 2.000	<i>overnight</i>
Fosfo-Ser202/205 (AT-8)	1:200	<i>overnight</i>
Fosfo-Ser396	1: 2.000	<i>overnight</i>
Fosfo-Ser214	1: 2.000	<i>overnight</i>
Fosfo-Thr181	1: 500	<i>overnight</i>
Fosfo-Ser199/202	1: 1.000	1 hora

3.2.5. *Reação de quimioluminescência amplificada (ECL):*

O sistema ECL permite a detecção, através de autorradiografia, de um sinal luminoso originado a partir de reação de quimioluminescência. Este sinal, gerado a partir do encontro da substância marcadora contida no anticorpo terciário ou marcador com reagente químicos, é capaz de velar um filme de raio-X em pontos discretos, que correspondem à localização dos anticorpos primários.

Em câmara escura, foi adicionado o ECL nas membranas de nitrocelulose, que foram colocadas em contato com o filme fotográfico, por tempos variados, de acordo com a necessidade de captação de luz no filme.

Os filmes de autorradiografia foram então revelados em solução reveladora, lavados em água corrente e lavados, novamente, em solução fixadora, ambas por 1 minuto. A análise semi-quantitativa desta reação foi feita por densitometria, utilizando-se um transluminador (*Alpha Innotech Corporation*), sendo os valores obtidos para as condições-controle aferidos em 100%, e os demais pontos do experimento comparados a esta medida.

3.3. Curva de inibição da PLA₂ com PACOCF3:

3.3.1. Tratamentos:

Culturas neuronais foram tratadas com diferentes doses do inibidor da PLA₂, PACOCF3, que é um inibidor reversível da PLA₂GIV e PLA₂GVI, diluídos em DMSO: salina 50%.

Foram preparadas diferentes soluções contendo o inibidor PACOCF3, diluídos em meio de cultura, em concentrações duas vezes maiores do que as desejadas. Os tratamentos foram iniciados após a troca correspondente a metade do volume do meio de cultura de cada placa, adicionando-se então as soluções contendo o inibidor, para perfazerem assim as concentrações de trabalho desejadas. Para as condições-controle, foi realizada a troca da metade do volume do meio de cultura, como de rotina, sendo repostado o meio de cultura fresco com o veículo utilizado para a diluição do respectivo inibidor.

3.3.2 Determinação da atividade da PLA₂ por ensaio radioenzimático:

Para determinação da atividade da PLA₂ foi utilizado como substrato da enzima o L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcado com [1-¹⁴C] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1-¹⁴C-PC). De acordo com esse ensaio, o [1-¹⁴C] ácido araquidônico, ligado à posição *sn*-2 da fosfatidilcolina, é especificamente clivado pela PLA₂ e extraído. A radioatividade [1-¹⁴C] ácida araquidônico liberado é medida em um contador de cintilação líquida e utilizada para calcular a atividade da PLA₂. Para o ensaio da PLA₂, o substrato araquidonil-1-¹⁴C-PC foi diluído 1:10 (v/v) em uma solução de 140 mg/ml de antioxidante BHT (*butylated hydroxytoluene*; Sigma-Aldrich) em tolueno-etanol. Antes da reação enzimática, a mistura de araquidonil-1-¹⁴C-PC e BHT-tolueno-etanol foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio (0,06 mCi por amostra) em temperatura ambiente, ressuspenida em uma solução de 5 mg/ml de BSA em água bidestilada, gelada (150 ml por amostra), e homogeneizada com um sonificador ultrasônico. As amostras do ensaio da PLA₂ continham 50 ml de tampão TRIS 1M. Após um período de incubação de 1 hora a 37°C, a reação enzimática nas amostras foi parada pela adição de uma mistura de ácido clorídrico e isopropanol (FIGURA13).

Figura 13. Mecanismo de formação de vesículas lipídicas – Lipossomas: finas camadas lipídicas são hidratadas formando pilhas da bicamada lipídica fluida e inchadas. Durante a agitação, formam-se, então, as grandes vesículas multilamelares (GVM), as quais permitem interação da água com os hidratos de carbono centrais da bicamada. Uma vez formadas, a redução do tamanho dessas partículas requer energia, ou na forma de energia ultrasônica (sonicação) formando as vesículas unilamelares pequenas (VUP), ou energia mecânica (extrusão). Fonte: www.avantilipids.com/PreparationOfLipossomes.html

As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente. O [1-¹⁴C] ácido araquidônico liberado foi extraído pela adição de 700 ml de n-heptano por agitação, seguido de centrifugação. Após uma segunda centrifugação, a fase superior das amostras foi transferida para tubos contendo líquido de cintilação. Finalmente, a radioatividade do [1-¹⁴C] ácido araquidônico liberado foi medida em um contador de cintilação líquida, em contagens por minuto. Essa medida será utilizada para calcular a atividade da PLA₂, que é expressa em picomoles por miligrama de proteína por minuto.

3.4. Determinação da viabilidade celular segundo o método do MTT:

Para avaliar os efeitos da inibição da PLA2 sobre a viabilidade das culturas, utilizou-se o método do MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O MTT é um sal tetrazólico solúvel em água que produz uma coloração amarelada quando preparado em soluções salinas na ausência de fenol vermelho. O MTT é convertido em um precipitado insolúvel da cor violeta, por meio da clivagem dos anéis tetrazólicos pelas desidrogenases mitocondriais. Essas enzimas ativas em células vivas convertem a solução amarelada em um precipitado insolúvel violeta; células mortas ou inviáveis, porém, não fazem essa conversão. O precipitado, insolúvel em água, pode ser solubilizado em isopropanol ou dodecil-sulfato de sódio (SDS), medindo-se então a absorbância da nova solução em 570nm.

Baseado no método descrito por Mosmann (1983) e Tada et al. (1986), foram adicionados 20µl de solução estoque de MTT (5mg/ml em PBS) em cada poço de uma placa de 96 wells contendo 1.0×10^7 células/ml por well e incubadas por três horas a 37°C e CO₂ 5%. Em seguida foram adicionados 200µl de solução de SDS10% em 0,01N HCL. Após 18 horas de incubação, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placas em 570nm. Os ensaios foram feitos em triplicata, e os valores obtidos foram calculados em relação à condição controle (100%).

4. RESULTADOS

4.1. *Curva de inibição da PLA₂ com PACOCF3:*

Foi realizada a análise da atividade da PLA₂ total em neurônios corticais, no quarto dia em cultura, com o inibidor dual PACOCF3. A atividade da enzima foi inibida, em média, em até 70% nos tratamentos realizados com concentrações de 100µM do inibidor, em relação à condição controle (FIGURA 14).

Estes resultados, juntamente com os dados das curvas de inibição da PLA₂ com MAFP e BEL, previamente publicados por nosso grupo (Mendes et al., 2005), foram necessários para se estabelecerem as concentrações desses inibidores a serem utilizadas nos ensaios principais deste estudo, i.e., os efeitos da inibição da PLA₂ sobre o estado de fosforilação da Tau em neurônios. Foi utilizado o *T test independent* para análise estatística das amostras.

Figura 14. Efeitos de diferentes doses do PACOCF₃ (PA) sobre a atividade da PLA₂ em neurônios corticais. A atividade da PLA₂ está representada em picomoles por miligrama de proteína por minuto (pM/mg.min) em relação a condição controle. **p=<0.01; ***p=<0.05.

4.1.1. Efeitos da inibição da PLA₂ sobre a viabilidade neuronal:

Culturas de neurônios tratadas durante 30 minutos com os inibidores MAFP, BEL ou PACOCF₃ foram avaliadas quanto à viabilidade celular, segundo o método do MTT. As amostras foram feitas em quintuplicata, em placa de 96 poços de cultura, com neurônios corticais e hipocampais (FIGURAS 15,16 e 17). Os resultados sugerem que existe uma discreta perda de viabilidade neuronal com os tratamentos com os diferentes inibidores da PLA₂, tanto em neurônios corticais como hipocampais. Este efeito é mais proeminente com as doses mais altas de MAFP e BEL; porém, também foi observado com doses menores de PACOCF₃.

Figura 15. Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de MAFP, durante 30 minutos. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.05$.

Figura 16. Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de BEL, durante 30 minutos. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.05$.

Figura 17. Estudo de viabilidade celular, segundo o método MTT, em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com diferentes doses de PACOCF₃, durante 30 minutos. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

4.2. Controle interno do Blotting com Actina

Como controle interno da quantidade de proteínas totais as membranas, com os respectivos tratamentos (MAFP, BEL e PACOCF₃), (FIGURAS 18, 19 e 20) foram reagidas com o anticorpo primário anti-actina (Sigma). Os valores densitométricos dos tratamentos ficaram todos próximos às condições controles.

FIGURA 18: Valores densitométricos, das culturas tratadas com MAFP, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.

FIGURA 19: Valores densitométricos, das culturas tratadas com BEL, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.

FIGURA 20: Valores densitométricos, das culturas tratadas com PACOCF3, do anticorpo anti-actina para controle de padrão interno.

4.3. Efeitos da inibição da PLA₂ sobre a fosforilação da Tau:

Os efeitos da inibição da PLA₂ com MAFP, BEL e PACOCF3 sobre a expressão e/ou estado de fosforilação da proteína Tau em neurônios corticais e hipocampais, segundo a reatividade aos diferentes anticorpos

primários, encontram-se nas FIGURAS 21 a 37. Os gráficos representam as médias dos valores das densitométricos das bandas reativas em relação à condição controle, definida como 100%. Para cada experimento foi estabelecida uma condição controle independente. Os valores numéricos das densitometrias de cada experimento realizado para avaliar os efeitos nos diferentes fosfoepitopos são apresentados nas Tabelas 4 a 30 que se encontra no anexo.

4.3.1. *Inibição da PLA₂ com MAFP:*

A reatividade ao anticorpo Anti-Tau410, dirigido contra o segmento carboxiterminal da proteína, revela que não houve alteração da expressão total da Tau nas culturas de neurônios corticais tratadas com diferentes concentrações de MAFP. Nas culturas de neurônios hipocâmpais, observou-se diminuição da ordem de 20-25% da reatividade a esse anticorpo, o que sugere redução da expressão da Tau nesse modelo experimental (FIGURA 21).

Figura 21. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratadas com MAFP nas condições: controle, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.05$.

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser396, dirigido contra o resíduo fosforilado de serina 396 da proteína Tau, revela que não houve um padrão de alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas tratadas com MAFP (FIGURA 22).

Figura 22. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo S396, obtidos com cultura de neurônios corticais e hipocampais tratados com MAFP nas condições: controle, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M. *** $p < 0.05$.

A reatividade ao anticorpo AT-8, dirigido contra os resíduos fosforilados de serina 202 e 205 da proteína Tau, revela que não houve um

padrão de alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com MAFP (FIGURA 23).

Figura 23. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo AT-8, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com MAFP nas condições: controle, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M. **p<0.01.

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214, dirigido contra o resíduo fosforilado de serina 214 da proteína Tau, revela um aumento dose dependente do grau de fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, sobretudo nas culturas de neurônios hipocampais tratadas com MAFP (FIGURA 24).

Figura 24. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratados com MAFP nas condições: controle, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.05$.

Foi avaliada a reatividade ao anticorpo Tau-1, que reconhece os resíduos não-fosforilados de Serina 199 e 202 da proteína Tau. A análise desses resultados sugere uma redução da reatividade nesses fosfoepitopos, o que sugere aumento da fosforilação da Tau. (FIGURA 25).

Figura 25. Representação gráfica dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (fosfo-Ser199/202), obtidos em cultura de neurônios corticais tratadas com MAFP nas condições: controle, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M. *** $p < 0.05$.

4.3.2. Inibição da PLA₂ com BEL:

A reatividade ao anticorpo Anti-Tau410, dirigido contra o segmento carboxiterminal da proteína, revela que não houve uma alteração consistente da expressão total da Tau nas culturas de neurônios corticais tratadas com diferentes concentrações de BEL. Nas culturas de neurônios hipocampais, observou-se diminuição da ordem de 20% da reatividade a esse anticorpo apenas nas concentrações mais elevadas do inibidor da PLA₂ (FIGURA 26).

Figura 26. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL nas condições: controle, 1µM, 5µM, 10µM e 50µM. *p<0.001; **p<0.01.

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser396, dirigido contra o resíduo fosforilado de serina 396 da proteína Tau, revela que não houve alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL (FIGURA 27).

Figura 27. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo S396, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M. *** p < 0.05.

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214, dirigido contra o resíduo fosforilado de serina 214 da proteína Tau, revela que não houve alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL (FIGURA 28).

Figura 28. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser214, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M. * p < 0.001; *** p < 0.05.

A análise da reatividade ao anticorpo Tau-1, que reconhece os resíduos não-fosforilados de Serina 199 e 202 da proteína Tau, também sugere que a inibição da PLA₂ com BEL não resulta em alterações do grau de fosforilação da Tau nesses fosfoepitopos. (FIGURA 29).

Figura 29. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (S199/202), obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1µM, 5µM, 10µM e 50µM. **p<0.01; ***p<0.05.

A reatividade ao anticorpo fosfo-s202/205 dirigido contra o resíduo fosforilado de serina 202/205 da proteína Tau, revela aumento discreto da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL (FIGURA 30).

Figura 30. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser202/205, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M. ** $p < 0.01$.

A reatividade ao anticorpo fosfo-T181 dirigido contra o resíduo fosforilado de treonina 181 da proteína Tau, revela que não houve hiperfosforilação significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL (FIGURA 31).

Figura 31. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo T181, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

4.3.3. Inibição da PLA₂ com PACOCF3:

A reatividade ao anticorpo Anti-Tau410,, revela que houve uma diminuição da expressão total da Tau nas culturas de neurônios corticais tratadas com diferentes concentrações de PACOCF3. Nas culturas de neurônios hipocampais, observou-se aumento da ordem de 20% da reatividade a esse anticorpo (FIGURA 32).

Figura 32. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo C-terminal, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL nas condições: controle, 1µM, 5µM, 10µM e 50µM. **p<0.01.

A análise da reatividade ao anticorpo Tau-1, que reconhece os resíduos não-fosforilados de Serina 199 e 202 da proteína Tau, também sugere que a inibição da PLA₂ com PACOCF3 não resulta em alterações do grau de fosforilação da Tau nesses fosfoepitopos. (FIGURA 33).

Figura 33. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Tau-1 (S199/202), obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF-3, nas condições: controle, 1μM, 5μM, 10μM e 50μM. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser396, sugere diminuição da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com doses mais elevadas (10, 50 e 100μM) de PACOCF3 (FIGURA 34).

Figura 34. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser396, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF₃, nas condições: controle, 1μM, 10μM, 50μM e 100μM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.05$.

A reatividade ao anticorpo AT-8, dirigido contra os resíduos fosforilados de serina 202 e 205 da proteína Tau, revela que não houve alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF3 (FIGURA 35).

Figura 35. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo AT-8, obtidos em cultura de neurônios corticais e hipocampais tratadas com PACOCF3, nas condições: controle, 1 μM, 10 μM, 50 μM e 100 μM. **p<0.01

A reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214 em dois experimentos com culturas de neurônios hipocampais revela que o tratamento com PACOCF3 não resultou em alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo (FIGURA 36).

Figura 36. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo Ser214, obtidos em culturas de neurônios hipocampais tratadas com PACOCF₃, nas condições: controle, 1µM, 10µM, 50µM e 100µM. **p<0.01; ***p<0.05.

A reatividade ao anticorpo fosfo-T181 dirigido contra o resíduo fosforilado de treonina 181 da proteína Tau, revela que não houve alteração significativa da fosforilação da Tau nesse fosfoepitopo, nas culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL (FIGURA 37).

Figura 37. Representação gráfica da média dos valores densitométricos da reatividade ao anticorpo T181, obtidos em culturas de neurônios corticais e hipocampais tratadas com BEL, nas condições: controle, 1µM, 5µM, 10µM e 50µM.***p<0.05.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o interesse de investigar os efeitos da inibição da atividade da PLA₂ sobre a fosforilação da Tau em culturas de neurônios. Seguindo linha de pesquisa em desenvolvimento em nosso grupo nos últimos anos, tanto para modelos *in vitro* como também em experimentos animais, foram utilizados diferentes inibidores da PLA₂, com o objetivo de estabelecer qual forma dessa enzima é predominantemente responsável pelos efeitos.

Como ainda não dispúnhamos de uma curva de inibição da PLA₂ com o inibidor reversível dual PACOCF₃, ao contrário dos demais inibidores MAFP e BEL, cujas curvas de inibição foram publicadas por Mendes e colaboradores (2005), experimentos iniciais foram dedicados a este objetivo secundário. Os resultados mostram uma diminuição dose-dependente da atividade da PLA₂ nas culturas de neurônios corticais tratadas com PACOCF₃, nas concentrações de 1μM, 10μM, 50μM e 100μM.

Da mesma forma, já foram produzidas evidências de que a inibição persistente das PLA₂ citosólicas dependente e independente de cálcio (estudos com MAFP e BEL) compromete o desenvolvimento de culturas jovens e reduz a viabilidade das culturas maduras de neurônios corticais e hipocampais. Esses efeitos mostraram-se associados, respectivamente, à redução da neuritogênese e à perda de ramificações neuríticas, sobretudo em neurônios hipocampais e mediante a inibição da iPLA₂ com BEL (Forlenza et al., 2008). Sendo essas alterações da homeostase possivelmente relacionadas às alterações da citoarquitetura neuronal, o que nos remete à regulação do estado de fosforilação da proteína Tau, o presente trabalho procurou, num primeiro momento, avaliar se a inibição das diferentes formas de PLA₂ em neurônios por períodos menores de tempo poderia, igualmente, resultar em perda de viabilidade celular. De fato, os nossos resultados sugerem, conforme esperado, que já existe uma discreta perda de viabilidade neuronal com apenas 30 minutos de incubação com os diferentes inibidores da PLA₂, tanto em neurônios corticais como hipocampais. Este efeito é mais proeminente com as doses mais altas, sabidamente neurotóxicas, de MAFP e BEL; porém, também foi observado com doses menores de PACOCF₃. Não obstante essa perda de viabilidade neuronal, mensurável pelo método do MTT, não foram identificadas, ao longo de todos os ensaios deste estudo, alterações significativas da morfologia das culturas. Concluímos então que o modelo escolhido poderia ser considerado adequado e válido para o estudo de eventuais alterações do

grau de fosforilação da Tau mediante a inibição da PLA₂ com os diferentes compostos.

Todavia, embora os fármacos utilizados neste estudo sejam aqueles mais aceitos como referência de inibição da enzima, é importante ressaltar que os inibidores da PLA₂ são fármacos relativamente inespecíficos, isto é, podem agir em outras vias de sinalização que não a PLA₂ em si, ou inibir a enzima por diferentes mecanismos, tais como: incorporando-se na membrana e provocando alterações das suas propriedades físicoquímicas; interagindo diretamente com o sítio ativo da enzima; atuando sobre um outro sítio (alostérico) da PLA₂, o que acarreta mudanças em sua atividade; ou atuando como detergente, induzindo mudanças inespecíficas nas propriedades da membrana (Farooqui 1999). Isso nos obriga a adotar uma atitude cautelosa antes de generalizar os achados atuais.

A inibição da cPLA₂ e iPLA₂ pelo inibidor dual MAFP não resultou em modificações significantes da expressão total da Tau em neurônios corticais, segundo demonstrou a reatividade ao anticorpo direcionado ao domínio carboxiterminal dessa proteína (o que permite o reconhecimento de formas fosforiladas e não-fosforiladas da Tau); contudo, um efeito distinto desse foi observado em culturas de neurônios hipocampais, em que houve diminuição de aproximadamente 20-25% da reatividade a esse anticorpo, sugerindo redução da expressão da Tau nesse modelo. Esse efeito não parece ser decorrente da simples perda neuronal (i.e., pelos efeitos neurotóxicos da inibição da PLA₂), uma vez que o material biológico utilizado para carregar os géis de poliacrilamida, para as corridas eletroforéticas e,

subseqüentemente, para os *immunoblots*, foi corrigido segundo a quantidade de proteínas totais existentes em cada alíquota. Assim, pode-se dizer que a quantidade de Tau total relativa às demais proteínas existentes no sistema alterou-se com os tratamentos com MAFP e PACOCF₃. Esse efeito não foi observado com BEL, o que sugere uma ação dependente da inibição da cPLA₂, e não da iPLA₂.

Outro achado que nos parece relevante é o da hiperfosforilação da Tau em neurônios hipocampais mediante inibição da PLA₂ com MAFP. Esse efeito, que foi observado no mesmo modelo experimental daquele que permitiu a constatação do efeito anterior, pôde ser detectado apesar da *diminuição* da expressão da Tau em neurônios hipocampais tratados com MAFP. Em outras palavras, apesar de haver, em relação aos controles, um conteúdo menor de Tau total nessas alíquotas, foi possível detectar um aumento do grau de fosforilação dessa proteína. Esse efeito pode mostrar-se ainda mais proeminente se for feita a correção da reatividade ao anticorpo fosfo-Ser214 pela reatividade relativa (em relação ao controle) ao anticorpo C-terminal.

Quanto aos demais fosfoepitopos da Tau, podemos tecer algumas considerações que podem ser relevantes à compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da DA. Observamos que a inibição da PLA₂ não interfere significativamente no grau de fosforilação de nenhum fosfoepitopo na mesma magnitude do efeito observado sobre o resíduo de serina 214. Evidências consolidadas mostram que os fosfoepitopos serina 199, 202, 205 e 396, além de treonina 181 são fortemente dependentes da atividade

fosforilativa da enzima GSK3B. Assim, os nossos achados sugerem que a PLA₂ modula a fosforilação da Tau por um mecanismo independente de GSK3B.

Na investigação dos mecanismos fisiopatológicos da DA, os epitopos treonina 212 e serina 214 têm recebido atenção especial, por serem encontrados em estado hiperfosforilado nos filamentos helicoidais pareados. A fosforilação do resíduo serina 214 é de particular importância, porque induz a desestabilização dos microtúbulos, por reduzir a afinidade da Tau com os monômeros de α - e β -tubulina (Reding et al., 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que o resíduo de treonina 212 é fosforilado primariamente por GSK3B, enquanto serina 214 depende da ação de duas quinases, a PKA e Akt. A PKA está envolvida em vários processos celulares, como modulação de outras proteinoquinases, regulação das concentrações intracelulares de cálcio e regulação da transcrição (Murray et al., 2008), e é regulada igualmente pelo AA, o principal metabolito de cPLA₂. Outras quinases moduladas pelo AA são PKC (Farooqui et al., 1997; Yoshida et al., 2007) cálcio calmodulina quinase II (Yoshida et al., 2007). Os dados atuais mostram que os mecanismos alternativos, independentes de GSK3B, correlacionam a atividade anormal da PLA₂ ao aumento da fosforilação Tau nos neurônios. Sob esta hipótese, a atividade PLA₂ intracerebral reduzida em DA (Gattaz et al., 1995) contribui para a hiperfosforilação da Tau, acentuando a desestabilização dos microtúbulos e o colapso do citoesqueleto. Podemos dizer que a PLA₂ modula a fosforilação da Tau em Ser-214, através de um caminho independente da sinalização da atividade

da GSK3B. Nos próximos estudos que pretendemos realizar, investigaremos a cascata de transdução de sinais que une a atividade da PLA₂ à fosforilação da proteína Tau. Esta linha de pesquisa terá continuidade no novo projeto temático submetido pelo LIM-27 à FAPESP no início de agosto deste ano (Processo 09/52825-8).

6. CONCLUSÕES

(1) Em neurônios hipocampais, a inibição da PLA₂ com MAFP levou a um aumento do estado de fosforilação da proteína Tau no resíduo de serina 214, sendo esse efeito associado a uma discreta redução da expressão protéica.

(2) Os demais fosfoepitopos estudados (serina 199, 202, 205, 396 e treonina 181) não foram alterados de forma significativa pela inibição da PLA₂.

(3) A inibição da PLA₂ resultou em discreta redução da viabilidade neuronal, na ausência de alterações morfológicas perceptíveis por microscopia óptica.

(4) O conhecimento dos mecanismos reguladores da fosforilação da Tau é importante não só para a compreensão dos mecanismos patogênicos da DA, mas também para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas, visando à inibição da hiperfosforilação da Tau.

7. Anexos

7.1. Resultados individuais das densitometrias nas culturas primárias de neurônios corticais e hipocampais.

7.2. Resultados individuais das culturas tratadas com MAFP:

Tabela 3: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo C-terminal.

C-terminal							
Cortex	Controle		5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	250 μ M
Exp. 1	11520	100%	11520	11520	13824	13824	9216
Exp. 2	157320	100%	144210	131100	131100	131100	150765
Exp. 3	193800	100%	201552	174420	178296	228684	209304
Exp. 4	51350	100%	75050	82950	71100	55300	55300
Exp. 5	60750	100%	64800	36450	40500	52650	40500
Hipocampo	Controle		5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	250 μ M
Exp. 1	119658	100%	126910	112406	101528	119658	123284
Exp. 2	280140	100%	276138	200100	180090	184092	124062
Exp. 3	11720	100%	11420	11024	13824	9216	11720
Exp. 4	277140	100%	197100	177090	184092	129062	277140
Exp. 5	124658	100%	117406	111528	126658	129284	124658

Tabela 4: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Tau-1.

TAU-1							
Cortex	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	35244	100%	19580	27412	33286	29370	19580
Exp. 2	91287	100%	91287	83349	99225	79380	95256
Exp. 3	155709	100%	86505	98039	103806	144175	46136
Exp. 4	112896	100%	116928	124992	116928	108864	88704
Exp. 5	84800	100%	63600	67840	63600	67840	38160
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	67450	100%	56800	56800	53250	63900	60350
Exp. 2	35244	100%	19580	27412	33286	29370	19580
Exp. 3	129168	100%	73008	84240	89856	84240	117936
Exp. 4	39528	100%	46116	26352	32940	39528	49410
Exp. 5	19528	100%	56116	37352	44940	45528	54410

Tabela 5: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser 396.

Ser 396							
Cortex	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>250μM</i>
Exp. 1	55200	100%	30912	26496	41952	35328	17664
Exp. 2	55104	100%	47232	35424	35424	47232	43296
Exp. 3	105616	100%	101844	109388	98072	101844	98072
Exp. 4	57600	100%	48000	41600	32000	32000	28800
Exp. 5	118584	100%	93879	108702	98820	108702	83997
Exp. 6	25536	100%	25536	41496	38304	47880	47880
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>	<i>250μM</i>
Exp. 1	278616	100%	197964	161304	201630	216294	186966
Exp. 2	20328	100%	16940	30492	16940	16940	13552
Exp. 3	31980	100%	40508	55432	49036	55432	46904
Exp. 4	167480	100%	135880	113760	97960	104280	129560
Exp. 5	167480	100%	135880	113760	97960	104280	129560

Tabela 6: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser214.

Ser214							
Cortex	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	521074	100%	478661	412012	399894	436248	315068
Exp. 2	329175	100%	560175	490875	288750	404250	259875
Exp. 3	31920	100%	31920	25536	35112	28728	22344
Exp. 4	83616	100%	78390	94068	57486	52260	26130
Exp. 5	240084	100%	344736	344736	338580	357048	221616
Exp. 6	52200	100%	73080	68904	56376	52200	31320
Exp. 7	258230	100%	283220	316540	291550	258230	233240
Exp. 8	281951	100%	373749	354078	360635	399977	222938
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	13280	100%	21248	21248	13280	15936	13280
Exp. 2	47616	100%	74400	104160	136896	142848	178560
Exp. 3	145665	100%	156455	215800	188825	129480	102505
Exp. 4	7735	100%	7735	9282	9282	7735	7735
Exp. 5	61200	100%	91800	165240	140760	67320	97920
Exp. 6	233454	100%	185484	150306	185484	201474	175890
Exp. 7	98728	100%	126936	105780	112832	98728	105780
Exp. 8	13280	100%	21248	21248	13280	15936	13280

Tabela 7: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo AT-8.

AT-8							
Cortex	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	38766	100%	37275	20874	41748	22365	25347
Exp. 2	37884	100%	32472	37884	37884	37884	48708
Exp. 3	249600	100%	229632	169728	199680	179712	159744
Exp. 4	218178	100%	161262	142290	180234	161262	104346
Exp. 5	501020	100%	464360	525460	464360	378820	415480
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	48416	100%	42364	60520	48416	42364	72624
Exp. 2	18000	100%	15750	24750	13500	15750	22500
Exp. 3	34749	100%	48114	88209	56133	34749	42768
Exp. 4	37422	100%	40824	37422	32319	22113	23814
Exp. 5	38522	100%	41924	38622	33319	23413	23914

Tabela 8: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo T-181.

T-181							
Cortex	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	55200	100%	30912	26496	41952	35328	17664
Exp. 2	55104	100%	47232	35424	35424	47232	43296
Exp. 3	105616	100%	101844	109388	98072	101844	98072
Exp. 4	57600	100%	48000	41600	32000	32000	28800
Exp. 5	118584	100%	93879	108702	98820	108702	83997
Exp. 6	25536	100%	25536	41496	38304	47880	47880
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>	<i>250µM</i>
Exp. 1	278616	100%	197964	161304	201630	216294	186966
Exp. 2	20328	100%	16940	30492	16940	16940	13552
Exp. 3	31980	100%	40508	55432	49036	55432	46904
Exp. 4	45240	100%	95004	70122	74646	81432	70122
Exp. 5	59926	100%	55195	56772	56772	53618	53618

7.3. Resultados individuais das culturas tratadas com BEL:

Tabela 9: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epítipo C-terminal.

C-terminal						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	24332	100%	17696	24332	30968	15484
Exp. 2	14168	100%	8855	10626	8855	12397
Exp. 3	113120	100%	129280	213312	180992	151904
Exp. 4	126882	100%	120840	96672	96672	90630
Exp. 5	54000	100%	66000	90000	102000	90000
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	52624	100%	52624	52624	38272	47840
Exp. 2	168683	100%	183039	240463	150738	147149
Exp. 3	13566	100%	13566	13566	13566	11628
Exp. 4	59296	100%	66708	66708	59296	59296
Exp. 5	22272	100%	30624	30624	22272	33408
Exp. 6	11628	100%	13566	11628	11628	9690
Exp. 7	379488	100%	385152	430464	339840	351168

Tabela 10: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Tau-1.

Tau-1						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	76760	100%	84840	80800	117160	84840
Exp. 2	76368	100%	76368	89096	76368	101824
Exp. 3	344736	100%	412452	283176	369360	289332
Exp. 4	220990	100%	183260	194040	296450	344960
Exp. 5	240240	100%	320320	245245	350350	135135
Exp. 6	344736	100%	412452	283176	369360	289332
Exp. 7	220990	100%	183260	194040	296450	344960
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	10332	100%	17220	13776	10332	10332
Exp. 2	171216	100%	171216	171216	133168	142680
Exp. 3	74496	100%	62080	80704	62080	55872
Exp. 4	70200	100%	70200	70200	70200	70200
Exp. 5	60332	100%	67220	63776	60332	60332

Tabela 11: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser396.

Ser396						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	39760	100%	37275	37275	29820	52185
Exp. 2	175584	100%	190216	175584	168268	109740
Exp. 3	87780	100%	52668	79002	87780	87780
Exp. 4	52800	100%	62400	38400	48000	48000
Exp. 5	265125	100%	290375	252500	265125	265125
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	168912	100%	79764	201756	164220	192372
Exp. 2	25806	100%	25806	21114	25806	18768
Exp. 3	198288	100%	212976	205632	183600	242352
Exp. 4	175525	100%	196588	182546	189567	133399
Exp. 5	139104	100%	168084	144900	81144	23184
Exp. 6	207552	100%	181608	188094	155664	233496
Exp. 7	168636	100%	168636	146640	146640	161304

Tabela 12: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser214

Ser214						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	198246	100%	970362	1398156	1053834	1053834
Exp. 2	48546	100%	75516	53940	53940	59334
Exp. 3	35100	100%	35100	35100	35100	35100
Exp. 4	268464	100%	251328	205632	239904	314160
Exp. 5	167452	100%	151429	110632	140904	117160
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	1034880	100%	1112496	1177176	1280664	1228920
Exp. 2	518700	100%	539448	539448	560196	712348
Exp. 3	48576	100%	36432	54648	66792	60720
Exp. 4	154812	100%	154812	147440	147440	184300
Exp. 5	62496	100%	70308	62496	31248	54684
Exp. 6	168636	100%	168636	146640	146640	161304

Tabela 13: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo T181.

AT-8						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	208650	100%	240750	321000	288900	401250
Exp. 2	555489	100%	627165	519651	537570	537570
Exp. 3	582120	100%	449064	515592	482328	465696
Exp. 4	423360	100%	524160	504000	504000	604800
Exp. 5	534658	100%	581150	488166	511412	488166
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	179928	100%	189924	189924	199920	199920
Exp. 2	275724	100%	239760	227772	263736	179820
Exp. 3	17784	100%	16416	19152	35568	21888
Exp. 4	24480	100%	21600	20160	15840	14400
Exp. 5	44030	100%	22015	37740	50320	28305

Tabela 14: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo T181.

T181						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>50μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>
Exp. 1	208650	100%	240750	321000	288900	401250
Exp. 2	555489	100%	627165	519651	537570	537570
Exp. 3	582120	100%	449064	515592	482328	465696
Exp. 4	423360	100%	524160	504000	504000	604800
Exp. 5	534658	100%	581150	488166	511412	488166
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>5μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	59696	100%	46904	72488	63960	68224
Exp. 2	83740	100%	66992	92114	108862	83740
Exp. 3	83740	100%	66992	92114	108862	83740
Exp. 4	59696	100%	46904	72488	63960	68224
Exp. 5	83740	100%	66992	92114	108862	83740

7.4. Resultados individuais dos valores densitométricos das culturas tratadas com PACOCF3:

Tabela 15: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo C-terminal.

C-terminal						
Cortex	Controle		1 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
Exp. 1	32955	100%	12675	20280	32955	20280
Exp. 2	80408	100%	50784	46552	67712	59248
Exp. 3	35631	100%	31672	47508	31672	47508
Exp. 4	47970	100%	36900	36900	36900	29520
Exp. 5	60409	100%	30784	29552	47692	40248
Hipocampo	Controle		1 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
Exp. 1	63820	100%	82960	83940	63860	63700
Exp. 2	31416	100%	26180	39270	34034	41888
Exp. 3	63800	100%	82940	82940	63800	63800
Exp. 4	51420	100%	56178	49279	54044	61838
Exp. 5	59450	100%	61178	50270	64041	71038

Tabela 16: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Tau-1.

Tau-1						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	41580	100%	45360	49140	45360	45360
Exp. 2	42336	100%	42336	31752	50274	44982
Exp. 3	104784	100%	104784	78588	82954	96052
Exp. 4	117882	100%	100418	113516	109150	130980
Exp. 5	17850	100%	15300	14025	16575	14025
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	54912	100%	38016	46464	38016	59136
Exp. 2	64636	100%	59664	69608	54692	59664
Exp. 3	16416	100%	13680	12312	13680	24624
Exp. 4	34944	100%	32256	34944	36288	38976
Exp. 5	44616	100%	49660	51601	34698	29604

Tabela 17: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser396.

Ser396						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	268320	100%	268320	277264	304096	295152
Exp. 2	232557	100%	238520	232557	256409	149075
Exp. 3	201438	100%	79515	159030	217341	148428
Exp. 4	3540	100%	3540	5900	4720	3540
Exp. 5	192647	100%	192647	205933	192647	199290
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	279669	100%	315524	294011	186446	186446
Exp. 2	49082	100%	53544	98164	133860	102626
Exp. 3	240870	100%	240870	234360	214830	201810
Exp. 4	196630	100%	179776	129214	95506	117978
Exp. 5	166950	100%	166950	159530	111300	107590

Tabela 18: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo Ser214.

Ser214						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	189691	100%	157799	153789	162992	152124
Exp. 2	26130	100%	38324	29614	27872	57486
Exp. 3	188598	100%	157896	153510	162282	149124
Exp. 4	26166	100%	38400	30610	29971	67476
Exp. 5	198535	100%	166806	163522	172200	160124
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>1μM</i>	<i>10μM</i>	<i>50μM</i>	<i>100μM</i>
Exp. 1	128340	100%	162564	196788	192510	171120
Exp. 2	374000	100%	224400	351560	374000	336600
Exp. 3	65600	100%	72160	72160	78720	65600
Exp. 4	52456	100%	52456	78684	59013	78684
Exp. 5	101616	100%	122786	118552	88914	118552

Tabela 19: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epítipo AT-8.

AT-8					
Cortex	<i>Controle</i>	<i>1µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>
Exp. 1	208650	240750	321000	288900	401250
Exp. 2	555489	627165	519651	537570	537570
Exp. 3	582120	449064	515592	482328	465696
Exp. 4	423360	524160	504000	504000	604800
Exp. 5	534658	581150	488166	511412	488166
Hipocampo	<i>Controle</i>	<i>1µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>
Exp. 1	179928	189924	189924	199920	199920
Exp. 2	275724	239760	227772	263736	179820
Exp. 3	55440	77616	73920	48048	51744
Exp. 4	179928	189924	189924	199920	199920
Exp. 5	275724	239760	227772	263736	179820

Tabela 20: Descrição das amostras envolvidas e resultados dos valores densitométricos do Western Blot para proteína Tau no epitopo T181.

T181						
Cortex	<i>Controle</i>		<i>1µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>
Exp. 1	73332	100%	86427	75951	78570	68094
Exp. 2	55440	100%	77616	73920	48048	51744
Exp. 3	65452	100%	82316	83911	57002	59799
Exp. 4	63692	100%	70998	64944	67525	60099
Exp. 5	75260	100%	95426	93931	689778	71753
Hipocampo	<i>Controle</i>		<i>1µM</i>	<i>10µM</i>	<i>50µM</i>	<i>100µM</i>
Exp. 1	99456	100%	132608	107744	74592	91168
Exp. 2	149520	100%	143290	168210	137060	174440
Exp. 3	39360	100%	29520	22140	36900	51660
Exp. 4	38070	100%	40608	38070	58374	71064
Exp. 5	29450	100%	49600	40300	34100	41850

7. ASPECTOS ÉTICOS

A aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP foi obtida antes do início dos estudos descritos neste plano, que se insere no Projeto Temático FAPESP 2002/13633-7, intitulado “Metabolismo de fosfolípidos em doenças neuropsiquiátricas”, de autoria de Wagner F. Gattaz, Emmanuel Dias-Neto, Orestes V. Forlenza e Renato Anghinah”. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas de São Paulo. O manuseio e o sacrifício de animais foram conduzidos segundo os princípios estabelecidos em “Guide for the care and use of laboratory animals” (ISBN 0-309-05377-3), National Institute Health (NIH publication No. 86-23, revised 1985).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Baas, P.W.; Black, M.M.; Banker, G.A.; Changes in microtubule polarity orientation during development of hippocampal neurons in culture, J. Cell Biol. 1989; 109: 385-394.
2. Balsinde, J.; Shinohara, H.; Lefkowitz, L.J.; Johnson, C.A.; Balboa, M.A.; Dennis E.A. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. Biol Chem. 1999; 10; 274:25967-70.
3. Bazan, N.G.; Visioli, F.; Rihn, L.L.; Rodriguez T.E.B.; Kreisman, N.R Free fatty acid and diacylglycerol accumulation in the rat brain during recurrent seizures is related to cortical oxygenation. J Neurochem. 1993; 61:1835-42.
4. Biernat, J.; Manderlkow, E.M.; Schroter, C.; Lichtenberg-Kraag, B.; Steiner, B.; Berling, B.; Meyer, H.; Merckern, M.; Vandermeeren, A.; Goedert, M.; The switch of Tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. EMBO J. 1992; 11: 1593-7.

5. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*. 2004; 1:213-25. Review.
6. Braak H.; Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Act Neuropathol*. 1991; 82: 239-59.
7. Braak, E.; Braak H.; MANDELKOW, E.-M. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*. 1994; 87: 554-64.
8. Branblett, G.T.; Goedert, M.; Jakes, R.; Merrik, S.E.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Abnormal Tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*. 1993;10: 1089-99.
9. Brion, J.P.; Smith, C.; Couck, A.-M.; Gallo, J.-M.; Aderton, B.H. Developmental changes in δ phosphorylation: fetal δ is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1993, 61: 2071-80.
10. Brion, J.P.; Octave, O.N.; Couck, A.M. Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein Tau in developing cortical neurons. *Neuroscience*, 1994; 62: 895-909.
11. Buée, L., Bussiére, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, PR.; Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders *Brain. Rev. Brain Res*. 2000;33: 95-130.
12. Cleveland, D.W.; Hoffman, P.N. Neuronal and glial cytoskeletons. *Curr. Opin. Neurobiol*. 1991; 1: 346-353.

13. Davies, D.C.; Horwood, N.; Isaacs, S.L.; Mann, D.M.A. The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields in the hippocampal formation. *Acta Neurol.* 1992; 83: 510-17.
14. De Ancos, J.G.; Avila, J. Differential distribution in white matter and grey matter of tau phosphorylation containing four tubulin-binding motifs. *Biochem. J.* 1990; 64.
15. Diniz, B.S.O.; Pinto Jr., J.A.; Forlenza, O.V.; Do CSF total Tau, phospho-Tau, and β -amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature. *World J Biol Psychiatry* 2007 (in press).
16. Drechsel, D.N.; Hyman, A.A.; Cobb, M.H.; Kirschner, M.W. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell.* 1992; 3:1141-54.
17. Eckert, G.P.; Cairns, N.J.; Maras, A.; Gattaz, W.F.; Muller, W.E. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2000, 4: 181-6.
18. Engelhard, E.; Brucki, S.M., Cavalcanti, J.L., Forlenza, O.V., Laks, J., Vale, F.A.; Treatment of Alzheimer's disease: recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology *Arq Neuropsiquiatr.* 2005; 63: 1104-12.
19. Farooqui, A.A.; Ong, W.Y.; Horrocks, L.A.; Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res.* 2004; 1961-77. Review.

20. Fenton, TR, Geggie, JH, Warners, JN, Tough, SC. Nutrition Services in Canadian Neonatal Intensive Care: The Role of the Dietitian. *Can J Diet Pract Res.* 2000;61:172-175
21. Flament-Durand, J.; Heinonen, O.; Soininen, H.; Sorvari, H.; Kosunen, O.; Paljärvi, L.; Koivisto, E.; Riekkinen Sr. P.J. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1995; 64: 375-84.
22. Forlenza, O.V., Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F.; The role of phospholipase A2 in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2007; 114: 231-8.
23. Fujita, S.; Ikegaya, Y.; Nishikawa, M.; Nishiyama, N.; Matsuki N.; Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol.* 2001; 7: 1417-22.
24. García-Sierra, F.; Mondragón-Rodríguez, S.; Basurto-Islas, G. Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;14:401-9.
25. Gattaz, W.F.; Maras, A.; Cairns, N.J.; Levy, R.; Forst, L.H. Decreased phospholipaseA2 activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry.* 1995; 1: 13-7.
26. Gattaz, W.F.; Cairns, N.J.; Levy, R.; Forstl, H.; Braus, D.F.; Maras, A. Decrease phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatric Clin. Neurosci.* 1996; 246: 129-31.

27. Goedert, M., Crowther, R.A.; Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and their relevance for the study of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1989; 9: 405-6.
28. Goedert, M.; Crowther, R.A; Garner, C.C. molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci*. 1991;14:193-9.
29. Goedert, M.; Spillantini, M.G. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006: 777-81. Review
30. Hanahan, D.J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem*. 1986; 55:483-509.
31. Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. 2004 Feb 11;23(3):483-8. Epub 2004 Jan 29.
32. Heinonen, O.; Soininen, H.; Sorvari, H.; Kosunen, O.; Paljarvi, L.; Koivisto, E.; Riekkinen Sr. P.J. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1995; 64: 375-84.
33. Hernández, F., Avila, J.; Tauopathies. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 2219-2233.
34. Hof, P.R.; Bierer, L.M.; Perl, D.P.; Delacourte, A.; Buée, L.; Bouras, C.; Morrison, J.H. Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in an 82-year-old patient with preclinical signs of dementia: regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques, *Arch. Neurol*. 1992; 49: 946-53.

35. Hwang, T.C.; Guggino, S.E.; Guggino, W.B. Direct modulation of secretory chloride channels by arachidonic and other cis unsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 5706-9.
36. Iqbal, K.; Swaab, D.F.; Winblad, B.; Wisniewski, H.M. *Alzheimer's disease and related disorders: etiology, pathogenesis and therapeutics.* London, John Wiley & Sons Ltd; 1994; 199: 741-5.
37. Iqbal, K., Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X., Khatoon, S., Li B, Liu, F., Rahman, A., Tanimuk, H., Grundke-Iqbal, I.; Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 13: 198-210.
38. Johnson, G.V.; Jenkins, S.M.; Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* 1999; 1:307-28.
39. Johnson, G.V., Stoothoff, W.H.; Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci.* 2004; 117: 5721-9.
40. Kim, D.; Clapham, D.E. Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science.* 1989; 244: 1174-6.
41. Kishimoto, K.; Matsumura, K.; Kataoka, Y.; Morii, H.; Watanabe, Y. Localization of cytosolic phospholipase A2 messenger RNA mainly in neurons in the rat brain. *Neuroscience.* 1999;3: 1061-77.
42. Kosik, K.S. The molecular and cellular biology of tau. *Brain. Path.* 1993; 3:39-43.
43. Kudo, I.; Murakami, M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 268-69:3-58. Review.

44. Larsson, K.; Tornling, G.; Gavhed, D.; Müller-Suur, C.; Palmberg, L.
Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects. *Eur Respir J.* 1998; 16(8):893-9.
45. Lautens, L.L.; Chiou, X.G.; Sharp, J.D.; Young, W.S.; Sprague, D.L.; Ross, L.S.; Felder, C.C. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) distribution in murine brain and functional studies indicate that cPLA2 does not participate in muscarinic receptor-mediated signaling in neurons. *Brain Res.* 1998; 809:18-30.
46. Lovestone, S.; Anderton, B. Cytoskeletal abnormalities in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 1992; 5: 883-8.
47. Lovestone, S.; Reynolds, C.H.; Latimer, D.; Davis, D.R.; Anderton, B.H.; Gallo, J.M.; Hanger, D.; Mulot, S.; Marquardt, B.; Stabel, S.; Woodgett, J.R.; Miller, C.C., J. Alzheimer's disease like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr. Biol.* 1994; 4: 1077-86.
48. Lovestone, S.; Hartley, C.L.; Pearce, J.; Anderton, B.H. The phosphorylation of Tau: a critical stage in neurodevelopmental and neurodegenerative processes. *Neuroscience.* 1997; 78: 309-24.
49. Lukiw, W.J.; Bazan, N.G. Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2000 ;25:1173-84.
50. Mansuy, I.M.; Shenolikar, S. Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci.* 2006 ;29:679-86.

51. Maurer, K.; VolK, S.; Gerbaldo, H.; Auguste D.: Premier patiente du Docteur Alzheimer. Dès archives retrouvées par hasard révèlent lès symptômes de la maladie. *La Recherche*; 1997; 303: 58-60.
52. Mazanetz, M.P., Fischer, P.M.; Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6: 464-79.
53. Mendes, C.T., Gattaz, W.F., Schaeffer, E.L, Forlenza, O.V.; Modulation of phospholipase A2 activity in primary cultures of rat cortical neurons. *J Neural Transm.* 2005; 112: 1297-308.
54. Miller, B.; Santaris, M.; Traynelis, S.F.; Attwell, D. Potentiattion of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature.* 1992; 335: 722-5.
55. Molloy, G.Y, Rattray M, Williams RJ. Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neurosci Lett.* 1998; 139-42.
56. Murray, A.J. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal.* 2008: 3:4.
57. Nalefski, E.A.; Falke, J.J. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 1996; ;5:2375-90.
58. Nalefski, E.A.; Falke, J.J. Location of the membrane-docking face on the Ca²⁺-activated C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *Biochemistry.* 1998; 22;37(51):17642-50.
59. Nishizaki, T.; Nomura, T.; Matsuoka, T.; Tsujishita. Y. Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;2: 446-9.

60. Nishikawa M, Kimura S, Akaike N. Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurones of rat cerebral cortex. *J Physiol.* 1994;1: 83-93.
61. Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein Kinase C. *Science.* 1992; 258: 107-14.
62. Owada, Y.; Tominaga, T.; Yoshimoto, T.; Kondo, H. Molecular cloning of rat cDNA for cytosolic phospholipase A₂ and the increased gene expression in the dentate gyrus following transient forebrain ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; 25:364-8.
63. Paula, V.J.R.; Schaeffer, E.L.; Talib, L.L.; Gattaz, W.F.; Forlenza, O.V. Inhibition of phospholipase A₂ increased Tau phosphorylation at Ser 214 in embryonic rat hippocampal neurons. *PLEFA.* 2004;
64. Pickard, A.S.; Johnson, J.A.; Farris, K.B. The impact of pharmacist interventions on health-related quality of life. *Ann Pharmacother.* 1999 ; 33(11):1167-72.
65. Piomelli, D. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 ;5:274-80. Review
66. Preuss, U.; Doring, F.; Illenberger, S.; Mandelkow, E.M. Cell cycle dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into Chinese hamster ovary cell. *Mol. Biol. Cell.* 1995; 6: 1397-1410.
67. Rebhan, M., Vacun, G., Rösner, H.; Complementary distribution of tau proteins in different phosphorylation states within growing axons. *Neuroreport.* 1995; 6: 429-32.

68. Ksiezak-Reding, H.; Pyo, H.K.; Feinstein, B.; Pasinetti, G.M. Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 20;1639:159-68.
69. Rossner, S.; Ueberham, U.; Schliebs, R.; Peres-Polo, J.R.; Bigl, V. The regulation of amyloid precursors protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Progr. Neurobiol.* 1998; 54:1-69.
70. Sala, M.A., Matheus, M., Valeri, V.; A new stereological method for estimating the thickness of a cellular layer on random sections. *Mikroskopie*. 1981;38: 127-30.
71. Sanches, D.B., Steiner, A.A., Branco, L.G.; Involvement of neuronal nitric oxide synthase in restraint stress-induced fever in rats. *Physiol Behav.* 2001; 75: 261-6.
72. Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005 Feb;62(2):192-5.
73. Selkoe DJ; Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med.* 2004 Apr 20;140(8):627-38.
74. Shahani, N., Brandt, R.; Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 39: 1668-80.
75. Schaeffer, E.L.; Gattaz, W.F. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; 198(1):1-27.
76. Schaeffer, E.L.; Gattaz, W.F. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;181:392-400.

77. Sheff, S.W.; Price, D.A. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *An. Neurol.* 1993; 33: 190-9.
78. Song, S.; Zhao, K.; Lin, Z.; Zhou, Y. Refined structure of basic phospholipase A2 from venom of *Agkistrodon halys* Pallas in orthorhombic crystal form I at 0.25 nm resolution. *Sci China C Life Sci.* 1999; 42(1):80-9.
79. Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. In: Dawbarn, D.; Allen, S.J.; The kinase connection ed. *Neurobiology of Alzheimer's disease.* *Am. J. Pathol.* 1994; 144: 449-53.
80. Underwood, K.W.; Song, C.; Kriz, R.W.; Chang, X.J.; Knopf, J.L.; Lin, L.L. A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is renylated and contains homology to cPLA2. *J Biol Chem.* 1998; 34:926-32.
81. Williams, E. J; Walsh, F. S.; Doherty, P. The production of aradonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth simulkated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J Neurochem.* 1994; 3: 1231-4.