



Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Envolvimento de agregados do peptídeo
 β -amilóide na excitotoxicidade mediada por
glutamato e D-serina: Implicações para a
doença de Alzheimer**

Jordano de Brito Moreira da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jordano de Brito
Moreira da Silva

Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na
excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina:
Implicações para a doença de Alzheimer

UFRJ

Jordano de Brito Moreira da Silva

Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina: Implicações para a doença de Alzheimer

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)

Orientador: Prof. Sérgio Teixeira Ferreira
Co-orientador: Prof. Rogério Panizzutti

Rio de Janeiro
2009

Ficha Catalográfica

de Brito Moreira da Silva, Jordano.

Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina: Implicações para a doença de Alzheimer – Jordano de Brito Moreira da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2009.

73 fl.: 10 Il.

Orientador: Sérgio Teixeira Ferreira

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 55

I. Doença de Alzheimer. 2. Peptídeo beta-amilóide 3. Excitotoxicidade. 4. Glutamato. 5. D-serina. 6. Serina racemase

II. Ferreira, Sérgio Teixeira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

Jordano de Brito Moreira da Silva

Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina: Implicações para a doença de Alzheimer

Rio de Janeiro, 27 de março de 2009

Sérgio Teixeira Ferreira

(Orientador, Professor titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Rogério Arena Panizzutti

(Co-orientador, Professor adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

Patrícia Franca Gardino

(Professora adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Mariana Souza da Silveira

(Professora adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Wagner Seixas da Silva

(Professor adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Ricardo Augusto de Melo Reis

(Revisor, Professor adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Jean Christophe Houzel

(Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

Marcos Henrique Ferreira Sorgine

(Professor adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

Agradeço

Aos meus pais, à minha família;

Ao Professor Sérgio Ferreira;

Ao Professor Rogério Panizzutti e à Dra. Andréa Paula-Lima;

Ao Leo Freitas e ao Dr. Adriano Sebollela, o “4º Orientador”;

Aos irmãos Fábio e Theresa;

Aos grandes amigos Renato, Leandro e Ana Paula;

À segunda família Charles, Vivian e Caroline;

A todos os membros do LDN e do IBqM;

Às tantas pessoas com quem tanto aprendi: cheguei até aqui e irei ainda mais longe porque vocês estiveram comigo.

“A ciência não pode nos dizer o que é certo ou errado. Não podemos achar regras para viver uma vida boa ou regras para uma boa orientação da sociedade, escritas no livro da natureza. (...) Onde a moral e os valores estão envolvidos, não há respostas certas a serem encontradas em livros. Temos que crescer, decidir em que tipo de sociedade queremos viver e meditar sobre os problemas pragmáticos difíceis de serem resolvidos.”

Richard Dawkins: “*What’s wrong with cloning?*” (1998)

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Sérgio T. Ferreira e co-orientação do Professor Rogério A. Panizzutti, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

RESUMO

BRITO-MOREIRA, Jordano. Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina: Implicações para a doença de Alzheimer. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo acúmulo progressivo de agregados neurotóxicos do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) no cérebro dos indivíduos afetados. A neurotoxicidade dos agregados de $A\beta$ vem sendo relacionada à ativação exacerbada dos receptores NMDA (NMDARs) e à excitotoxicidade, cujos mecanismos ainda não são inteiramente compreendidos. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos de oligômeros solúveis de $A\beta$ (conhecidos como ADDLs) e fibrilas amilóides sobre o acúmulo extracelular de glutamato e D-serina, respectivamente agonista e co-agonista dos NMDARs, em culturas neuronais hipocámpais primárias. As concentrações extracelulares de glutamato e D-serina foram determinadas no meio condicionado por culturas neuronais de hipocampo de rato após quatro horas de incubação na ausência ou presença de ADDLs (500 nM) ou $A\beta$ fibrilar (5 μ M). Não se observou morte celular nestas condições. A adição de ADDLs aumentou os níveis extracelulares de glutamato em 48 ± 14 % e os níveis extracelulares de D-serina em 12 ± 4 %. A presença de $A\beta$ fibrilar aumentou a concentração extracelular de glutamato em 55 ± 12 % e de D-serina em 41 ± 16 %. Tanto o bloqueio dos NMDARs (com MK-801 10 μ M) como a inibição da propagação dos potenciais de ação (com tetrodotoxina 0,3 μ M) preveniram o aumento nos níveis extracelulares de glutamato e D-serina induzido por ADDLs e fibrilas de $A\beta$. De maneira interessante, a taurina (um agonista dos receptores $GABA_A$) também bloqueou o acúmulo de aminoácidos excitatórios no meio. Estes resultados indicam que oligômeros e fibrilas de $A\beta$ induzem acúmulo extracelular de glutamato e D-serina em culturas hipocámpais por mecanismos que envolvem atividade neuronal. A expressão em neurônios de serina racemase, enzima responsável pela síntese de D-serina, em culturas hipocámpais expostas a ADDLs ou $A\beta$ fibrilar não foi alterada, de acordo com quantificação por *Western blot*. O aumento no nível de D-serina extracelular parece estar relacionado à elevação da atividade da serina racemase neuronal induzida por $A\beta$, já que não há aumento na sua expressão. O acúmulo extracelular dos aminoácidos excitatórios glutamato e D-serina pode estar relacionado à neurotoxicidade dependente de NMDARs na DA.

ABSTRACT

BRITO-MOREIRA, Jordano. Envolvimento de agregados do peptídeo β -amilóide na excitotoxicidade mediada por glutamato e D-serina: Implicações para a doença de Alzheimer. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive accumulation of neurotoxic beta-amyloid peptide ($A\beta$) aggregates in the brains of affected individuals. The neurotoxicity of $A\beta$ aggregates has been related to the over activation of NMDA-type glutamate receptors (NMDARs) and excitotoxicity by mechanisms that are not yet fully elucidated. In this study, we investigated the effects of soluble $A\beta$ oligomers (also known as ADDLs) and amyloid fibrils on the extracellular accumulation of glutamate and D-serine, respectively an agonist and a co-agonist of NMDARs, in primary hippocampal neuronal cultures. Extracellular glutamate and D-serine concentrations were determined in the media of neuron-enriched cultures of rat hippocampus after four hours of incubation in the absence or in the presence of ADDLs (500 nM) or $A\beta$ fibrils (5 μ M). No cell death was observed in these conditions. ADDLs increased extracellular glutamate levels by 48 ± 14 % and extracellular D-serine levels by 12 ± 4 %. $A\beta$ fibrils increased extracellular glutamate by 55 ± 12 % and extracellular D-serine by 41 ± 16 %. Blockade of NMDARs (with 10 μ M MK-801) and inhibition of the propagation of action potentials (by 0.3 μ M tetrodotoxin) both prevented the increase in extracellular glutamate and D-serine instigated by ADDLs and $A\beta$ fibrils. Interestingly, taurine (a GABA_A receptor agonist) also blocked ADDLs- and fibril-induced accumulation of excitatory amino acids (EAAs) in the medium. These results indicate that ADDLs and $A\beta$ fibrils induce extracellular accumulation of glutamate and D-serine in hippocampal cultures by neuronal activity-dependent mechanisms. The expression of neuronal serine racemase, the enzyme responsible for D-serine synthesis, in hippocampal cultures exposed to oligomeric and fibrillar $A\beta$ was unchanged, as determined by Western blot. Thus, the increase in D-serine levels may be related to $A\beta$ -induced elevation of neuronal serine racemase activity, since there is no increase in its expression. $A\beta$ -induced extracellular accumulation of the EAAs glutamate and D-serine may be related to NMDAR-dependent neurotoxicity in AD.

Sumário

I) Introdução	12
I.1) Doença de Alzheimer	13
I.2) Peptídeo beta-amilóide (A β)	14
I.3) Neurotransmissão glutamatérgica	18
I.3.1) Receptores de glutamato	19
I.3.1.1) Receptores glutamatérgicos ionotrópicos	20
I.3.1.2) Receptores NMDA, glutamato e D-serina	20
I.4) Transporte glial de glutamato e DA	24
I.5) A β , Ca ²⁺ , e excitotoxicidade	25
I.5.1) Aumento do conteúdo extracelular de glutamato induzido por A β	30
I.6) Oligômeros do peptídeo A β (A β Os) e DA	31
II) Objetivos	35
III) Métodos	36
III.1) Preparação e caracterização de ADDLs	36
III.1.1) Gel-filtração por HPLC	37
III.1.2) Western blot para ADDLs	39
III.2) Culturas primárias de hipocampo rato	41
III.3) <i>Western blot</i> para quantificação de serina racemase	42
III.4) RT-PCR quantitativo para serina racemase	43
III.4.1) Extração de RNA	43
III.4.2) qRT-PCR	44
III.5) Imunocitoquímica para quantificação de serina racemase em células neuronais e não-neuronais de culturas hipocampais	45
IV) Resultados	47
IV.1) Artigo	47
IV.2) Resultados adicionais	48
V) Discussão	53
VI) Referências	60

Lista de siglas

A β	peptídeo beta-amilóide
A β Fs	fibrilas de A β
A β Os	oligômeros de A β
ADDLs	oligômeros de A β
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AMPA	receptor AMPA
APP	proteína precursora de amilóide
DA	doença de Alzheimer
EAAT	transportador de aminoácidos excitatórios
EPSP	potencial excitatório pós-sináptico
iGluR	receptor ionotrópico de glutamato
LTP	potenciação de longa duração
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NMDAR	receptor NMDA
SNC	sistema nervoso central
SR	serina racemase

I) Introdução

I.1) Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência nos idosos, representando 50-60% do total de casos. Embora sua prevalência seja menor que 1% em indivíduos com menos de 65 anos de idade, este valor cresce exponencialmente com a idade, alcançando, no Ocidente, de 24 a 33% das pessoas com 85 anos ou mais (Ferri e cols., 2005). Nos países em desenvolvimento, os dados epidemiológicos são mais escassos, mas estima-se que cerca de 60% dos pacientes com demência vivam nesta parte do mundo. Em 2001, o total de pessoas no mundo com demência alcançava 24 milhões de pessoas, e este número deverá dobrar a cada 20 anos, alcançando 81 milhões em 2040 devido ao aumento de expectativa de vida das populações, especialmente nos países em desenvolvimento (Ferri e cols., 2005).

Após mais de 100 anos desde a primeira descrição da DA (para uma tradução em inglês do artigo original de Alois Alzheimer, veja Alzheimer e cols., 1995), ainda não se conhece exatamente quais mecanismos estão envolvidos em sua patogênese. Do ponto de vista anatômico macroscópico, as regiões do cérebro envolvidas nos processos de aprendizagem e memória, incluindo os lobos temporal e frontal, sofrem perda de massa (com aumento dos sulcos) em pacientes com DA, como resultado da degeneração sináptica e morte neuronal (Figura 1A). Para um diagnóstico definitivo é necessário o exame *post-mortem* do cérebro do paciente, que deve apresentar lesões características denominadas “emaranhados neurofibrilares” e “placas amilóides” para ser classificado como afetado pela DA (Braak e Braak, 1998; Dickson, 1997a) (Figura 1B). Os emaranhados neurofibrilares

são agregados intracelulares constituídos pela proteína tau, uma proteína ligadora de microtúbulos ou MAP (do inglês *microtubule binding protein*), em estado hiperfosforilado, podendo também apresentar modificações oxidativas. Já as placas amilóides são depósitos extracelulares constituídos predominantemente por agregados fibrilares do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$), um peptídeo de 40-42 aminoácidos gerado por sucessivas clivagens enzimáticas da proteína precursora amilóide (APP) por proteases conhecidas como β - e γ -secretases (Figura 2).

I.2) Peptídeo beta-amilóide ($A\beta$)

Sabe-se que o acúmulo do $A\beta$ tem um papel central na degeneração neuronal e na redução das funções cognitivas na DA (Hardy, 2006; Mattson, 2004). Além disso, com o aumento da clivagem amiloidogênica da APP (Figura 2) há também uma redução na produção de α -sAPP (uma forma solúvel e secretada da APP), que acredita-se ter funções importantes na regulação da plasticidade sináptica e na promoção de sobrevivência neuronal (Mattson e Chan, 2003; para uma revisão, ver Gralle e Ferreira, 2007).

As placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente nas regiões do cérebro envolvidas com aprendizagem e memória, como o córtex entorrinal, hipocampo, prosencéfalo basal e amígdala. As regiões do cérebro com placas exibem tipicamente um número reduzido de sinapses, e neuritos associados a estes agregados estão freqüentemente danificados, sugerindo que o $A\beta$ afeta sinapses e neuritos. Ambas as estruturas estão particularmente afetadas em neurônios glutamatérgicos (Mattson, 2004).

As evidências mais diretas de que o A β tem papel causal no desenvolvimento da DA são resultados de estudos genéticos da forma familiar (hereditária) da doença. As formas familiares ocorrem precocemente e representam apenas 5 a 10% dos casos (Bertam e Tanzi, 2005; Selkoe, 2004). Apesar do papel central do A β na fisiopatologia da DA, é importante notar que este peptídeo de 4,5 kDa é produzido ao longo da vida por humanos e outros mamíferos, inclusive encontrado em fluidos biológicos (Ghiso e cols., 1997; Seubert e cols., 1992; Shoji e cols., 1992; Vigo-Pelfrey e cols., 1993) e no parênquima cerebral de indivíduos saudáveis (Tabaton e cols., 1994). Desta forma, um dos grandes desafios para a compreensão das bases moleculares da fisiopatologia da DA hoje consiste em elucidar os mecanismos que levam o A β a adquirir propriedades neurotóxicas. Como veremos mais adiante, a agregação do peptídeo em formas oligoméricas solúveis ou em fibrilas amilóides insolúveis parece desempenhar papel central na neurotoxicidade do A β .

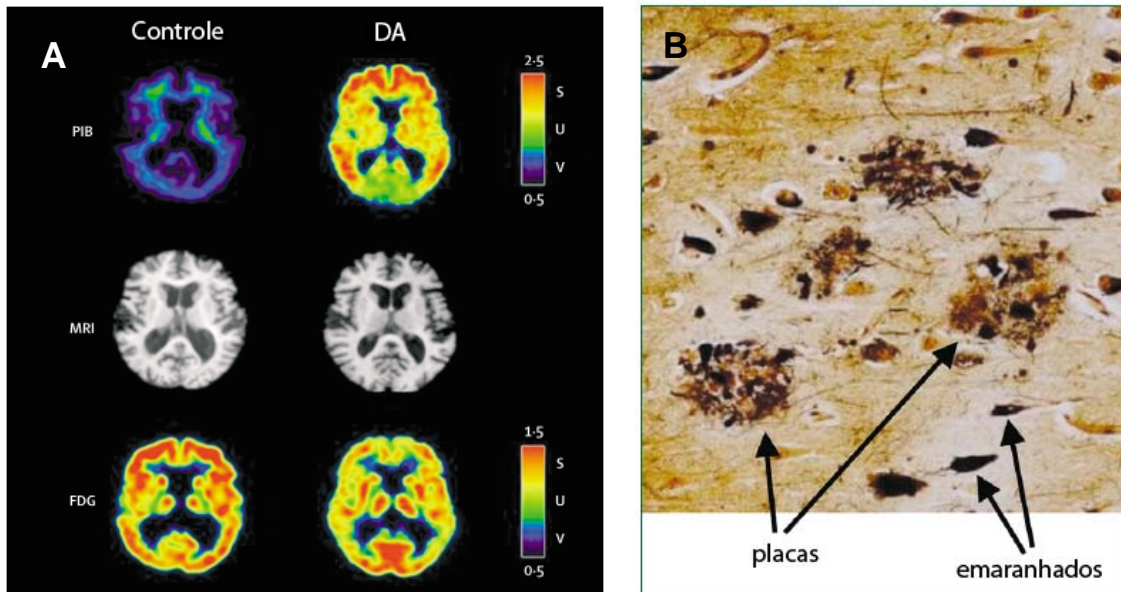


Figura 1: Marcadores histopatológicos da doença de Alzheimer.

A) Tomografias por emissão de pósitrons (*positron emission tomography*, PET) dos cérebros de um indivíduo idoso saudável e um com DA moderada. A marcação por PIB (um derivado da tioflavina T) revela considerável acúmulo de agregados fibrilares de $A\beta$, enquanto a marcação pelo FDG (^{18}F -fluorodeoxiglicose, análogo de glicose) revela forte redução do metabolismo neuronal. A imagem por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI, ao centro do painel) mostra relativa manutenção das estruturas do cérebro neste estágio, indicando que já há comprometimento fisiológico mesmo antes do avanço da morte neuronal. B) Placas amilóides e emaranhados neurofibrilares em um córtex cerebral DA. Adaptado de Blennow e cols., 2006.

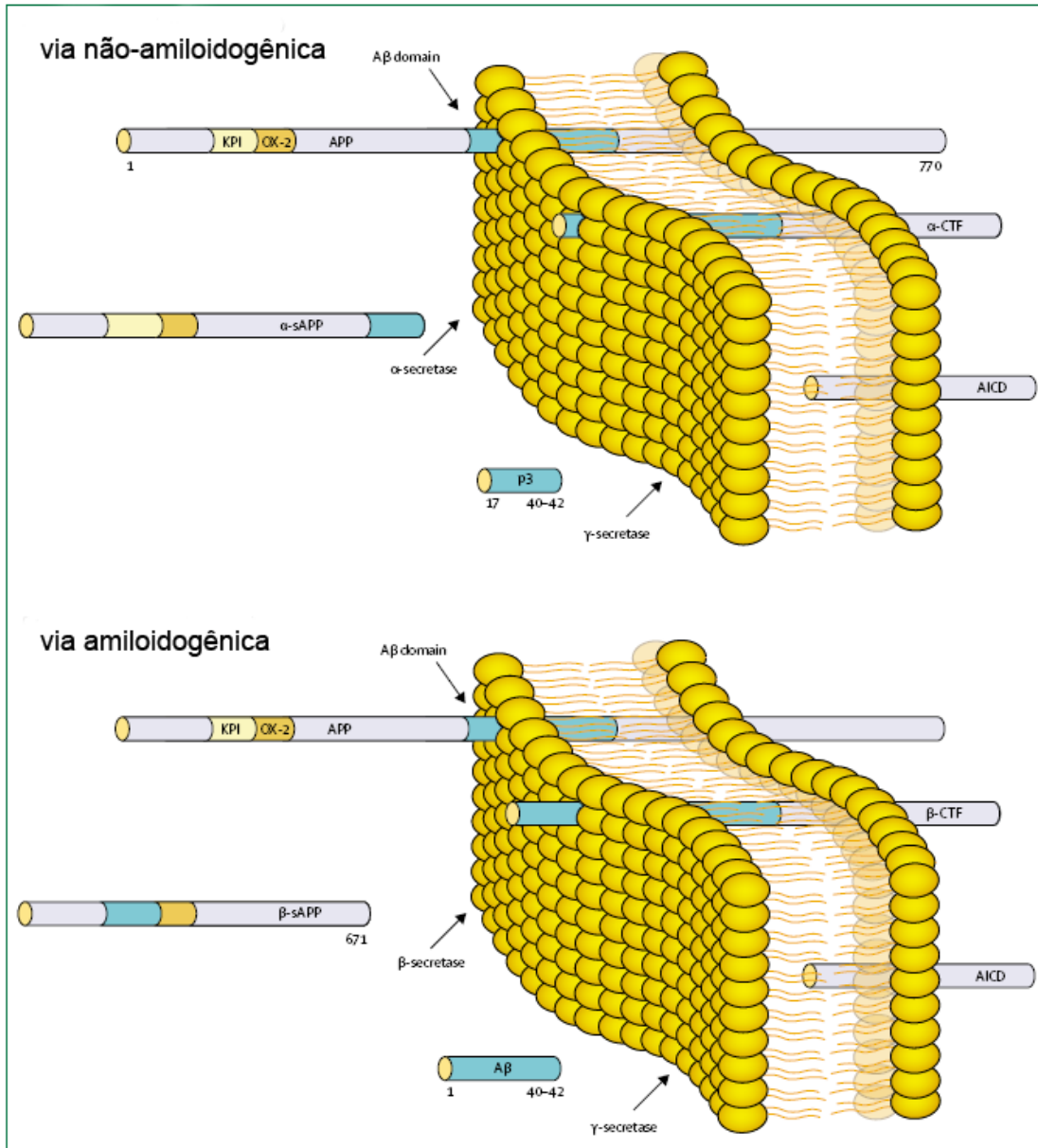


Figura 2: Metabolismo da APP e geração de A β .

A APP é uma proteína transmembrana com uma grande porção N-terminal extracelular. A região do A β imersa na membrana inclui 12-14 resíduos, e a porção extracelular é composta de 28 resíduos. A APP pode ser processada através de duas vias principais. Na via da α -secretase, não-amiloidogênica, esta enzima cliva a APP dentro do domínio A β , liberando um fragmento grande e solúvel chamado α -sAPP. O fragmento C-terminal remanescente (*C-terminal fragment*, CTF) é clivado pelo complexo γ -secretase liberando o peptídeo p3. O domínio intracelular (*APP intracellular domain*, AICD) restante é metabolizado no citoplasma. Como a clivagem da APP pela α -secretase acontece dentro da região que corresponde à seqüência de aminoácidos do A β , não há formação deste peptídeo. Na via amiloidogênica, a β -secretase cliva a APP exatamente antes do domínio A β , liberando a β -sAPP. O β -CTF remanescente é clivado pelo complexo γ -secretase liberando o peptídeo A β de 40 ou 42 aminoácidos. O AICD restante também é metabolizado no citoplasma. Adaptado de Blenow e cols., 2006.

I.3) Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Praticamente todos os neurônios excitatórios no SNC são glutamatérgicos, e estima-se que cerca de 50% de todas as terminações nervosas liberem este aminoácido. Em resposta à despolarização no terminal pré-sináptico, vesículas intracelulares que armazenam glutamato liberam seu conteúdo na fenda sináptica por exocitose, levando a um aumento de 1.000 vezes na sua concentração local (Harris e Sultan, 1995). O glutamato, então, se liga a receptores pós-sinápticos ionotrópicos, gerando o influxo de cátions que despolarizam a célula pós-sináptica. Após a ativação destes receptores, o glutamato será rápida e eficientemente removido da fenda sináptica por transportadores de alta afinidade, prevenindo a estimulação excessiva de seus receptores. A concentração de glutamato na fenda é regulada fundamentalmente pelos transportadores presentes nos astrócitos que compõem a sinapse (Danbolt, 2001).

O glutamato exerce papel crucial no funcionamento normal e no desenvolvimento do cérebro. Basicamente, a despolarização do terminal pré-sináptico provoca a fusão de vesículas carregadas de glutamato à membrana, provocando a liberação deste neurotransmissor na fenda sináptica. O glutamato liga-se então aos receptores ionotrópicos AMPA e kainato, cuja ativação leva ao influxo de cátions, particularmente Ca^{2+} . Esta despolarização inicial desbloqueia os receptores NMDA, responsáveis pela entrada da maior parte do Ca^{2+} . A despolarização e o Ca^{2+} estão envolvidos em vias que culminarão, por exemplo, com síntese protéica associada necessária para a plasticidade sináptica. No entanto, perturbações na neurotransmissão glutamatérgica têm conseqüências severas para este órgão. A elevação prolongada dos níveis extracelulares de glutamato ativa tonicamente

seus receptores, levando à despolarização local prolongada nos neurônios, o que por sua vez dispara uma seqüência de eventos intracelulares que culminam com o influxo de Na^+ e Ca^{2+} e posterior exocitose de glutamato. O influxo excessivo de Ca^{2+} dispara a ativação de vias neurotóxicas, comprometendo inicialmente mecanismos como plasticidade sináptica e que conduzirão, em estágios mais avançados da doença, à morte celular. Com a morte neuronal ocorre então mais liberação de glutamato, levando a um ciclo conhecido como excitotoxicidade (Choi, 1992) (ver item I.5, Figura 3). A capacidade do glutamato de ser altamente tóxico e ao mesmo tempo fundamental para a neurotransmissão excitatória cria um equilíbrio delicado entre fisiologia e patologia.

Adicionalmente, o aminoácido D-aspartato também é capaz de ativar os receptores excitatórios NMDA (NMDARs; ver item I.3.1.2), através da interação com o sítio de ligação do glutamato (Fagg e Matus, 1984; Olverman e cols., 1988). A afinidade dos NMDARs pelo D-aspartato é 10 vezes menor que pelo glutamato (Olverman e cols., 1988), e sua localização não se correlaciona com a destes receptores. No entanto, a metilação enzimática do D-aspartato por uma metiltransferase para gerar NMDA (*N*-metil-D-aspartato) pode aumentar a atividade dos NMDARs (D'Aniello e cols., 2000a e 2000b). Embora seus mecanismos de liberação e captação não estejam bem caracterizados, diversos estudos com [^3H]D-aspartato mostram que sua atividade biológica é finalizada após a remoção desse aminoácido da fenda sináptica por transportadores de alta afinidade (Greenamyre e cols., 1990; Healy e cols., 2005).

I.3.1) Receptores de glutamato

Os receptores de glutamato são encontrados na membrana de neurônios e células gliais. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos medeiam diretamente o influxo de

cátions na célula pós-sináptica, levando à despolarização da membrana. Receptores glutamatérgicos metabotrópicos agem indiretamente através de segundos mensageiros intracelulares.

I.3.1.1) Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

A neurotransmissão glutamatérgica rápida é obtida pela ativação de três classes de receptores ionotrópicos (iGluRs) nomeados de acordo com seus agonistas seletivos: *N*-metil-D-aspartato (NMDA), kainato e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA). Os iGluRs não-NMDA, ou seja, receptores AMPA e kainato, formam canais permeáveis aos íons Na^+ e K^+ e são responsáveis pelo início do potencial excitatório pós-sináptico (*excitatory post-synaptic potential*, EPSP). Os receptores NMDA (NMDARs) são permeáveis a íons Ca^{2+} bem como a cátions monovalentes, e são responsáveis pelo componente tardio do EPSP (embora alguns subtipos de receptor AMPA sejam também permeáveis a Ca^{2+}). Estes receptores apresentam diferentes distribuições no córtex, perfis farmacológicos e papéis na neurotransmissão glutamatérgica (Walton e Dodd, 2007).

I.3.1.2) Receptor NMDA, glutamato e D-serina

Os NMDARs têm papel chave na neurotransmissão excitatória e estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, incluindo a formação de memória, plasticidade sináptica e desenvolvimento do sistema nervoso central (Danysz e Parsons, 1998; Hynd e cols., 2004). Estes receptores são compostos por múltiplas subunidades e sua atividade é regulada por diversos mecanismos, incluindo diferentes ligantes e proteínas de interação (Paoletti e Neyton, 2007). Os NMDARs apresentam alta permeabilidade a Ca^{2+} , com papel central na plasticidade sináptica e em diversos mecanismos de transdução de sinal (Danysz

e Parsons, 1998). O íon Mg^{2+} bloqueia o canal enquanto a membrana não sofre despolarização, que requer a ativação inicial dos receptores AMPA e kainato. Através deste processo, os NMDARs contribuiriam para a plasticidade sináptica e potenciação de longa duração (*long-term potentiation*, LTP), considerada fundamental para o aprendizado e memória. Os receptores NMDA são tetrâmeros constituídos de uma subunidade NR1 combinada com subunidades variáveis NR2 A, B, C ou D, e com menor frequência, NR3 A ou B (Kew e Kemp, 2005). Combinações diferentes de subunidades modularão sua afinidade por agonistas, bloqueio por Mg^{2+} , cinética de ativação e sensibilidade a íons (Monaghan e cols, 1989).

No entanto, o glutamato, seu principal agonista, não ativa estes receptores a menos que o sítio de ligação co-agonista localizado na subunidade NR1 esteja ocupado (Johnson e Ascher, 1987; McBain e cols., 1989). A D-serina, um D-aminoácido presente no cérebro de mamíferos, é um ligante fisiológico do sítio co-agonista do NMDAR, mediando diversos processos dependentes deste receptor (Gustafson e cols., 1997; Junjaud e cols., 2006; Katsuki e cols., 2004; Kim e cols., 2005; Mothet e cols., 2000; Panatier e cols., 2006; Stevens e cols., 2003; Wolosker, 2007; Yang e cols., 2003; Yang e cols., 2005). Entretanto, o primeiro ligante identificado para o sítio co-agonista do NMDAR foi a glicina, razão pela qual este sítio é ainda comumente denominado “sítio de glicina” (*glycine site*). Este sítio exerce papel neuromodulatório essencial para a atividade do NMDAR. A ligação do co-agonista aumenta a afinidade do receptor por glutamato (Fadda e cols., 1988), diminui sua dessensibilização (Lerma e cols., 1990) e promove a renovação dos NMDARs através de internalização (Nong e cols., 2003).

A D-serina, como co-agonista dos receptores de NMDA, tem sido relacionada diretamente à doença de Alzheimer. Apesar de estudos iniciais terem mostrado níveis

equivalentes de D-serina no córtex frontal (Nagata e cols., 1995) e parietal superior (Chouinard e cols., 1993) de doentes e controles, recentemente observou-se uma redução nos níveis de D-serina no plasma de pacientes com doença de Alzheimer em relação a controles sadios (Hashimoto e cols., 2004). Por outro lado, estudo em líquido encéfalo-raquidiano mostrou um aumento na concentração de D-serina no material coletado dos ventrículos cerebrais de indivíduos com DA (Fisher e cols., 1998).

A D-serina é sintetizada pela enzima serina racemase (Figura 3), presente em astrócitos e predominantemente em neurônios (Kartvelishvily e cols., 2006; Yoshikawa e cols., 2007). A mensuração do RNAm desta enzima, em pequeno grupo de indivíduos, mostrou níveis consideravelmente elevados nos cérebros de indivíduos com a doença de Alzheimer em relação a controles (Wu e cols., 2004). Na busca de alvos terapêuticos no metabolismo da D-serina, foi recentemente mostrado que a inibição da serina racemase é capaz de controlar a disponibilidade de D-serina, sendo proposta como uma nova estratégia para a modulação da atividade dos receptores de NMDA através do sítio co-agonista (Panizzutti e cols., 2001).

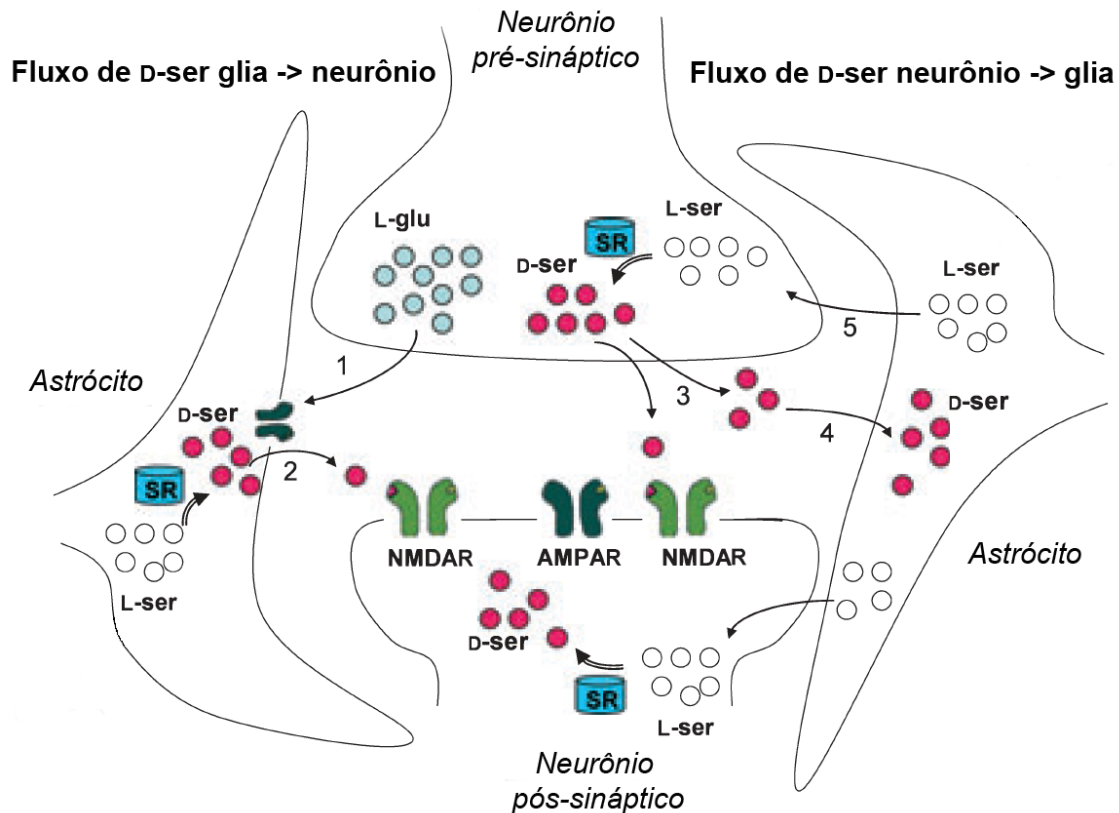


Figura 3: Funções propostas para células gliais e neurônios na sinalização pela D-serina.

O esquema apresenta dois modos de liberação de D-serina. O fluxo glia→neurônio ocorreria através da ativação de receptores AMPA gliais pelo glutamato (reação 1). Isto provoca a liberação de D-serina astrocitária, possivelmente de um *pool* vesicular, para ativar receptores NMDA (NMDARs) neuronais (reação 2). Como a serina racemase (SR) ocorre predominantemente em neurônios, os astrócitos podem obter D-serina pela recaptação do ambiente extracelular. Alternativamente, a capacidade dos astrócitos de sintetizar L-serina a partir da glicose pode permitir também a síntese de D-serina, já que estas células também expressam SR; a relevância de cada via no acúmulo astrocitário de D-serina é desconhecida. O fluxo neurônio→glia de D-serina seria alcançado por sua liberação pelos neurônios, provavelmente por despolarização de membrana (reação 3). A D-serina liberada ativará os NMDARs ou será captada pelos astrócitos (reação 4). Não está claro se a síntese e a liberação neuronais de D-serina ocorrem no terminal pré- ou pós-sináptico. Como a maior parte dos neurônios não sintetiza L-serina a partir da glicose, eles dependem da exportação deste aminoácido pelos astrócitos (reação 5). Adaptado de Wolosker e cols., 2008.

I.4) Transporte neuronal e glial de glutamato e DA

O excesso de estímulo dos NMDARs leva à neurotoxicidade e a várias condições patológicas, incluindo acidentes vasculares encefálicos e doenças neurodegenerativas (Choi e Rothman, 1990). Para prevenir a estimulação excessiva dos receptores, o glutamato deve ser rápida e eficientemente removido da fenda sináptica. Os transportadores gliais de glutamato, EAAT1 e EAAT2 (*excitatory aminoacid transporter*), são os responsáveis por esta tarefa (Rothstein e cols., 1996). No cérebro humano saudável, EAAT1 e EAAT2 (conhecidos como GLAST e GLT-1, respectivamente, em roedores), são encontrados apenas na membrana de astrócitos intimamente associados a contatos sinápticos excitatórios (Chaudry e cols., 1995). Perturbações nesta regulação fina da depuração de glutamato podem levar à ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos (excitotoxicidade, ver tópico I.5). Nos neurônios, o principal transportador é o EAAT3 (EAAC1 em roedores), encontrado principalmente no hipocampo e cerebelo, mas fora da fenda sináptica (Rothstein e cols., 1994; Conti e cols., 1998; Kugler e Schmitt, 1999; He e cols., 2000; Meera e cols., 2005). Considerando-se também que sua expressão é relativamente baixa, o envolvimento e importância dos EAAT3 no controle dos níveis de glutamato ainda não estão claros (Peghini e cols., 1997; Nieoullon, 2006).

O transporte de glutamato está significativamente reduzido nos córtices temporal, frontal, parietal e hipocampal de pacientes DA (Greenamyre e cols., 1985; Cross e cols., 1987; Simpson e cols., 1988; Masliah e cols., 1996; Li e cols., 1997). Este decréscimo se correlaciona com o aumento da densidade de marcadores de morte neuronal mediada por aminoácidos excitatórios e com a perda de sinaptofisina, um marcador pré-sináptico (Masliah e cols., 1996). Uma indicação de que o acúmulo de glutamato pode exacerbar a

patologia da DA vem de estudos de inibição da captação de glutamato *in vivo*. A injeção do bloqueador da captação de glutamato ácido D(+)-threo-3-hidroxiaspártico (*D(+)-threo-3-hydroxyaspartic acid*, THA) no *striatum* de rato levou à neurodegeneração (McBean e Roberts, 1985). Outros estudos mostraram que a inibição do transporte de glutamato leva à morte neuronal lenta, que pode ser prevenida por antagonistas dos receptores de glutamato (Rothstein e cols., 1993).

I.5) A β , Ca²⁺, e excitotoxicidade

Diversos trabalhos indicam que o A β induz ativação exacerbada de receptores de glutamato, promovendo ou potencializando o fenômeno conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (Harkany e cols., 2000; Koh e cols., 1990; Louzada e cols., 2001, 2004; Mattson e cols., 1992; Miguel-Hidalgo e cols., 2002; Tominaga-Yoshino e cols., 2001). Tal fenômeno consiste em extensa morte neuronal que ocorre em resposta à ativação exacerbada e anômala de receptores de glutamato, com entrada excessiva de cátions, particularmente Ca²⁺ (Figura 4). O processo excitotóxico é auto-propagável, pois os neurônios que morrem liberam mais glutamato para o meio extracelular, ativando mais receptores e promovendo um ciclo de injúria neuronal.

Há hoje um número considerável de evidências mostrando que a cascata de eventos patogênicos da DA inclui um componente excitotóxico (Mattson, 1997; Procter, 2000). Variações na composição de subunidades do receptor NMDA podem ser responsáveis pela vulnerabilidade local de neurônios à excitotoxicidade. Uma questão relevante é se as diferenças entre os receptores ocorrem em resposta à doença ou são pré-existentes e,

portanto, levam à série de eventos patogênicos. Tominaga-Yoshino e colaboradores (2001) mostraram que a interação dos NMDARs e o peptídeo A β pode ser neurotóxica. Estudos *in vitro* demonstraram que o A β pode aumentar a toxicidade mediada por glutamato (Brorson e cols., 1995; Mattson e Goodman, 1995) e pela transmissão mediada por NMDAR (Wu e cols., 1995). A degeneração causada pelo A β *in vivo* também foi relacionada à ativação excessiva dos NMDARs (Miguel-Hidalgo e cols., 2002). Estas descobertas correlacionam-se bem com a co-localização entre neurônios piramidais excitatórios e alterações patológicas (emaranhados neurofibrilares e placas amilóides) em amostras de cérebro DA *post-mortem* (Francis e cols, 1992; Braak e cols., 1993).

Observam-se também danos a neurônios hipocampais e corticais que recebem aferências glutamatérgicas (Albin e Greenamyre, 1992). Axônios, botões terminais, glia e células endoteliais e entorrinais são relativamente pouco afetados (Choi, 1992). Estudos quantitativos feitos por microscopia eletrônica revelaram que as células piramidais constituem ~70% da população neuronal no córtex cerebral de mamíferos (Winfield e cols., 1980). As células piramidais da camada V são os principais alvos de aferências glutamatérgicas provenientes de outras regiões corticais e subcorticais (Frick e cols., 2001). Estas células, mais as suas colaterais intracorticais, constituem as principais vias eferentes do córtex cerebral e são as principais mediadoras das vias associativas cortico-corticais. Análises morfométricas estimam que a perda seja de 23-46% de células piramidais no cérebro de pacientes DA (Mountjoy e cols, 1983; Hubbard e Anderson, 1985). Os aminoácidos excitatórios (*excitatory amino acids*, EAAs) estão entre os neurotransmissores usados por estas células (Palmer, 1996).

O excesso de Ca²⁺ intracelular parece estar envolvido também no processamento alterado da APP nas formas esporádicas (não familiares) mais comuns da DA. A exposição

de células em cultura a agentes indutores de influxo de Ca^{2+} resulta no aumento da produção de A β (Querfurth e Selkoe, 1994), e mutações na presenilina 1, que levam à DA, alteram a homeostase de Ca^{2+} e aumentam a produção de A β (Guo e cols., 1996, 1997 e 1999).

Estudos sobre os efeitos do A β e sAPP em neurônios mostram uma forte correlação entre alterações na homeostase celular de Ca^{2+} e a patogênese da DA. Durante o processo de agregação, o A β gera peróxido de hidrogênio e, a partir deste, radical hidroxila via reações químicas que requerem Cu^{2+} ou Fe^{2+} (Hensley e cols., 1994; Butterfield e cols., 1994; Goodman e Mattson, 1994; Lynch e cols., 2000). A produção destas espécies reativas de oxigênio induz peroxidação lipídica de membrana, a qual pode prejudicar a função de ATPases transportadoras de íons (Na^+/K^+ - e Ca^{2+} -ATPases), e transportadores de glicose e glutamato, levando à despolarização de membrana e ao decréscimo nos níveis celulares de ATP (Mark e cols., 1995, 1997; Blanc e cols., 1998). Estes efeitos provocados pelo A β causam uma elevação dos níveis basais intracelulares de Ca^{2+} e aumentam consideravelmente a sobrecarga de Ca^{2+} quando da ativação dos receptores de glutamato (Mark e cols., 1995; Mattson e cols., 1992).

A excitotoxicidade já foi relacionada a diversos distúrbios no cérebro, incluindo epilepsia, esclerose lateral amiotrófica, isquemia, doença de Huntington e doença de Alzheimer (Rothstein, 1996; Won e cols., 2002; Hynd e cols., 2004; Tannenbergl e cols., 2004; Fujikawa, 2005; Rego e de Almeida, 2005; Yi e Hazell, 2006). Embora haja um grande conjunto de evidências relacionando a excitotoxicidade à fisiopatologia da DA, ainda não estão completamente elucidados os mecanismos envolvidos na ativação excessiva dos receptores de glutamato pelo A β . Este tipo de informação é vital para a melhor compreensão da patogênese da DA e, assim, para o desenvolvimento de abordagens

terapêuticas eficientes, já que não existe tratamento definitivo para tal. Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho foi investigar possíveis mecanismos de excitotoxicidade mediada pelo A β , através da mensuração de glutamato e D-serina no sobrenadante de culturas hipocâmpais tratadas com oligômeros e fibrilas deste peptídeo.

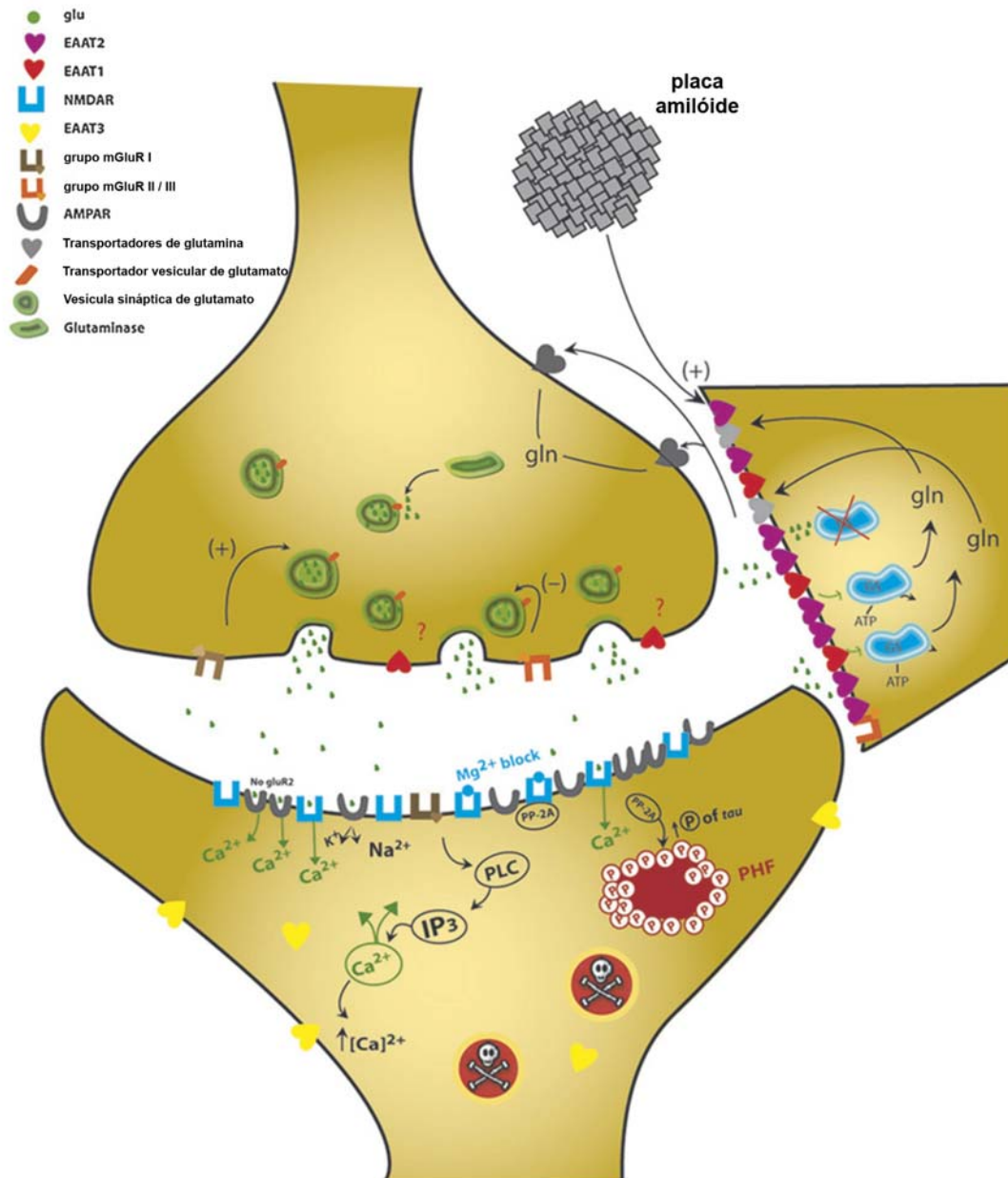


Figura 4: Visão geral da disfunção sináptica glutamatérgica.

O glutamato é liberado, através de vesículas presentes no neurônio pré-sináptico, na fenda sináptica, onde ativar os receptores NMDA (NMDARs), AMPA (AMPARs) e metabotrópicos (mGluR) pós-sinápticos. O glutamato é removido da fenda pelos transportadores de aminoácidos excitatórios 1 e 2 (*excitatory aminoacid transporters*, EAAT1 e EAAT2), localizados nos astrócitos peri-sinápticos. Nos astrócitos, a glutaminase (GS) converte glutamato em glutamina usando ATP. A glutamina é lançada por transportadores de glutamina para o neurônio pré-sináptico e a glutaminase converte este aminoácido novamente em glutamato. Este então é armazenado em vesículas sinápticas por transportadores vesiculares de glutamato (*vesicular glutamate transporters*, VGLUTs). O aumento do influxo e da concentração intracelular de Ca^{2+} pela ativação excessiva dos AMPARs e NMDARs pode culminar com a morte neuronal. A ativação dos mGluRs I pode provocar a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares, exacerbando a disfunção sináptica. A ativação dos NMDARs provoca a dissociação da proteína fosfatase-2A (PP-2A), permitindo que ocorra desregulação da fosforilação da tau, o que leva à formação de filamentos helicoidais emparelhados (*paired helical filaments*, PHF).

I.5.1) Aumento do conteúdo extracelular de glutamato induzido por A β

Apesar das evidências que mostram um possível envolvimento da excitotoxicidade glutamatérgica no processo neurodegenerativo induzido por A β , ainda não há consenso sobre como o peptídeo A β induz aumento da atividade de receptores de glutamato. Os principais mecanismos propostos sugerem que o A β pode 1) interagir diretamente com os NMDARs, aumentando sua atividade; 2) induzir exocitose de vesículas glutamatérgicas e aumento da concentração extracelular de glutamato; e/ou 3) inibir a recaptação de glutamato (particularmente glial), levando ao seu acúmulo no ambiente extracelular.

Harkany e cols. (1999) mostraram que a infusão de A β no núcleo basal de ratos *in vivo* aumenta a concentração extracelular de glutamato 20-30 minutos após a exposição ao A β , e que isto coincide com um aumento significativo da concentração intracelular de Ca²⁺ na região de injeção de A β . Outras evidências sugerem que a expressão de transportadores de glutamato está reduzida na DA e que a recaptação de glutamato pode estar inibida pelo A β (Harris e cols., 1996; Parpura-Gill e cols., 1997). A maior parte dos trabalhos mostra que o A β é capaz de inibir a recaptação glial de glutamato (Harris e cols., 1996; Parpura-Gill e cols., 1996; Harkany e cols., 1999; Noda e cols., 1999), mas há também evidências de interferência sobre a recaptação neuronal (Fernandez-Tome e cols., 2004). Harkany e cols. (1999) demonstraram que a aplicação *in vitro* de A β induz rápida despolarização da membrana de astrócitos, acompanhada de inibição da captação de glutamato. Noda e cols. (1999) demonstraram que o A β aumenta a liberação de glutamato em culturas primárias de microglia através de um transportador de glutamato dependente de Na⁺, que é ativado por K⁺ extracelular. Estes autores especularam que o A β atua em um transportador reverso de

glutamato, levando ao aumento da concentração extracelular deste aminoácido, e que isto contribuiria para a patogênese da disfunção neuronal e neurodegeneração na DA (Noda e cols., 1999).

I.6) Oligômeros do peptídeo A β (ADDLs) e DA

A pesquisa em Alzheimer ainda busca entender uma questão central: o que provoca os primeiros danos observados, mais sutis e intermitentes, sobre as funções hipocâmpicas e, conseqüentemente, à memória episódica? Existem substanciais evidências indicando que o A β fibrilar é o principal agente da patologia observada na DA. Como dito anteriormente, nas placas amilóides o peptídeo A β encontra-se agregado em fibrilas amilóides, que foram classicamente apontadas como as causadoras da patologia neuronal na DA. Entretanto, grandes quantidades do peptídeo A β são encontradas nos córtex límbico e associativo de indivíduos idosos aparentemente saudáveis, após exame *post-mortem*. Estes depósitos de A β – quase todos difusos – não são compostos por fibrilas amilóides e, ao seu redor, pouco se encontra da citopatologia neurítica e glial observada em placas amilóides maduras (Dickson, 1997b). Além disso, são inconsistentes as correlações feitas entre contagens de placas amilóides em cérebros *post-mortem* e a extensão dos sintomas cognitivos feitos *pre-mortem*.

O advento de técnicas mais sensíveis permitiu avaliações mais apuradas do tipo e quantidade de A β , mostrando que os níveis de oligômeros solúveis de A β correlacionam-se muito melhor com os estágios de *deficit* cognitivo do que o número de placas (Lue e cols., 1999; McLean e cols., 1999; Naslund e cols., 2000; Wang e cols., 1999). Estas evidências, somadas ao fato de que placas amilóides grandes (~20-120 μ m de diâmetro) possuem muito

menos superfície de A β em contato com membranas neuronais do que grandes quantidades de pequenos oligômeros capazes de difundir-se nas fendas sinápticas, indicam que estas estruturas solúveis são melhores candidatos para induzir disfunção neuronal e/ou sináptica do que as placas. Além disso, há ainda a idéia de que grandes agregados de proteínas causadoras de doenças sejam, na verdade, inertes ou mesmo protejam os neurônios, hipótese baseada em trabalhos feitos com outros distúrbios também causados por alterações conformacionais em proteínas, como as doenças de Parkinson (DP) e de Huntington (DH). Na DP, o principal marcador são os corpúsculos de Lewy, inclusões intraneuronais compostas principalmente por α -sinucleína mutada, que agregam anormalmente. Estes agregados são encontrados em neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*. Nos indivíduos afetados pela DH, a proteína huntingtina é expressa com um número aumentado de glutaminas (poliglutamina), provocando disfunção do gânglio basal com posterior demenciação do paciente (Volles e Lansbury Jr, 2003; Lansbury e Caughey, 2003; Arrasate e cols., 2004; Schaffar e cols., 2004).

A hipótese central hoje apresentada como causa da doença de Alzheimer é a hipótese da cascata amilóide (Figura 5). Entre as bases desta hipótese está a descoberta de que mutações relacionadas com a forma familiar da DA ocorrem nos genes da APP e da presenilina (o componente catalítico do complexo γ -secretase), respectivamente substrato e enzima-chave da produção de A β . De acordo com esta hipótese, o evento central na patogênese da DA é a perda do balanço entre produção e eliminação de A β (Figura 5). Os oligômeros de A β , também conhecidos por ADDLs (*A β -Derived Difusible Ligands*), podem inibir diretamente a potenciação de longa duração hipocampal e prejudicar a função sináptica, somando-se ao estresse inflamatório e oxidativo causado pelo A β fibrilar. Estes

processos comprometem as funções neuronal e sináptica, o que resulta em *deficits* de neurotransmissores e no surgimento de sintomas cognitivos (Hardy e Selkoe, 2002).

Diante de todas as evidências até agora apresentadas, seria razoável pensar numa correlação entre o peptídeo A β e ativação aberrante dos NMDARs num contexto de excitotoxicidade. De fato, já foi demonstrado que oligômeros solúveis de A β 1-40 provocam a disfunção de terminais pós-sinápticos glutamatérgicos mediada por NMDARs (Roselli e cols., 2005). Somando-se a isto, De Felice e cols. (2007) demonstraram que um anticorpo anti-subunidade NR1 do NMDAR bloqueia a ligação de ADDLs a neurônios hipocampais em cultura, sugerindo uma interação direta entre ADDLs e o NMDAR na membrana neuronal.

Como conclusão, propusemos neste trabalho um mecanismo que explica a excitotoxicidade observada na DA mediada pelo A β nas formas oligomérica e fibrilar. Devido ao avanço da expectativa de vida da população mundial, e ao crescente número de evidências relacionando os oligômeros de A β à DA, este trabalho pode acrescentar à literatura atual informações relevantes sobre a patogênese desta doença devastadora.

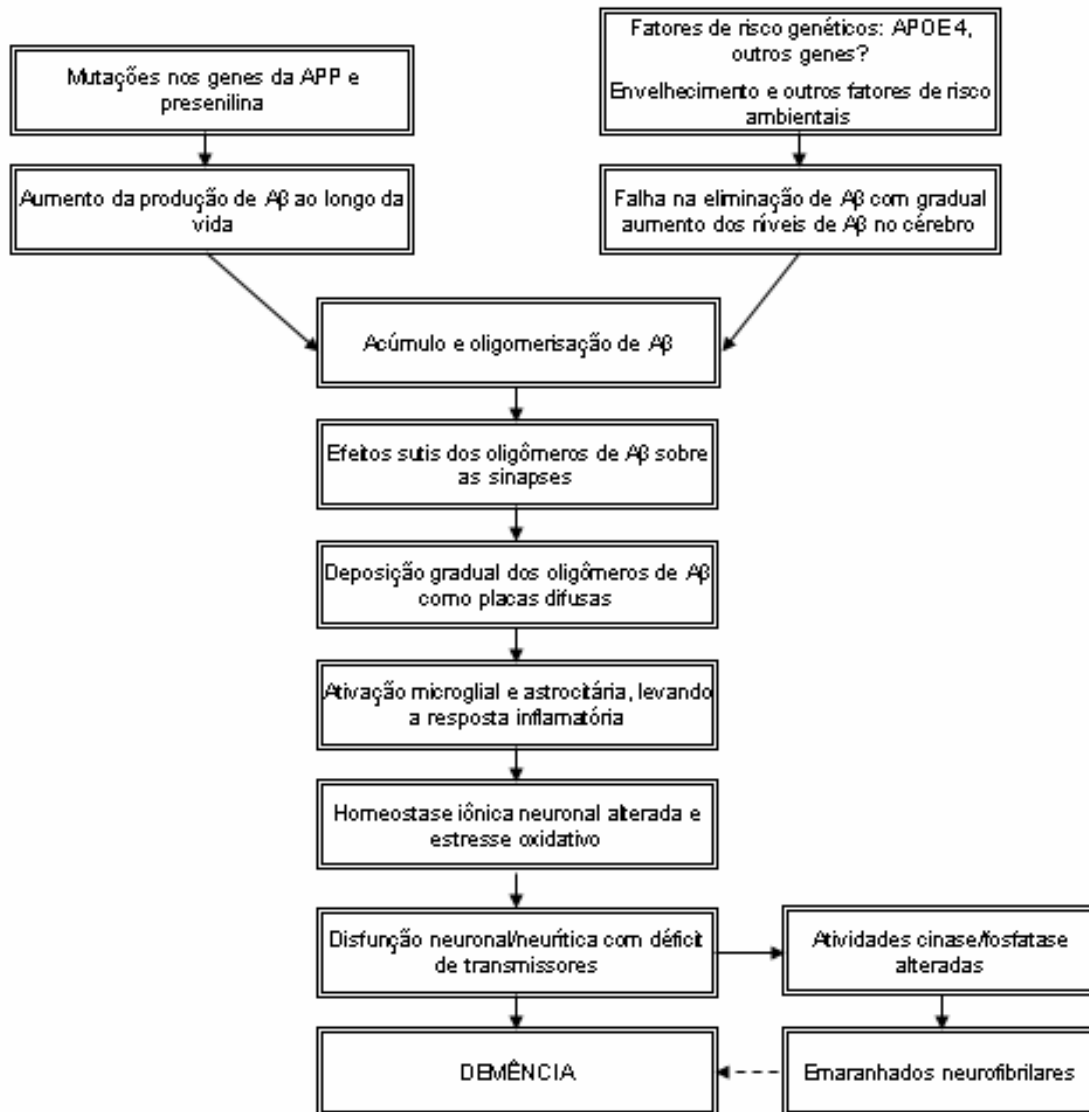


Figura 5: Hipótese da cascata amilóide

Seqüência de eventos patogênicos na DA que culminam com o surgimento de sintomas como demência. Os oligômeros de A β podem danificar diretamente sinapses e neuritos no cérebro, em adição a ativação da microglia e dos astrócitos. A hiperfosforilação da tau, com resultante formação de emaranhados, ocorre como evento tardio, mas pode contribuir para a disfunção neuronal e sintomas cognitivos. Adaptado de Blennow e cols., 2006.

II) Objetivos

O objetivo desta dissertação foi estudar os mecanismos de excitotoxicidade induzida por agregados do peptídeo A β em culturas primárias hipocampais neuronais, buscando compreender melhor as bases neuroquímicas para a disfunção e morte neuronais na doença de Alzheimer. Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o efeito da exposição a agregados (oligômeros e fibrilas) de A β sobre as concentrações de glutamato e D-serina no meio condicionado de culturas neuronais primárias de hipocampo de rato.
2. Investigar possíveis mecanismos neuroquímicos subjacentes aos efeitos observados sobre as concentrações extracelulares de glutamato e D-serina em culturas neuronais primárias de hipocampo de rato expostas a agregados de A β .
3. Investigar a possível regulação dos níveis de proteína e RNAm da enzima serina racemase, responsável pela síntese de D-serina, no aumento deste neurotransmissor em culturas neuronais primárias de hipocampo de rato expostas a agregados de A β .

III) Métodos

Descrições detalhadas dos métodos específicos utilizados no desenvolvimento da parte experimental desta dissertação encontram-se no artigo em redação anexado em “Resultados”. Nesta seção serão descritas, de forma detalhada, algumas metodologias de natureza mais geral e aquelas empregadas nos experimentos cujos resultados serão publicados posteriormente.

III.1) Preparação e caracterização de ADDLs

A β 1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA) foi solubilizado à concentração de 1 mM em ácido trifluoroacético (TFA; Merck, Darmstadt, DE) gelado. A solução foi agitada vigorosamente em vórtex e mantida em sonicador de banho durante 30 minutos. O TFA foi completamente evaporado com N₂ gasoso, a fim de obter uma fina película de A β no fundo do tubo. O filme de A β assim obtido foi ressuspensão a 1 mM em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Merck) gelado e a solução límpida e incolor resultante foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. A solução foi então colocada em gelo por 10 minutos e aliqüotada, em fluxo laminar, em microtubos. Os microtubos foram deixados abertos na capela de fluxo laminar durante 12 horas para evaporação do HFIP. A eliminação completa do HFIP foi feita por centrifugação em SpeedVac® por 10 minutos. As aliqüotas contendo os filmes de A β foram estocadas a -20 °C para utilização posterior.

As preparações de ADDLs foram feitas, a partir destes estoques, segundo protocolo previamente descrito (Lambert e cols, 1998). A cada preparação de ADDLs, uma aliqüota de A β foi ressuspensa em dimetilsulfóxido anidro (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) de

forma a obter uma solução a 5 mM. Esta solução foi diluída em PBS estéril a 100 μ M e incubada a 4 °C por 24 horas. Uma amostra de mesmo volume de DMSO 2% em PBS foi preparada e incubada a 4 °C por 24 horas, e usada experimentalmente como controle (veículo). Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos a 4 °C para remoção de agregados insolúveis de A β . O sobrenadante da centrifugação, contendo ADDLs, foi mantido a 4 °C até a sua utilização em um período máximo de até 48 horas após o preparo. Para determinar a concentração de ADDLs nas preparações, utilizou-se o método de BCA (Pierce, Rockford, IL).

Como são metaestáveis, as preparações de ADDLs, realizadas semanalmente no laboratório, são rotineiramente analisadas por *Western blot* e cromatografia de gel-filtração para caracterizar as espécies oligoméricas presentes.

III.1.1) Gel-filtração por HPLC

As análises foram feitas com uma coluna de sílica SynChropak® GPC 100 com as seguintes características: dimensão da coluna: 250 x 4,6 mm; tamanho do poro: 100 Å; limite de exclusão para proteínas: 3.000-300.000 kDa. A fase móvel usada foi PBS pH 7, filtrado através de membrana de nitrocelulose Millipore (Billerica, MA) 0,45 μ m, mantido em gelo durante toda a análise. As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*, HPLC), com detecção simultânea de absorção a 280 nm e fluorescência com excitação a 275 nm e emissão a 305 nm.

Antes da injeção da amostra de ADDLs, a coluna foi lavada durante 1 hora com água Milli-Q® e equilibrada por 1 hora com a fase móvel, ambas com fluxo de 0,5 mL/min. Inicialmente, 50 μ L de veículo (DMSO 2% em PBS) foram injetados, com fluxo

de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. Em seguida, a coluna foi re-equilibrada com a fase móvel durante 15 minutos e 50 μ L de ADDLs foram injetados, e a análise feita com os mesmos parâmetros usados para o veículo. Os dados das cromatografias foram transferidos para o programa Microsoft® Excel 2002, onde os cromatogramas foram preparados para relatórios semanais de caracterização das preparações.

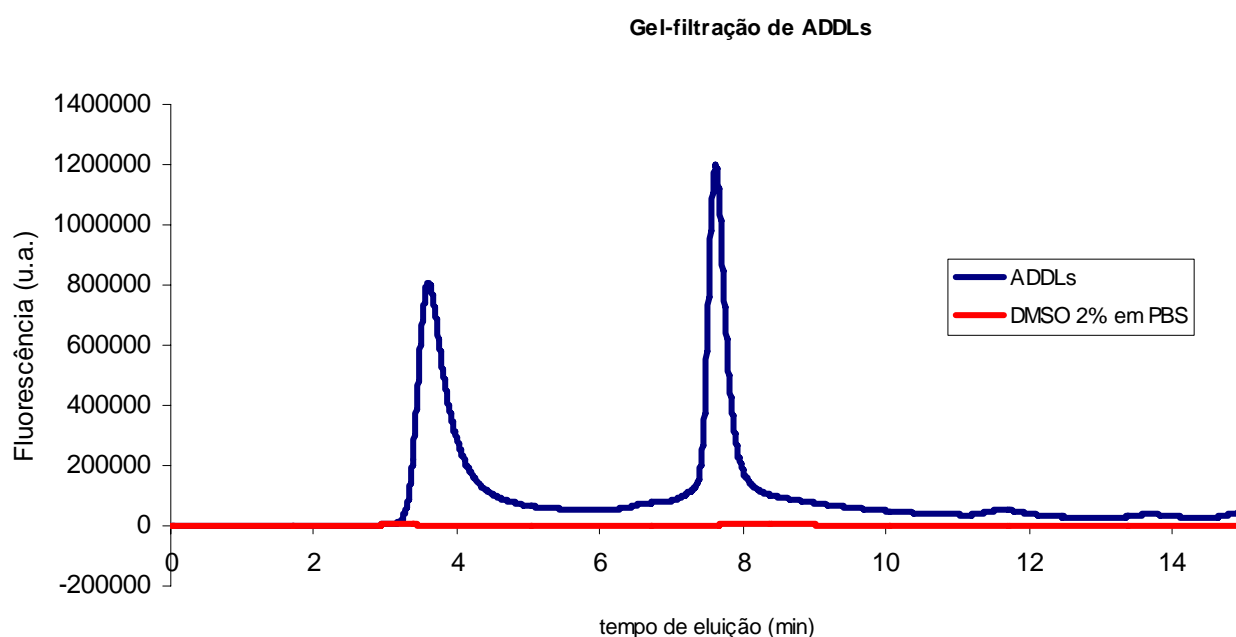


Figura 6: Cromatograma representativo de gel-filtração de ADDLs

Através da gel-filtração é possível detectar duas populações de agregados. A primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), elui entre 3,5 – 4 minutos. Agregados de 2-3 monômeros eluem mais tarde, entre 7,5 – 8 minutos.

III.1.2) *Western blot* para ADDLs

Amostras das preparações de ADDLs foram adicionadas a tampão de amostra e resolvidas por eletroforese em gel de gradiente de 10–20% de acrilamida (Invitrogen) com tampão de corrida Tris/Tricina/SDS, a 120 V por 60 minutos à temperatura ambiente. O material no gel (20 pmol de A β /canaleta) foi eletrotransferido para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a 100 V por 1 hora a 4 °C, usando tampão contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol, 0,02% SDS, pH 8,3. As membranas foram bloqueadas com BSA 3 % em tampão Tris-HCl 20 mM contendo Tween-20 0,1 % (TBS-T) por 1 h à temperatura ambiente. Um anticorpo monoclonal murino específico contra ADDLs (NU1), gentilmente doado pelo Dr. William Klein, da Universidade Northwestern (Evanston, USA), foi diluído a 1 μ g/mL em BSA 3 %/TBS e incubado com as membranas por 90 minutos. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:50.000 (em TBS-T) por 1 hora. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T e reveladas com o substrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce, Rockford, IL) diluído 1:1, e expostas em filme Kodak.

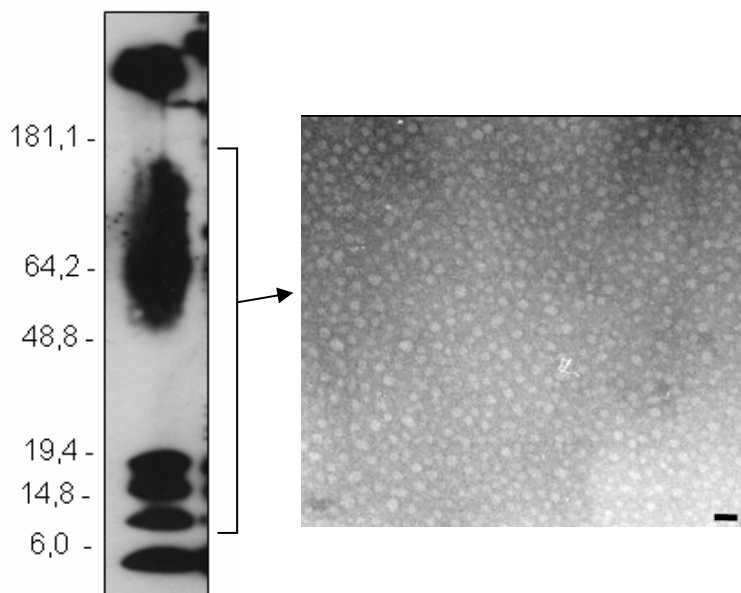


Figura 7: Western blot representativo das preparações de ADDLs.

O tamanho dos agregados varia de dímeros até oligômeros de ~50-100 kDa. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (aumento de 85.000x) obtida pela Dra. Andréa Paula-Lima.

III.2) Culturas primárias de hipocampo rato

Embriões de rato Sprague-Dawley foram obtidos de ratas com 18 dias de gestação para preparo de culturas de hipocampo. Após decapitação dos embriões, os encéfalos foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução estéril de PBS glicose 2% a 37°C. Com o auxílio de lupa, os hipocampos foram dissecados, as meninges foram retiradas e o tecido foi fracionado com tesoura cirúrgica estéril. As células foram dissociadas mecanicamente com pipetas Pasteur de pontas flambadas, e centrifugadas a 1000 X g por 4 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio Neurobasal suplementado com 2% de suplemento B27 (Gibco, Grand Island, NY), 0.5 mM de glutamina (Gibco), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10 µg/mL de fungizona (Cristália, Itapira, SP). Após quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas com densidade de 1.500 células/mm² (placas de 6 e 96 poços, 100 e 400 µL por poço respectivamente) e 1.000 células/mm² (placas de 6 poços, 1,5 mL por poço) . As placas foram previamente tratadas com solução de poli-L-lisina a 10 µg/mL. As culturas foram mantidas a 37°C, em estufa umidificada contendo 5% CO₂/95% ar atmosférico, por períodos de 18-21 dias *in vitro* (DIV). Um terço do volume de meio em cada poço foi trocado por meio Neurobasal suplementado fresco a cada 7 DIV.

III.3) *Western blot* para quantificação de serina racemase

Culturas hipocampais primárias (18 DIV) foram tratadas com ADDLs 500 nM ou A β 5 μ M, e seus respectivos veículos, durante 4 ou 12 horas, em estufa a 37 °C, 5 % CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado e lisadas em meio contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 mM de EDTA, 1 % de Triton X-100, 10 % de glicerol, inibidores de proteases (10 μ g/ml de aprotinina e leupeptina) e 1 mM de PMSF. A concentração de proteínas foi determinada através do método de BCA (Pierce, Rockford, IL).

As amostras foram adicionadas a tampão de amostra e resolvidas por eletroforese (40 μ g de proteína por canaleta; 100 V, 2 horas) em gel SDS/PAGE 12 %. Posteriormente, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas (250 mA/2 horas) para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Após a eletrotransferência, as membranas foram incubadas por no mínimo 1 hora em solução de bloqueio contendo BSA 5 % (Sigma, St. Louis, MO) e Tween 20 0,1 % (Amresco, Solon, OH) em PBS (T-PBS). Após o bloqueio das membranas, estas foram incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo policlonal anti-serina racemase (produzido em coelhos pelo Prof. Rogério Panizzutti, Instituto de Ciências Biológicas da UFRJ) ou anticorpo monoclonal murino anti-serina racemase (BD Biosciences, San Jose, CA) na diluição de 1:750, e anticorpo anti-ciclofilina B (produzido em coelhos; Affinity BioReagents, Rockford, IL) na diluição de 1:15.000. Após incubação e posterior lavagem extensiva com T-PBS, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com anticorpos anti-IgG de camundongo e de coelho conjugados com peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:10.000. Após nova lavagem extensiva com T-PBS, as bandas imunoreativas foram

visualizadas usando tratamento quimiluminescente com o kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce, Rockford, IL) diluído 1:1, seguido de exposição em filme Kodak®. As avaliações densitométrica e quantitativa das bandas obtidas foram feitas usando o programa NIH ImageJ (Abramoff e cols., 2004; V1.38, NIH, USA). Em todos os experimentos, os resultados são apresentados como a razão entre a intensidade das bandas de serina racemase e as de ciclofilina B (controle de carregamento).

III.4) RT-PCR quantitativo para serina racemase

III.4.1) Extração de RNA

Culturas hipocampais primárias (18 DIV) foram tratadas com A β 5 μ M ou TFE 50% (v/v) (veículo) durante 4 ou 12 horas, em estufa a 37 °C, 5 % CO₂. A extração de RNA total foi realizada utilizando 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para 1x10⁶ células. Após homogeneização por pipetagem, cada amostra foi recuperada em um tubo independente. Foram, então, adicionados 250 μ L de clorofórmio, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto, e os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo microtubo contendo 600 μ L de isopropanol gelado, seguido de homogeneização suave. O RNA foi precipitado a -20 °C durante 24 horas, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado 5 vezes com etanol 70 % (v/v) e ressuspenso em 5 μ L de água previamente tratada durante 24 horas com dietil pirocarbonato (água DEPC). Neste passo, as diferentes amostras referentes à mesma condição experimental foram reunidas em um mesmo tubo, e a concentração final foi determinada pela absorção a 260 nm. A pureza e

integridade do RNA foram checadas pela razão entre os valores de absorvância a 260 nm e 280 nm, além de eletroforese em gel de agarose 1 %. Todas as manipulações com RNA foram realizadas com soluções preparadas com água DEPC.

III.4.2) qRT-PCR

Após a extração do RNA, 1 µg do RNA total foi tratado com DNase I, RNase-free (Fermentas, Ontario, CA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Em seguida, este RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA utilizando oligo-dT e as condições recomendadas pelo protocolo do Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A integridade do cDNA obtido foi avaliada através de um PCR convencional utilizando *primers* para o gene β-actina de acordo com a seguinte programação da reação de PCR: 95 °C – 5'; 95 °C – 30'', 55 °C – 30'' e 72 °C – 30'' (30x); 72 °C – 5'; 4 °C - ∞. Posteriormente, os produtos de PCR juntamente com um padrão de peso molecular foram aplicados em um gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e revelado por luz UV a fim de confirmar o tamanho esperado de 100 pares de base (pb) do amplicon.

Para a reação de PCR em tempo real quantitativo (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR), foi utilizado o Kit Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA). Foram utilizados 3 µL de cDNA (diluído 1:10), aos quais foram adicionados 7,5 µL do reagente SYBR Green, para um volume total de 15 µL.

Após o preparo da placa MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate (Applied Biosystem), respeitando as condições avaliadas em cada situação, os produtos do gene de serina racemase e de β-actina (normalizador) foram amplificados e analisados utilizando o

sistema de PCR em tempo real 9500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Os valores de ciclo limiar (Ct, do inglês “*cycle threshold*”) foram usados para calcular mudanças na expressão gênica em relação aos controles (DNA de culturas tratadas com veículo apenas) através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Foram realizados três experimentos independentes para cada tempo de incubação com A β (4 ou 12 horas), com culturas obtidas de embriões de ratas diferentes.

III.5) Imunocitoquímica para quantificação de serina racemase em células neuronais e não-neuronais de culturas hipocâmpais

Após 18-19 DIV, foi avaliado o nível de imunodeteção de serina racemase em culturas de hipocampo expostas ou não a A β fibrilar 5 μ M ou ADDLs 500 nM durante 12 horas. As células foram fixadas pela adição de paraformaldeído 4% a igual volume de meio de cultura por 5 minutos, seguido de incubação apenas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Foi utilizado tampão citrato 0,01 M, pH 6 a 50 °C por 10 minutos para permeabilização da membrana nuclear.

As células foram, então, bloqueadas e permeabilizadas por 2 horas em solução contendo 2,5 % de BSA (Sigma), 0,3 % de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, DE) em PBS, em câmara úmida. Após o bloqueio, as células foram incubadas a 4 °C por 12 horas na presença dos anticorpos primários anti-NeuN (monoclonal murino; diluição 1:200; Chemicon, Temecula, CA) e anti-serina racemase (policlonal produzido em cabra; diluição 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram extensamente lavadas com PBS. Anticorpos secundários anti-

IgG murino conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) e anti-IgG de camundongo conjugado a Texas Red (Santa Cruz) foram diluídos em solução de bloqueio a 1:2.000 e 1:100, respectivamente, e adicionados às células. Após 2 horas de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 10 µg/mL de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Calbiochem, La Jolla, CA) por 5 minutos. As lamínulas com as células foram montadas em lâminas na presença de Prolong® e examinadas ao microscópio de fluorescência invertido TE300 Nikon Eclipse. Foram obtidas imagens de cinco campos, aleatoriamente escolhidos, em 3 lamínulas para cada condição experimental.

Os níveis de serina racemase foram determinados pela quantificação da densidade integrada de fluorescência (DIF) das imagens através do programa ImageJ (V1.38, NIH, USA). Para cada experimento, foi determinado um valor de limiar (*threshold*), utilizando 5 imagens aleatórias, a ser utilizado para a análise de todos os conjuntos de imagens. Em seguida, a DIF total de cada condição foi determinada inicialmente. Numa segunda etapa de análise, obteve-se a DIF correspondente apenas às células neuronais (NeuN positivas) e este valor foi dividido pelo número total dessas células. A DIF das células não-neuronais (NeuN negativas) foi obtido pela diferença entre as DIFs total e neuronal, e este valor foi dividido pelo número de células não-neuronais.

DIF serina racemase (DIF SR)

DIF SR neuronal = DIF células NeuN+ / n^o total células NeuN+

DIF SR não-neuronal = (DIF total – DIF células NeuN+) / n^o total células NeuN–

Estes valores normalizados foram usados para a análise estatística não-paramétrica. Foram realizados cinco experimentos independentes, com culturas obtidas de embriões de cinco ratas diferentes.

IV) Resultados

IV.1) Artigo

Os resultados apresentados no artigo a seguir mostram que agregados do peptídeo A β , tanto oligômeros quanto fibrilas, aumentam a concentração extracelular de glutamato e D-serina em culturas neuronais hipocâmpais de rato, e sugerem que o aumento na concentração de glutamato está relacionado à interação do A β com o terminal pós-sináptico e à liberação vesicular pré-sináptica do neurotransmissor. Estes dados reforçam o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na disfunção sináptica observada na doença de Alzheimer (DA). Além disso, verificamos que o aumento do tônus inibitório previne o acúmulo de glutamato, o que pode vir a ter implicações relevantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para prevenir a excitotoxicidade na DA. Estes resultados se encontram atualmente submetidos à publicação.

IV.2) Resultados adicionais

O papel da D-serina como um possível regulador dos receptores NMDA (NMDARs) foi inicialmente visto com ceticismo, pois acreditava-se que os D-aminoácidos não fossem produzidos por mamíferos. A descoberta da enzima responsável pela síntese da D-serina permitiu que consideráveis avanços fossem feitos no estudo dessa área. Wolosker e cols. (Wolosker e cols., 1999a, 1999b; De Miranda e cols., 2002) descobriram que a D-serina endógena é sintetizada pela racemização da L-serina pela serina racemase, uma enzima abundante no cérebro de mamíferos. Animais *knockout* para serina racemase exibem redução na neurotransmissão por NMDAR, menor potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo, e são mais resistentes ao dano provocado pela oclusão arterial num modelo de acidente vascular cerebral (Ma e cols., 2007; Mustafa e cols., 2007). Estes achados sugerem que a D-serina é um co-agonista endógeno fisiologicamente importante dos NMDARs.

Diversos estudos têm implicado a D-serina como co-agonista de NMDARs no fenômeno de excitotoxicidade (Barth e cols., 2004; Lancelot e Beal, 1998; Shleper e cols., 2005; Basu e cols., 2008; Inoue e cols., 2008). Parte da neurotoxicidade mediada por Ca^{2+} exercida pelo peptídeo $\text{A}\beta$, considerado principal fator patológico da DA, pode ser mediada pelo receptor NMDA (Suh e Checler, 2002). Wu e cols. (2004) mostraram que o tratamento com a enzima D-aminoácido oxidase (DAO), que degrada especificamente D-aminoácidos, protege neurônios hipocámpais contra a entrada excessiva de Ca^{2+} induzida por $\text{A}\beta$. Recentemente, Inoue e cols. (2008) demonstraram que o dano excitotóxico mediado por NMDA e $\text{A}\beta$ é reduzido em animais *knockout* para serina racemase.

Com o objetivo de aprofundar o estudo da relação entre o peptídeo A β e o aumento da concentração de D-serina no meio extracelular (ver artigo em anexo), utilizamos o mesmo modelo experimental usado nas dosagens de aminoácidos apresentadas no item IV.1 (Resultados) para determinar uma possível modulação da expressão da serina racemase. Como detalhado na seção “Métodos”, culturas neuronais hipocampais maduras foram tratadas com ADDLs 500 nM ou A β 5 μ M por 4 horas a 37 °C e as células foram processadas para *Western blotting* para serina racemase. A Figura 8 mostra que estes tratamentos não alteram os níveis da enzima medidos por *immunoblots*, mesmo com um tempo de exposição mais longo (12 horas, Figura 8B).

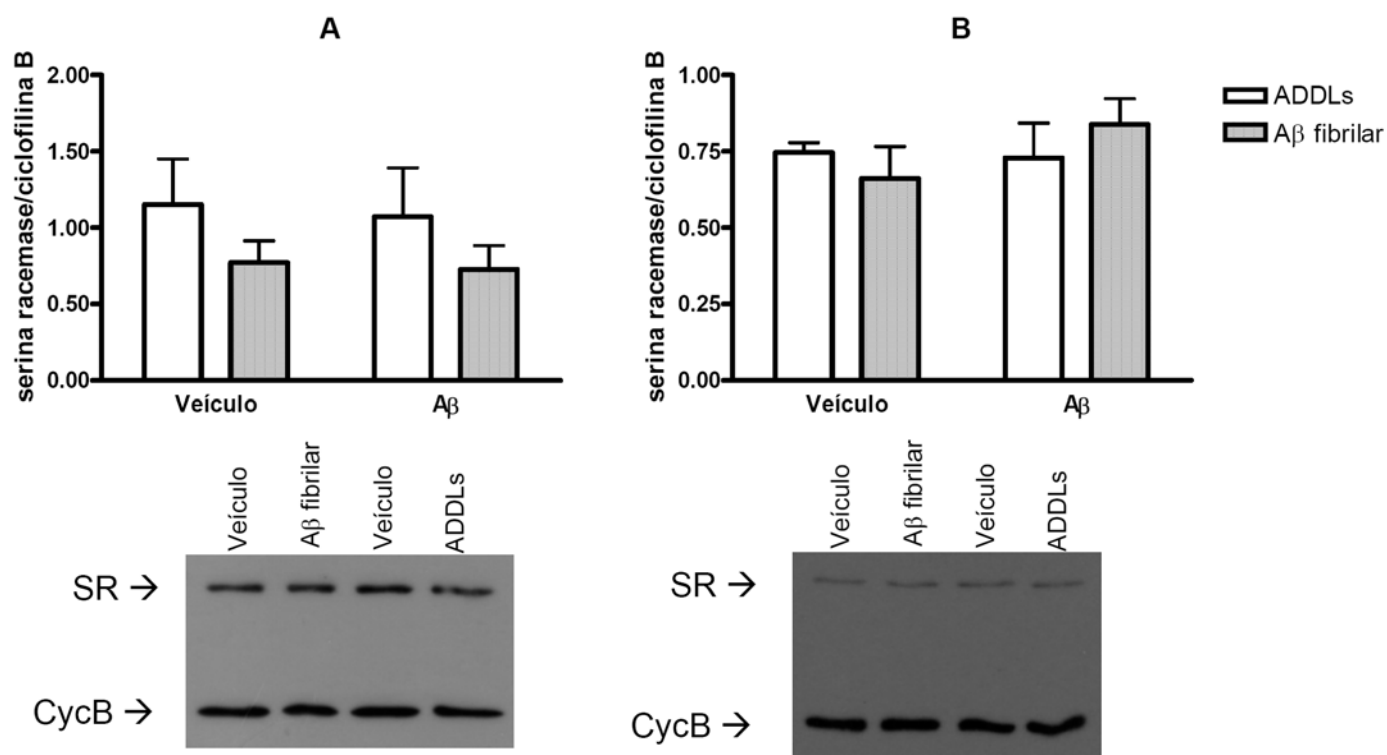


Figura 8: ADDLs ou A β fibrilar não alteram o conteúdo de serina racemase em neurônios hipocampais. Culturas de neurônios hipocampais 19-21 DIV foram expostas a 500 nM de ADDLs ou 5 μ M de A β fibrilar por quatro (A) ou doze (B) horas. O lisado celular foi coletado para *Western blot*, com imunomarcagem para serina racemase (SR, 37,5 kDa) e ciclofilina B (CycB, controle de carregamento, 19 kDa). Seis (A β fibrilar, 12 horas) ou quatro (demais tratamentos) experimentos independentes foram realizados. Os valores estão expressos como relação entre a densidade da banda de SR e a da banda de CycB, e correspondem à média \pm EP.

Diversos trabalhos mostram que o A β ativa o fenótipo inflamatório em microglia, principal célula envolvida na defesa do sistema nervoso central (Meda e cols., 1995; Giulian e cols., 1996; McDonald e cols., 1997). No trabalho de Wu e cols. (2004), foi demonstrado que a exposição de células microgliais a 15 μ M de A β em cultura por 12 horas eleva os níveis de serina racemase e de seu RNAm. Com o objetivo de aprofundar o entendimento sobre uma possível modulação da síntese de serina racemase pelo peptídeo A β , medimos a expressão da enzima em culturas neuronais hipocampais maduras expostas a 5 μ M de A β por 4 e 12 horas através de RT-qPCR. A Figura 9 mostra que há uma aparente subexpressão de SR com o tratamento de 4 horas (painel A), que é estatisticamente significativa com uma incubação mais longa (12 horas, painel B).

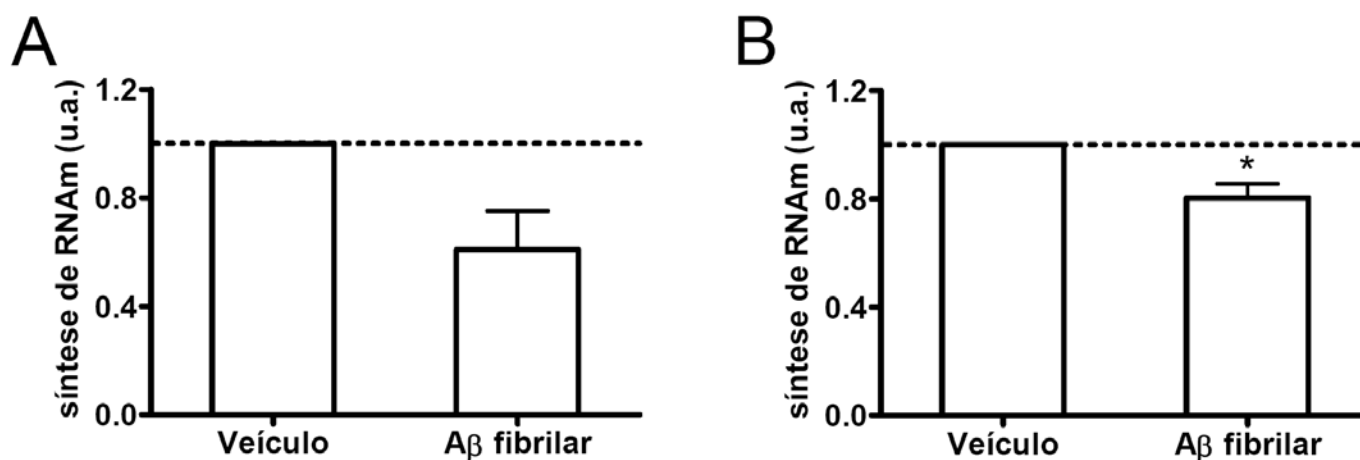


Figura 9: Exposição crônica de A β fibrilar reduz a expressão de serina racemase (SR) em culturas de neurônios hipocampais.

Culturas de neurônios hipocampais (18-21 DIV) foram expostas a 5 μ M de A β fibrilar ou veículo (controle) por quatro (A) ou doze horas (B). O mRNA total foi extraído para qRT-PCR dos genes de serina racemase e β -actina (normalizador). Três experimentos independentes com diferentes culturas hipocampais foram realizados para cada tempo de incubação. Foram obtidos os valores de ciclo limiar (Ct, do inglês “*cycle threshold*”) para o cálculo, através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, do número de vezes de mudanças (“*fold changes*”) na expressão gênica de serina racemase em relação às culturas tratadas com veículos. O resultado corresponde à média \pm EP.

Os níveis de serina racemase em culturas neuronais hipocampais expostas ao A β também foram avaliados através de imunocitoquímica. As células foram marcadas com anticorpos específicos para neurônios (antígeno nuclear NeuN) e para serina racemase, visando à quantificação específica nestas células (para mais detalhes, ver item II.4, “Métodos”). O resultado apresentado na Figura 10 mostra que agregados fibrilares de A β , incubados por 12 horas, aumentam os níveis de serina racemase em neurônios hipocampais (células NeuN-positivas). Por outro lado, não detectamos alteração nos níveis de SR em neurônios expostos a 500 nM ADDLs por 12 horas. Não foi observada nenhuma alteração da expressão de SR em células não-neuronais (NeuN-negativas, dados não apresentados).

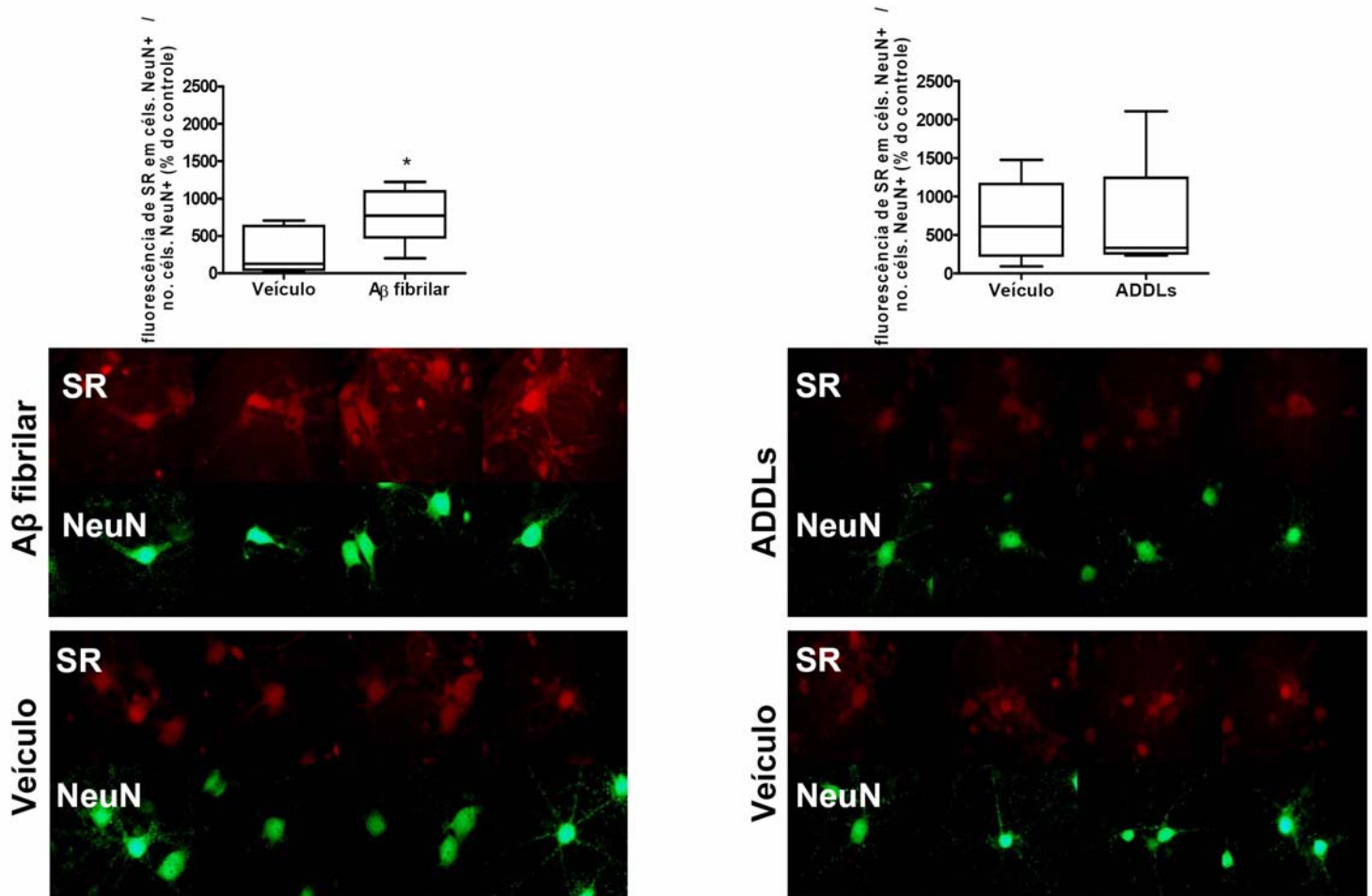


Figura 10: Aβ fibrilar, mas não ADDLs, aumenta o conteúdo de serina racemase avaliado por imunocitoquímica em células neuronais.

Culturas hipocâmpais (18 DIV) foram expostas a ADDLs ou Aβ fibrilar por 12 horas. Foi feita imunocitoquímica para determinar o conteúdo de serina racemase (SR) em células neuronais (células positivas para NeuN). Cinco experimentos independentes foram feitos (três lamínulas por tratamento em cada ensaio). Valores expressos correspondem à média ± EP das intensidade de fluorescência quantificadas. Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas através de teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$). Aumento: 60x.

V) Discussão

Passados pouco mais de 100 anos desde a primeira descrição de caso da doença de Alzheimer (DA), e cerca de 20 anos da descrição do peptídeo beta-amilóide (A β) como o principal componente dos depósitos presentes nas placas amilóides, diversos mecanismos foram propostos para explicar a toxicidade do A β . Estes mecanismos não são excludentes; ao contrário, a toxicidade do A β manifesta-se de diversas formas diferentes (Small e cols., 2001), atingindo neurônios e células gliais. Dentre estes mecanismos, está a excitotoxicidade glutamatérgica, que não é um fenômeno exclusivo da DA, tendo seu envolvimento descrito também em quadros patológicos como epilepsia e trauma, dentre outros (Bittigau e Ikonomidou, 1997). Neste sentido, existem hoje diversas evidências relacionando o peptídeo beta-amilóide à excitotoxicidade glutamatérgica (e.g., Tominaga-Yoshino e cols., 2001; Louzada e cols., 2001; Miguel-Hidalgo e cols., 2002)

É importante frisar que vários trabalhos indicam funções fisiológicas para o A β , como na modulação da plasticidade sináptica (para um exemplo recente, ver Puzzo e cols., 2008). No entanto, é bem descrito também que sua agregação é etapa determinante para o início de seus efeitos patológicos. O A β agrega-se rapidamente formando as chamadas fibrilas amilóides, estruturas insolúveis que foram as primeiras a receber atenção da comunidade científica, porque compõem as placas senis encontradas no cérebro DA (Glener e Wong, 1984). Durante muitos anos, acreditou-se que as fibrilas exerciam papel principal na disfunção neuronal observada na DA, com um grande número de trabalhos mostrando seus efeitos neurotóxicos *in vivo* e *in vitro* (Small e cols., 2001). No entanto, há cerca de 10 anos Lambert e cols. (1998) demonstraram que pequenos oligômeros solúveis do A β

(denominados ADDLs por aqueles pesquisadores) podem também ser formados a partir da agregação do A β , se ligam a neurônios *in vitro* e exercem, em concentração nanomolar, pronunciado efeito neurotóxico. Além disso, Dodart e cols. (2002) e Kotilinek e cols. (2002) demonstraram que a imunização de modelo murino de DA contra o peptídeo beta-amilóide foi capaz de reverter a perda de memória observada, mas sem redução da quantidade de placas amilóides presentes no cérebro destes animais. Estas evidências não excluem os efeitos neurotóxicos das fibrilas, mas foram os primeiros fortes indícios de que deveria haver outras formas de A β envolvidas no surgimento dos primeiros sintomas da doença (perda de memória, *deficit* cognitivo), antes da evolução para extensiva morte neuronal característica dos estágios mais avançados da DA.

Devido à alta relevância do papel dos ADDLs na patogênese da DA (para revisões, ver Klein e cols., 2003; Freeman, 2003; Klein, 2006; Ferreira e cols., 2007), estabelecemos o preparo semanal destes oligômeros no laboratório, e hoje quase todas as linhas de pesquisa do laboratório investigam seus efeitos sobre diversos aspectos neurofisiológicos e neuroquímicos. Durante meu trabalho de Mestrado, mantive a responsabilidade de preparar e caracterizar os ADDLs, responsabilidade esta que recebi ainda na Iniciação Científica. Por serem metaestáveis, estes oligômeros devem ser preparados e caracterizados semanalmente, tarefa crucial para a manutenção da uniformidade das preparações entre os projetos.

No presente trabalho, mostramos que tanto oligômeros (ADDLs) quanto fibrilas de A β induzem o aumento da concentração de glutamato e D-serina no meio extracelular de culturas hipocámpais enriquecidas em neurônios. A maior parte dos trabalhos que relacionam o A β à excitotoxicidade trabalha com modelos gliais (Parpura-Gill e cols.,

1997; Noda e cols., 1999; Harjany e cols., 2000), havendo poucos que mostrem tal fenômeno em uma população celular neuronal (Fernandez-Tome e cols., 2004). Além disso, é importante ressaltar que a excitotoxicidade é disparada pela ativação excessiva de receptores de glutamato, sendo, portanto, um fenômeno sináptico. Os aumentos de concentração de glutamato e D-serina por nós verificados (ver “Resultados”), foram detectados no meio extracelular das culturas, sugerindo que o aumento de concentração real na fenda sináptica seja muito maior. Outra observação importante é que o tempo de incubação com agregados de A β por nós utilizado (4 horas) foi sub-letal, ou seja, estudamos um mecanismo que pode contribuir para o disparo da excitotoxicidade na ausência de morte celular e extravazamento de conteúdos intracelulares. Este é um ponto relevante, porque desta forma pudemos estudar e entender melhor os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade mediada pelo A β antes do início da morte neuronal, momento a partir do qual abordagens terapêuticas se tornarão menos eficientes.

A concentração adequada de glutamato na fenda sináptica, necessária para a ativação apropriada dos seus receptores, varia numa faixa pequena e bem delimitada. Portanto, é necessário que haja uma regulação fina e eficiente dos níveis deste aminoácido nas sinapses. Desta regulação dependem fenômenos como plasticidade sináptica, aprendizado, formação de memória, etc. Neste sistema de regulação, os astrócitos desempenham papel crucial na manutenção dos níveis de glutamato na fenda. Prova de sua importância é o conceito de sinapse tripartida, adotado recentemente (Araque e cols., 1999). Ensaios prévios de imunocitoquímica revelaram que as culturas neuronais maduras usadas (18 dias *in vitro*, DIV) apresentam cerca de 20% de células gliais. No entanto, nas nossas condições experimentais, o pré-tratamento com ácido D(+)-threo-3-hidroxiaspártico (THA), um

bloqueador de recaptadores de glutamato, não aumentou os níveis deste aminoácido no meio. Isto sugere que o bloqueio da recaptação glial não afeta os níveis de glutamato no meio extracelular e, por isso, a recaptação provavelmente não está envolvida no acúmulo deste aminoácido induzido por ADDLs e fibrilas de A β observado em nosso modelo experimental.

Dentre os receptores envolvidos na excitotoxicidade, destaca-se o receptor NMDA (NMDAR) como principal receptor envolvido neste fenômeno. Para confirmar se o aumento dos níveis de glutamato observado teria relação com a ativação dos NMDARs, tratamos culturas neuronais hipocampais maduras com MK-801, um antagonista não-competitivo destes receptores. A incubação prévia das culturas com MK-801 reduziu o aumento de glutamato no meio extracelular induzido por A β . Além disso, a pré-incubação com tetrodotoxina (TTX), um bloqueador de canais de Na⁺, apresentou o mesmo resultado. Estes dados sugerem, portanto, que a ativação dos NMDAR e a propagação dos potenciais de ação são necessários para o aumento na concentração de glutamato provocado por ADDLs e fibrilas de A β , e fortalece a idéia do envolvimento neuronal na excitotoxicidade mediada por A β .

A maior parte do glutamato lançado pelos neurônios na sinapse é liberado através de vesículas, cuja fusão à membrana pré-sináptica libera seu conteúdo na fenda (Tong e Jahr, 1994; Walton e Dodd, 2007). A sinalização por íons Ca²⁺ é parte fundamental da maquinaria envolvida na formação e fusão destas vesículas. Dada a sua importância, investigamos se esta via de liberação estaria relacionada ao aumento de glutamato observado. De fato, observamos que num ambiente livre de Ca²⁺, nem ADDLs nem A β fibrilar provocaram aumento na concentração de glutamato, indicando que a

excitotoxicidade disparada pelo A β depende da liberação vesicular de glutamato.

Reforçando esta hipótese estão os dados obtidos em colaboração com o grupo do Prof. Luis Aguayo, (Universidad de Concepción, Chile), que mostram um aumento significativo na liberação de vesículas pré-sinápticas e no número de potenciais de ação excitatórios (excitatory post synaptic potentials, EPSPs) espontâneos em culturas neuronais expostas a oligômeros de A β .

Até os dias atuais, a abordagem terapêutica clássica no combate à excitotoxicidade é o bloqueio da despolarização de membrana neuronal, ou seja, da neurotransmissão excitatória. Exemplo disto é a memantina, um dos principais fármacos hoje utilizados no tratamento da DA (Cosman e cols., 2007; Parsons e cols., 2007), cujo efeito terapêutico se dá através do bloqueio dos NMDARs. No entanto, este tipo de abordagem possui a grave limitação de reduzir um tipo de neurotransmissão diretamente envolvida no funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Neste sentido, nosso laboratório vem trabalhando há alguns anos com uma abordagem alternativa: contrabalancear o excesso de despolarização com o aumento da hiperpolarização, ou seja, da neurotransmissão inibitória. Nosso grupo publicou inicialmente trabalhos (Paula-Lima e cols., 2003; Louzada e cols., 2004) mostrando que o aumento da hiperpolarização é capaz de proteger neurônios de retina de embrião de galinha (um modelo extensivamente utilizado neste tipo de estudo) da morte celular induzida pelo A β e pelo excesso de glutamato. Para isso, utilizamos agonistas dos receptores GABA_A (GABA_ARs), envolvidos na neurotransmissão inibitória, como melatonina, fenobarbital e taurina. Mais recentemente, mostramos também que a ativação dos GABA_ARs pela taurina ou pelo muscimol é capaz de preservar a viabilidade de culturas neuronais de hipocampo e córtex de embrião de rato expostas ao A β (Paula-Lima e cols., 2005). No presente trabalho, verificamos que o aumento do tônus inibitório através da

exposição à taurina bloqueou o aumento na concentração de glutamato que observamos em nosso modelo experimental. Por ser um aminoácido endógeno, não tóxico, capaz de impedir a morte neuronal provocada pelo A β , e capaz de bloquear o aumento na concentração de glutamato antes do desenvolvimento da excitotoxicidade, a taurina apresenta um perfil promissor como fármaco na prevenção e combate aos sintomas da DA.

Visando aprofundar nossos estudos sobre o aumento dos níveis de D-serina, decidimos avaliar uma possível modulação, pelo A β , sobre a expressão de serina racemase (SR). A SR é a enzima responsável pela síntese de D-serina, e foi descrita inicialmente em células gliais (Wolosker e cols., 1999), mas alguns trabalhos mostram que também é expressa e mais abundante em neurônios (Kartvelishvily e cols., 2006; Miya e cols., 2008). Desta forma, determinamos por *Western blot* que ADDLs e A β fibrilar não alteram os níveis de SR em neurônios hipocâmpais expostos por 4 ou 12 horas aos agregados de A β , sugerindo que o aumento observado na concentração de D-serina não está relacionado a um aumento na expressão da enzima. No entanto, a análise da síntese de RNAm de SR, por PCR quantitativo (qPCR), em neurônios hipocâmpais expostos a A β fibrilar por 12 horas revelou significativa redução na expressão desta enzima. Embora as razões para este decréscimo ainda não estejam totalmente claras, este dado poderia ser interpretado como uma tentativa inicial, pelos neurônios, de combater o acúmulo de D-serina provocado pelo A β , impedindo a ativação excessiva dos NMDARs que conduzirá à excitotoxicidade.

Estas evidências, no entanto, não excluem a participação de neurônios no aumento do conteúdo extracelular de D-serina. Kartvelishvily e cols. (2006) demonstraram que a ativação de receptores de glutamato neuronais provoca o aumento da liberação de D-serina por estas células, o que está de acordo com nosso modelo. Além disso, podemos considerar

também que o acúmulo de D-serina decorra do aumento de atividade da SR ou mesmo da alteração do transporte deste aminoácido entre os meios intra e extracelular (mecanismos estes que serão investigados futuramente por nosso grupo). Fortalecendo a idéia de participação neuronal na excitotoxicidade mediada por D-serina, Inoue e cols. (2008) demonstraram que camundongos *knockout* para SR são menos susceptíveis à neurotoxicidade induzida por NMDA e A β . Portanto, independente do mecanismo envolvido, o acúmulo de D-serina observado por nosso grupo reforça a idéia de uma ativação excessiva dos NMDARs, que conduzirá então à excitotoxicidade observada na DA.

Em conclusão, nesta dissertação verificamos que agregados de A β induzem o aumento da concentração de aminoácidos excitatórios em ambiente neuronal, e que o aumento de glutamato está, ao menos em parte, relacionado à liberação vesicular sináptica. Observamos também que o acúmulo extracelular de D-serina observado não está relacionado ao aumento da expressão de serina racemase, podendo decorrer do acúmulo extracelular de glutamato. Por estes eventos ocorrerem antes da morte neuronal, o presente trabalho traz informações relevantes para o entendimento da patogênese da doença de Alzheimer e o desenvolvimento de terapias preventivas. Neste sentido, o aminoácido taurina apresenta-se como promissora abordagem terapêutica na prevenção e tratamento dos sintomas devastadores provocados pela DA.

VI) Referências

1. ABRAMOFF, M. D., MAGELHAES, P. J., RAM, S. J. **Image processing with ImageJ**. *Biophotonics Int.* 11[7], 36-42. 2004.
2. ALBIN R. L., GREENAMYRE J. T. (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. **Neurology** 42:4 733-738.
3. ALZHEIMER A., STELZMANN R. A., SCHNITZLEIN H. N., MURTAGH F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". **Clin Anat** 8:6 429-431.
4. ARRASATE M., MITRA S., SCHWEITZER E. S., SEGAL M. R., FINKBEINER S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. **Nature** 431:7010 805-810.
5. BARTH A., NGUYEN L. B., BARTH L., NEWELL D. W. (2005) Glycine-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Exp Brain Res** 161:3 351-357.
6. BASU A. C., TSAI G. E., MA C. L., EHMSSEN J. T., MUSTAFA A. K., HAN L., JIANG Z. I., BENNEYWORTH M. A., FROIMOWITZ M. P., LANGE N., SNYDER S. H., BERGERON R., COYLE J. T. (2008) Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. **Mol Psychiatry**.
7. BERTRAM L., TANZI R. E. (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. **J Clin Invest** 115:6 1449-1457.
8. BITTIGAU P., IKONOMIDOU C. (1997) Glutamate in neurologic diseases. **J Child Neurol** 12:8 471-485.
9. BLANC E. M., KELLER J. N., FERNANDEZ S., MATTSON M. P. (1998) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. **Glia** 22:2 149-160.
10. BRAAK H., BRAAK E., BOHL J. (1993) Staging of Alzheimer-related cortical destruction. **Eur Neurol** 33:6 403-408.
11. BRAAK H., BRAAK E. (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. **J Neural Transm Suppl** 53: 127-140.
12. BRORSON J. R., BINDOKAS V. P., IWAMA T., MARCUCCILLI C. J., CHISHOLM J. C., MILLER R. J. (1995) The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. **J Neurobiol** 26:3 325-338.

13. BUSSIÈRE T., GIANNAKOPOULOS P., BOURAS C., PERL D. P., MORRISON J. H., HOF P. R. (2003) Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. **J Comp Neurol** 463:3 281-302.
14. BUTTERFIELD D. A., HENSLEY K., HARRIS M., MATTSON M., CARNEY J. (1994) beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. **Biochem Biophys Res Commun** 200:2 710-715.
15. CAUGHEY B., LANSBURY P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. **Annu Rev Neurosci** 26: 267-298.
16. CHAUDHRY F. A., LEHRE K. P., VAN LOOKEREN C. M., OTTERSEN O. P., DANBOLT N. C., STORM-MATHISEN J. (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron** 15:3 711-720.
17. CHOI D. W., ROTHMAN S. M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci** 13: 171-182.
18. CHOI D. W. (1992) Excitotoxic cell death. **J Neurobiol** 23:9 1261-1276.
19. CHOUINARD M. L., GAITAN D., WOOD P. L. (1993) Presence of the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor agonist, D-serine, in human temporal cortex: comparison of normal, Parkinson, and Alzheimer tissues. **J Neurochem** 61:4 1561-1564.
20. CONTI F., DEBIASI S., MINELLI A., ROTHSTEIN J. D., MELONE M. (1998) EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. **Cereb Cortex** 8:2 108-116.
21. COSMAN K. M., BOYLE L. L., PORSTEINSSON A. P. (2007) Memantine in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Expert Opin Pharmacother** 8:2 203-214.
22. CROSS A. J., SLATER P., SIMPSON M., ROYSTON C., DEAKIN J. F., PERRY R. H., PERRY E. K. (1987) Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Neurosci Lett** 79:1-2 213-217.
23. D'ANIELLO A., DI FIORE M. M., FISHER G. H., MILONE A., SELENI A., D'ANIELLO S., PERNA A. F., INGROSSO D. (2000) Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the

- modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. **FASEB J** 14:5 699-714.
24. D'ANIELLO G., TOLINO A., D'ANIELLO A., ERRICO F., FISHER G. H., DI FIORE M. M. (2000) The role of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. **Endocrinology** 141:10 3862-3870.
 25. DANBOLT N. C. (2001) Glutamate uptake. **Prog Neurobiol** 65:1 1-105.
 26. DANYSZ W., PARSONS C. G. (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol Rev** 50:4 597-664.
 27. DE CEBALLOS M. L., BRERA B., FERNANDEZ-TOME M. P. (2001) beta-Amyloid-induced cytotoxicity, peroxide generation and blockade of glutamate uptake in cultured astrocytes. **Clin Chem Lab Med** 39:4 317-318.
 28. DE FELICE F. G., VELASCO P. T., LAMBERT M. P., VIOLA K., FERNANDEZ S. J., FERREIRA S. T., KLEIN W. L. (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J Biol Chem** 282:15 11590-11601.
 29. DE M. J., PANIZZUTTI R., FOLTYN V. N., WOLOSKER H. (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99:22 14542-14547.
 30. DICKSON D. W. (1997a) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. **Neurobiol Aging** 18:4 Suppl S21-S26.
 31. DICKSON D. W. (1997b) The pathogenesis of senile plaques. **J Neuropathol Exp Neurol** 56:4 321-339.
 32. FADDA E., DANYSZ W., WROBLEWSKI J. T., COSTA E. (1988) Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. **Neuropharmacology** 27:11 1183-1185.
 33. FAGG G. E., MATUS A. (1984) Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities. **Proc Natl Acad Sci U S A** 81:21 6876-6880.
 34. FERNANDEZ-TOME P., BRERA B., AREVALO M. A., DE CEBALLOS M. L. (2004) Beta-amyloid₂₅₋₃₅ inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. **Neurobiol Dis** 15:3 580-589.

35. FERREIRA S. T., VIEIRA M. N., DE FELICE F. G. (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. **IUBMB Life** 59:4-5 332-345.
36. FERRI C. P., PRINCE M., BRAYNE C., BRODATY H., FRATIGLIONI L., GANGULI M., HALL K., HASEGAWA K., HENDRIE H., HUANG Y., JORM A., MATHERS C., MENEZES P. R., RIMMER E., SCAZUFCA M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet** 366:9503 2112-2117.
37. FISHER G., LORENZO N., ABE H., FUJITA E., FREY W. H., EMORY C., DI FIORE M. M., D' ANIELLO A. (1998) Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. **Amino Acids** 15:3 263-269.
38. FRANCIS P. T., PANGALOS M. N., BOWEN D. M. (1992) Animal and drug modelling for Alzheimer synaptic pathology. **Prog Neurobiol** 39:5 517-545.
39. FREEMAN K. (2003) ADDLs: a new explanation for Alzheimer disease? **Environ Health Perspect** 111:15 A810.
40. FRICK A., ZIEGLGANSBERGER W., DODT H. U. (2001) Glutamate receptors form hot spots on apical dendrites of neocortical pyramidal neurons. **J Neurophysiol** 86:3 1412-1421.
41. FUJIKAWA D. G. (2005) Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. **Epilepsy Behav** 7 Suppl 3: S3-11.
42. GHISO J., CALERO M., MATSUBARA E., GOVERNALE S., CHUBA J., BEAVIS R., WISNIEWSKI T., FRANGIONE B. (1997) Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. **FEBS Lett** 408:1 105-108.
43. GIULIAN D., HAVERKAMP L. J., YU J. H., KARSHIN W., TOM D., LI J., KIRKPATRICK J., KUO L. M., ROHER A. E. (1996) Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. **J Neurosci** 16:19 6021-6037.
44. GLENNER G. G., WONG C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochem Biophys Res Commun** 122:3 1131-1135.
45. GONG Y., CHANG L., VIOLA K. L., LACOR P. N., LAMBERT M. P., FINCH C. E., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:18 10417-10422.
46. GOODMAN Y., MATTSON M. P. (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. **Exp Neurol** 128:1 1-12.

47. GOODMAN Y., BRUCE A. J., CHENG B., MATTSON M. P. (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. **J Neurochem** 66:5 1836-1844.
48. GRALLE M., FERREIRA S. T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. **Prog Neurobiol** 82:1 11-32.
49. GREENAMYRE J. T., PENNEY J. B., YOUNG A. B., D'AMATO C. J., HICKS S. P., SHOULSON I. (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. **Science** 227:4693 1496-1499.
50. GREENAMYRE J. T., HIGGINS D. S., YOUNG A. B. (1990) Sodium-dependent D-aspartate 'binding' is not a measure of presynaptic neuronal uptake sites in an autoradiographic assay. **Brain Res** 511:2 310-318.
51. GUO Q., FURUKAWA K., SOPHER B. L., PHAM D. G., XIE J., ROBINSON N., MARTIN G. M., MATTSON M. P. (1996) Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. **Neuroreport** 8:1 379-383.
52. GUO Q., SOPHER B. L., FURUKAWA K., PHAM D. G., ROBINSON N., MARTIN G. M., MATTSON M. P. (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. **J Neurosci** 17:11 4212-4222.
53. GUO Q., FU W., SOPHER B. L., MILLER M. W., WARE C. B., MARTIN G. M., MATTSON M. P. (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. **Nat Med** 5:1 101-106.
54. GUSTAFSON E. C., STEVENS E. R., WOLOSKER H., MILLER R. F. (2007) Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. **J Neurophysiol** 98:1 122-130.
55. HARDY J., SELKOE D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science** 297:5580 353-356.
56. HARDY J. (2006) A hundred years of Alzheimer's disease research. **Neuron** 52:1 3-13.
57. HARKANY T., ABRAHAM I., TIMMERMAN W., LASKAY G., TOTTH B., SASVARI M., KONYA C., SEBENS J. B., KORF J., NYAKAS C., ZARANDI M., SOOS K., PENKE B., LUITEN P. G. (2000) beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. **Eur J Neurosci** 12:8 2735-2745.

58. HARRIS K. M., SULTAN P. (1995) Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. **Neuropharmacology** 34:11 1387-1395.
59. HARRIS M. E., WANG Y., PEDIGO N. W., JR., HENSLEY K., BUTTERFIELD D. A., CARNEY J. M. (1996) Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. **J Neurochem** 67:1 277-286.
60. HASHIMOTO K., FUKUSHIMA T., SHIMIZU E., OKADA S., KOMATSU N., OKAMURA N., KOIKE K., KOIZUMI H., KUMAKIRI C., IMAI K., IYO M. (2004) Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 28:2 385-388.
61. HE Y., JANSSEN W. G., ROTHSTEIN J. D., MORRISON J. H. (2000) Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. **J Comp Neurol** 418:3 255-269.
62. HEALY J., DOWNES A., MCBEAN G. J. (2000) Stimulation of synaptosomal D-[3H]aspartate transport by substance P in rat brain. **Neurosci Lett** 290:2 113-116.
63. HENSLEY K., CARNEY J. M., MATTSON M. P., AKSENOVA M., HARRIS M., WU J. F., FLOYD R. A., BUTTERFIELD D. A. (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91:8 3270-3274.
64. HUBBARD B. M., ANDERSON J. M. (1985) Age-related variations in the neuron content of the cerebral cortex in senile dementia of Alzheimer type. **Neuropathol Appl Neurobiol** 11:5 369-382.
65. HYND M. R., SCOTT H. L., DODD P. R. (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int** 45:5 583-595.
66. INOUE R., HASHIMOTO K., HARAI T., MORI H. (2008) NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. **J Neurosci** 28:53 14486-14491.
67. JOHNSON J. W., ASCHER P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature** 325:6104 529-531.
68. JUNJAUD G., ROUAUD E., TURPIN F., MOTHET J. P., BILLARD J. M. (2006) Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. **J Neurochem** 98:4 1159-1166.

69. KARTVELISHVILY E., SHLEPER M., BALAN L., DUMIN E., WOLOSKER H. (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. **J Biol Chem** 281:20 14151-14162.
70. KATSUKI H., NONAKA M., SHIRAKAWA H., KUME T., AKAIKE A. (2004) Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices. **J Pharmacol Exp Ther** 311:2 836-844.
71. KELLER J. N., PANG Z., GEDDES J. W., BEGLEY J. G., GERMEYER A., WAEG G., MATTSON M. P. (1997) Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. **J Neurochem** 69:1 273-284.
72. KELLER J. N., KINDY M. S., HOLTSBERG F. W., ST CLAIR D. K., YEN H. C., GERMEYER A., STEINER S. M., BRUCE-KELLER A. J., HUTCHINS J. B., MATTSON M. P. (1998) Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. **J Neurosci** 18:2 687-697.
73. KEW J. N., KEMP J. A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)** 179:1 4-29.
74. KIM P. M., AIZAWA H., KIM P. S., HUANG A. S., WICKRAMASINGHE S. R., KASHANI A. H., BARROW R. K., HUGANIR R. L., GHOSH A., SNYDER S. H. (2005) Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102:6 2105-2110.
75. KOH J. Y., YANG L. L., COTMAN C. W. (1990) Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. **Brain Res** 533:2 315-320.
76. KUGLER P., SCHMITT A. (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. **Glia** 27:2 129-142.
77. LAMBERT M. P., BARLOW A. K., CHROMY B. A., EDWARDS C., FREED R., LIOSATOS M., MORGAN T. E., ROZOVSKY I., TROMMER B., VIOLA K. L., WALSH P., ZHANG C., FINCH C. E., KRAFFT G. A., KLEIN W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95:11 6448-6453.
78. LERMA J., ZUKIN R. S., BENNETT M. V. (1990) Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87:6 2354-2358.

79. LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 25:4 402-408.
80. LOUZADA P. R., PAULA LIMA A. C., MENDONCA-SILVA D. L., NOEL F., DE MELLO F. G., FERREIRA S. T. (2004) Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. **FASEB J** 18:3 511-518.
81. LOUZADA P. R., JR., PAULA LIMA A. C., DE MELLO F. G., FERREIRA S. T. (2001) Dual role of glutamatergic neurotransmission on amyloid beta(1-42) aggregation and neurotoxicity in embryonic avian retina. **Neurosci Lett** 301:1 59-63.
82. LUE L. F., KUO Y. M., ROHER A. E., BRACHOVA L., SHEN Y., SUE L., BEACH T., KURTH J. H., RYDEL R. E., ROGERS J. (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. **Am J Pathol** 155:3 853-862.
83. LYNCH T., CHERNY R. A., BUSH A. I. (2000) Oxidative processes in Alzheimer's disease: the role of abeta-metal interactions. **Exp Gerontol** 35:4 445-451.
84. MARK R. J., HENSLEY K., BUTTERFIELD D. A., MATTSON M. P. (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. **J Neurosci** 15:9 6239-6249.
85. MASLIAH E., ALFORD M., DETERESA R., MALLORY M., HANSEN L. (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 40:5 759-766.
86. MATTSON M. P., CHENG B., DAVIS D., BRYANT K., LIEBERBURG I., RYDEL R. E. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. **J Neurosci** 12:2 376-389.
87. MATTSON M. P., GOODMAN Y. (1995) Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. **Brain Res** 676:1 219-224.
88. MATTSON M. P. (1997) Advances fuel Alzheimer's conundrum. **Nat Genet** 17:3 254-256.
89. MATTSON M. P., CHAN S. L. (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. **Cell Calcium** 34:4-5 385-397.

90. MATTSON M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature** 430:7000 631-639.
91. MCBAIN C. J., KLECKNER N. W., WYRICK S., DINGLEDINE R. (1989) Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Mol Pharmacol** 36:4 556-565.
92. MCBEAN G. J., ROBERTS P. J. (1985) Neurotoxicity of L-glutamate and DL-threo-3-hydroxyaspartate in the rat striatum. **J Neurochem** 44:1 247-254.
93. MCDONALD D. R., BRUNDEN K. R., LANDRETH G. E. (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. **J Neurosci** 17:7 2284-2294.
94. MCLEAN C. A., CHERNY R. A., FRASER F. W., FULLER S. J., SMITH M. J., BEYREUTHER K., BUSH A. I., MASTERS C. L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 46:6 860-866.
95. MEDA L., CASSATELLA M. A., SZENDREI G. I., OTVOS L., JR., BARON P., VILLALBA M., FERRARI D., ROSSI F. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. **Nature** 374:6523 647-650.
96. MEERA P., DODSON P. D., KARAKOSSIAN M. H., OTIS T. S. (2005) Expression of GFP-tagged neuronal glutamate transporters in cerebellar Purkinje neurons. **Neuropharmacology** 49:6 883-889.
97. MIGUEL-HIDALGO J. J., ALVAREZ X. A., CACABELOS R., QUACK G. (2002) Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). **Brain Res** 958:1 210-221.
98. MIYA K., INOUE R., TAKATA Y., ABE M., NATSUME R., SAKIMURA K., HONGOU K., MIYAWAKI T., MORI H. (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. **J Comp Neurol** 510:6 641-654.
99. MONAGHAN D. T., BRIDGES R. J., COTMAN C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 29: 365-402.
100. MOTHET J. P., PARENT A. T., WOLOSKER H., BRADY R. O., JR., LINDEN D. J., FERRIS C. D., ROGAWSKI M. A., SNYDER S. H. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97:9 4926-4931.
101. MOUNTJOY C. Q., ROTH M., EVANS N. J., EVANS H. M. (1983) Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. **Neurobiol Aging** 4:1 1-11.

102. NAGATA Y., BORGHI M., FISHER G. H., D'ANIELLO A. (1995) Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. **Brain Res Bull** 38:2 181-183.
103. NASLUND J., HAROUTUNIAN V., MOHS R., DAVIS K. L., DAVIES P., GREENGARD P., BUXBAUM J. D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. **JAMA** 283:12 1571-1577.
104. NIEOULLON A., CANOLLE B., MASMEJEAN F., GUILLET B., PISANO P., LORTET S. (2006) The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? **J Neurochem** 98:4 1007-1018.
105. NODA M., NAKANISHI H., AKAIKE N. (1999) Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. **Neuroscience** 92:4 1465-1474.
106. NONG Y., HUANG Y. Q., JU W., KALIA L. V., AHMADIAN G., WANG Y. T., SALTER M. W. (2003) Glycine binding primes NMDA receptor internalization. **Nature** 422:6929 302-307.
107. OLVERMAN H. J., JONES A. W., MEWETT K. N., WATKINS J. C. (1988) Structure/activity relations of N-methyl-D-aspartate receptor ligands as studied by their inhibition of [³H]D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid binding in rat brain membranes. **Neuroscience** 26:1 17-31.
108. PALMER A. M. (1996) Neurochemical studies of Alzheimer's disease. **Neurodegeneration** 5:4 381-391.
109. PANATIER A., THEODOSIS D. T., MOTHET J. P., TOUQUET B., POLLEGIONI L., POULAIN D. A., OLIET S. H. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. **Cell** 125:4 775-784.
110. PANIZZUTTI R., DE MIRANDA J., RIBEIRO C. S., ENGELENDER S., WOLOSKER H. (2001) A new strategy to decrease N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coactivation: inhibition of D-serine synthesis by converting serine racemase into an eliminase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98:9 5294-5299.
111. PAOLETTI P., NEYTON J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol** 7:1 39-47.
112. PARPURA-GILL A., BEITZ D., UEMURA E. (1997) The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. **Brain Res** 754:1-2 65-71.
113. PARSONS C. G., STOFFLER A., DANYSZ W. (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the

glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse.
Neuropharmacology 53:6 699-723.

114. PAULA-LIMA A. C., LOUZADA P. R., DE MELLO F. G., FERREIRA S. T. (2003) Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptors involved? **Neurotox Res** 5:5 323-327.
115. PAULA-LIMA A. C., DE FELICE F. G., BRITO-MOREIRA J., FERREIRA S. T. (2005) Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. **Neuropharmacology** 49:8 1140-1148.
116. PEGHINI P., JANZEN J., STOFFEL W. (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. **EMBO J** 16:13 3822-3832.
117. Procter AW (2000) Abnormalities in non-cholinergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease. In: Dementia (O'Brien J, Ames D, Burns A, eds), pp 433-442. Oxford: Edward Arnold.
118. PUZZO D., PRIVITERA L., LEZNIK E., FA M., STANISZEWSKI A., PALMERI A., ARANCIO O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. **J Neurosci** 28:53 14537-14545.
119. QUERFURTH H. W., SELKOE D. J. (1994) Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. **Biochemistry** 33:15 4550-4561.
120. REGO A. C., DE ALMEIDA L. P. (2005) Molecular targets and therapeutic strategies in Huntington's disease. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord** 4:4 361-381.
121. ROSELLI F., TIRARD M., LU J., HUTZLER P., LAMBERTI P., LIVREA P., MORABITO M., ALMEIDA O. F. (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. **J Neurosci** 25:48 11061-11070.
122. ROTHSTEIN J. D., JIN L., DYKES-HOBERG M., KUNCL R. W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90:14 6591-6595.
123. ROTHSTEIN J. D., MARTIN L., LEVEY A. I., DYKES-HOBERG M., JIN L., WU D., NASH N., KUNCL R. W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron** 13:3 713-725.
124. ROTHSTEIN J. D. (1996) Excitotoxicity hypothesis. **Neurology** 47:4 Suppl 2 S19-S25.

125. ROTHSTEIN J. D., DYKES-HOBERG M., PARDO C. A., BRISTOL L. A., JIN L., KUNCL R. W., KANAI Y., HEDIGER M. A., WANG Y., SCHIELKE J. P., WELTY D. F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron** 16:3 675-686.
126. SCHAFFAR G., BREUER P., BOTEVA R., BEHREND S., TZVETKOV N., STRIPPEL N., SAKAHIRA H., SIEGERS K., HAYER-HARTL M., HARTL F. U. (2004) Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. **Mol Cell** 15:1 95-105.
127. SELKOE D. J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nat Cell Biol** 6:11 1054-1061.
128. SEUBERT P., VIGO-PELFREY C., ESCH F., LEE M., DOVEY H., DAVIS D., SINHA S., SCHLOSSMACHER M., WHALEY J., SWINDLEHURST C., . (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. **Nature** 359:6393 325-327.
129. SHLEPER M., KARTVELISHVILY E., WOLOSKER H. (2005) D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. **J Neurosci** 25:41 9413-9417.
130. SHOJI M., GOLDE T. E., GHISO J., CHEUNG T. T., ESTUS S., SHAFFER L. M., CAI X. D., MCKAY D. M., TINTNER R., FRANGIONE B., . (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. **Science** 258:5079 126-129.
131. SMALL D. H., MOK S. S., BORNSTEIN J. C. (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. **Nat Rev Neurosci** 2:8 595-598.
132. STEVENS E. R., ESGUERRA M., KIM P. M., NEWMAN E. A., SNYDER S. H., ZAHS K. R., MILLER R. F. (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:11 6789-6794.
133. SUH Y. H., CHECLER F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. **Pharmacol Rev** 54:3 469-525.
134. TABATON M., NUNZI M. G., XUE R., USIAK M., AUTILIO-GAMBETTI L., GAMBETTI P. (1994) Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. **Biochem Biophys Res Commun** 200:3 1598-1603.
135. TANNENBERG R. K., SCOTT H. L., WESTPHALEN R. I., DODD P. R. (2004) The identification and characterization of excitotoxic nerve-endings in Alzheimer disease. **Curr Alzheimer Res** 1:1 11-25.

136. TOMINAGA-YOSHINO K., UETSUKI T., YOSHIKAWA K., OGURA A. (2001) Neurotoxic and neuroprotective effects of glutamate are enhanced by introduction of amyloid precursor protein cDNA. **Brain Res** 918:1-2 121-130.
137. TONG G., JAHR C. E. (1994) Multivesicular release from excitatory synapses of cultured hippocampal neurons. **Neuron** 12:1 51-59.
138. VIGO-PELFREY C., LEE D., KEIM P., LIEBERBURG I., SCHENK D. B. (1993) Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. **J Neurochem** 61:5 1965-1968.
139. VOLLES M. J., LANSBURY P. T., JR. (2003) Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. **Biochemistry** 42:26 7871-7878.
140. WALTON H. S., DODD P. R. (2007) Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. **Neurochem Int** 50:7-8 1052-1066.
141. WANG J., DICKSON D. W., TROJANOWSKI J. Q., LEE V. M. (1999) The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. **Exp Neurol** 158:2 328-337.
142. WINFIELD D. A., GATTER K. C., POWELL T. P. (1980) An electron microscopic study of the types and proportions of neurons in the cortex of the motor and visual areas of the cat and rat. **Brain** 103:2 245-258.
143. WOLOSKER H., BLACKSHAW S., SNYDER S. H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:23 13409-13414.
144. WOLOSKER H., SHETH K. N., TAKAHASHI M., MOTHET J. P., BRADY R. O., JR., FERRIS C. D., SNYDER S. H. (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:2 721-725.
145. WOLOSKER H., BLACKSHAW S., SNYDER S. H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:23 13409-13414.
146. WOLOSKER H. (2006) D-serine regulation of NMDA receptor activity. **Sci STKE** 2006:356 e41.
147. WOLOSKER H. (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. **Mol Neurobiol** 36:2 152-164.
148. WOLOSKER H., DUMIN E., BALAN L., FOLTYN V. N. (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. **FEBS J** 275:14 3514-3526.

149. WON S. J., KIM D. Y., GWAG B. J. (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. **J Biochem Mol Biol** 35:1 67-86.
150. WU J., ANWYL R., ROWAN M. J. (1995) beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. **Neuroreport** 6:17 2409-2413.
151. WU S. Z., BODLES A. M., PORTER M. M., GRIFFIN W. S., BASILE A. S., BARGER S. W. (2004) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. **J Neuroinflammation** 1:1 2.
152. YANG S., QIAO H., WEN L., ZHOU W., ZHANG Y. (2005) D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. **Neurosci Lett** 379:1 7-12.
153. YANG Y., GE W., CHEN Y., ZHANG Z., SHEN W., WU C., POO M., DUAN S. (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:25 15194-15199.
154. YATIN S. M., YATIN M., VARADARAJAN S., AIN K. B., BUTTERFIELD D. A. (2001) Role of spermine in amyloid beta-peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. **J Neurosci Res** 63:5 395-401.
155. YI J. H., HAZELL A. S. (2006) Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochem Int** 48:5 394-403.
156. YOSHIKAWA M., TAKAYASU N., HASHIMOTO A., SATO Y., TAMAKI R., TSUKAMOTO H., KOBAYASHI H., NODA S. (2007) The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. **Arch Histol Cytol** 70:2 127-134.

CURRICULUM VITAE

Nome: Jordano de Brito Moreira da Silva

Nascimento: 25/11/1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

- Técnico em Biotecnologia pela Escola Técnica Federal de Química, junho de 1995 a dezembro de 1999
- Faculdade de Farmácia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2002 a março de 2007

Comunicação em congressos

- 15 comunicações em congressos nacionais
- 7 comunicações em congresso internacionais

Publicações

Paula-Lima, A.; **Brito-Moreira, J.** ; De Felice, F. ; **Ferreira, S. T.** (2005) Activation of GABA A receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, 49:8, 1140-1148

Paula-Lima, A ; Tricerri, M. ; **Brito-Moreira, J.** ; Bomfim, T. ; Oliveira, F. ; Magdesian, M.; Grinberg, L. ; Panizzutti, R. ; Ferreira, S. T. (2009) Human apolipoprotein A I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 41:6, 1361-1370

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)