

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica - CCS

Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular

**O ACÚMULO DO PEPTÍDEO BETA AMILÓIDE NO ESPAÇO
INTRANEURONAL E A RELAÇÃO COM UMA PROTEÍNA
MOTORA ASSOCIADA À ACTINA**

Leandro Teixeira de Oliveira

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Leandro Teixeira de Oliveira

**O ACÚMULO DO PEPTÍDEO BETA AMILÓIDE NO
ESPAÇO INTRANEURONAL E A RELAÇÃO COM UMA
PROTEÍNA MOTORA ASSOCIADA À ACTINA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
de Química Biológica, Instituto de
Bioquímica Médica, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título
de Mestre em Ciências (Química
Biológica).

Prof^a Martha M. Sorenson
Orientadora

Professora Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, CCS/UFRJ

Prof^a. Verônica Salerno Pinto
Co-orientadora

Professora Adjunto do Departamento de Biociências da Atividade Física, CCS/UFRJ

Rio de Janeiro
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Teixeira de Oliveira

O ACÚMULO DO PEPTÍDEO BETA AMILÓIDE NO ESPAÇO INTRANEURONAL E
A RELAÇÃO COM UMA PROTEÍNA MOTORA ASSOCIADA À ACTINA.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2009

Banca Examinadora:

Prof^a Martha M. Sorenson

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ
Orientadora

Prof^a Verônica P. Salerno

Professor Adjunto do Departamento de Biociências da Atividade Física-EEFD/ICB/UFRJ
Co-Orientadora

Prof^a Débora Foguel

Professor Associada do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ

Prof^o André Marco de Oliveira Gomes

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ

Prof^o Jean Christophe Houzel

Professor Adjunto do Departamento de Anatomia /ICB/UFRJ

Prof^a Yraima Moura Lopes Cordeiro

Professor Adjunto do Departamento de Fármacos/Faculdade de Farmácia/UFRJ.
Revisor e Suplente Externo

Prof^a. Andréa Cheble de Oliveira

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ICB/UFRJ
Suplente Interno

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, Leandro Teixeira.

O ACÚMULO DO PEPTÍDEO BETA AMILÓIDE NO ESPAÇO INTRANEURONAL E A RELAÇÃO COM UMA PROTEÍNA MOTORA ASSOCIADA À ACTINA.

Orientador(a): Prof^a. Martha Meriwether Sorenson.

Co-Orientador(a): Prof^a. Verônica Salerno Pinto.

Rio de Janeiro, UFRJ, programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2007.

Nº de folhas:68

Dissertação: Mestrado em Química Biológica

1- Amilóide beta

2- Miosina

3- Neurônios

Dedico esta dissertação ao meu filho
Victor Hugo Vasques Oliveira,
minha maior fonte de energia e inspiração.

RESUMO

Oliveira, Leandro. O acúmulo do peptídeo beta amiloide no espaço intraneuronal e a relação com proteínas motoras associadas a actina. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa de maior prevalência no envelhecimento humano. A hipótese clássica de cascata amilóide sugere que o acúmulo e a deposição do peptídeo amilóide (A β) no cérebro, precedem e induzem as anomalias neuronais que caracterizam os estados de demência apresentados nos casos de Alzheimer. Acredita-se que as placas amilóides são formadas a partir do acúmulo e agregação gradual do A β secretado no espaço extracelular, porém recentemente vem sendo demonstrado que o acúmulo de A β também ocorre no espaço intracelular em períodos iniciais da patologia, assim como ocorrem alterações no transporte axonal e importantes alterações morfológicas que precedem a formação de placas senis. Além disso, o acúmulo intraneuronal de A β é visto como sendo crítico na ocorrência de disfunções sinápticas e cognitivas tal qual na formação de placas amiloides. Neste trabalho, utilizando técnicas de imunocitoquímica e microscopia confocal, mostramos o acúmulo de A β endocitado e a presença de vesículas, contendo esse A β , associadas à miosina Vb. Uma vez descrito que as miosinas da classe V desempenham um papel importante no transporte de vesículas granulo-secretoras, este achado vem ao encontro a uma das hipóteses para a doença de Alzheimer, onde acredita-se que o processo da doença resulta de uma quebra no equilíbrio existente entre a geração de A β e a degradação do peptídeo gerado tendo a miosina uma grande importância nesse processo.

ABSTRACT

Oliveira, Leandro. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Alzheimer's disease is the commonest neurodegenerative disorder in ageing human populations. The fundamental amyloid hypothesis suggests that the accumulation and deposition of the β -amyloid peptide ($A\beta$) in the brain precedes and induces the neuronal abnormalities that underlie dementia driving AD pathogenesis. Amyloid plaques were thought to form from the gradual accumulation and aggregation of secreted $A\beta$ in the extracellular space, but recently, the accumulation of $A\beta$ has been demonstrated to occur within neurons with AD pathogenesis. Alterations in the axonal trafficking and morphological abnormalities also precede and lead to senile plaques. Moreover, intraneuronal $A\beta$ accumulation has been reported to be critical in the synaptic dysfunction, cognitive dysfunction and the formation of plaques in AD. Here we use confocal microscopy and immunohistochemistry to show endocytic $A\beta$ accumulation and vesicles that carry intraneuronal $A\beta$ associated with myosin Vb. Since it has been shown that class V myosins play multiple roles in the trafficking of secretory granules, these observations are consistent with one hypothesis for AD in which the disease process results from an imbalance between $A\beta$ production and $A\beta$ clearance and the importance of myosins in this process.

Agradecimentos:

A meus pais, Paulo Cesar de Oliveira e Carmen Lucia Teixeira da Silva por me trazerem ao mundo, me educarem, pelo amor, pela confiança e principalmente pela enorme paciência.

A minhas irmãs Amanda Manhães de Oliveira e Adriana Manhães de Oliveira, por serem, muito além de minhas irmãs, minhas companheiras e pela alegria contagiante que me dá força para superar qualquer mau momento ou dificuldade.

A Virna Pery Amorim, pela amizade, carinho, companhia, paciência budista, por todo o auxílio nas necessidades mais inusitadas e por fazer parte importante deste momento da minha vida.

A minha pequena aluna e amiga Priscila de Araujo Matos, que embarcou de cabeça na minha “viagem” e hoje sabemos que tem um grande futuro pela frente e sem a qual eu não conseguiria saber onde eu deixei meus experimentos.

A Prof.^a Verônica Salerno por acreditar em mim e em meu trabalho, pelos ensinamentos científicos, pelas conversas, conselhos e “chamadas” sempre muito oportunas e acima de tudo pelo carinho e pela amizade.

A Prof.^a Martha Sorenson pelo oportunidade de fazer parte do seu laboratório e me integrar ao seu grupo.

Ao Prof. Fernando Garcia de Mello pela gentileza de me permitir trabalhar em seu laboratório e pela disponibilidade de equipamentos necessários a realização deste trabalho.

A Prof.^a Yraima Cordeiro pela atenção dispensada, tão em cima da hora, pelas sugestões e pelo carinho.

Aos companheiros de Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular, os remanescentes e os não mais presentes, porém muito importantes pela ajuda em alguns experimentos, pelo apoio e principalmente pela bagunça.

Aos companheiros do complexo que engloba o Laboratório de Neurobiologia da Retina: Bernardo, Cristiano, Renatinha, Prof.^a Patrícia Gardino, Prof. Ricardo Reis por me aceitarem no seu “reduto”, pelo carinho, atenção e ajuda em vários experimentos.

A grandes amigos especiais nesta jornada, Ana Paula, M Castro, Rose, Chico, Renato, Jordano, Fabinho e todos aqueles amigos, colegas e companheiros que junto comigo consumiram doses industriais de cerveja ou qualquer outra coisa alcoólica presente.

Aos amigos “externos” porem muito mais do que especiais como: Fabio Marinho, Fernanda Drumond, Daniele Abreu, Rodrigo Oséas, Nando e Jorginho por serem sempre grandes amigos, por estarem sempre ao meu lado (mesmo quando estou errado) e pelos ótimos momentos que passamos ao longo desses anos.

Ao grande artista que foi Michael Jackson por todo seu talento, a nós deixado em obras memoráveis; pela confusa história de vida, que nos leva a crer ao menos por um breve momento que todos nós podemos até ser normais e pelos memoráveis “passos na lua”.

A todos aqueles que me importunaram, me incomodaram, me aborreceram, me atrapalharam, e que de uma maneira ou de outra colaboraram no meu caminhar e fazem parte da minha vida.

Abreviaturas Utilizadas

ABC	ATP-binding cassette
A β	Peptídeo β -amilóide
ADDLs	<i>Amyloid-derived diffusible ligands</i>
ADP	5' Adenosina Difosfato
APP	Proteína precursora amilóide
Arp	Proteínas relacionadas a Actina
ATP	5' Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosina Trifosfatase
BSA	Albumina Bovina Sérica
BM-V	Miosina V de encéfalo
CaM	Calmodulina
DA	Doença de Alzheimer
DIV	dias <i>in vitro</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
EGTA	Ácido Etilenoglicol-Bis (β – aminoetil éter) N, N, N, N – Tetracético
FI	Filamentos Intermediários
Fluo- A β	Peptídeo β -amilóide cojugado com Fluoresceína
GDP	5' Guanosina Difosfato
GTP	5' Guanosina Trifosfato
GTPase	Guanosina Trifosfatase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina G
LTP	<i>Long Term Potenciation</i>
MEM	Meio Mínimo Essencial
MTT	Brometo de 3-[4,-dimetil 2- tiazolil]-2,5-difenil tetrazolium
MVb	Miosina Vb
PBS	Tampão Fosfato Salino
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
TBS	Tampão Tris Salino
Tris	Tris-Hidroximetilaminometano
Tween 20	<i>Polyethoxyethanol Sorbitan Monolaureate</i>

ÍNDICE

	Pág
I. – INTRODUÇÃO	1
I.1 - Doença de Alzheimer	1
I.2- Citoesqueleto	5
I.3- Motores Moleculares	9
I.3.1 - Kinesinas	
I.3.2 - Dineína	
I.4- Miosinas	11
I.4.1 - Miosina V	18
I.4.1.1 - Estrutura	
I.4.1.2 - Regulação	
I.4.1.3 - Localização	
I.4..4 - Função	
II. – OBJETIVOS	24
III. - MATERIAIS E MÉTODOS	25
III.1 - Reagentes	25
III.2 - Cultura primária de neurônio de retina	25
III.3 - Ensaio de viabilidade celular	26
III.4 - Imunocitoquímica	26
III.5 - Dot Blot	27
III.6 - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	27
III.7- Análise Estatísticas	28
IV. – RESULTADOS	29
IV.1 – Internalização do peptídeo fluo-A β_{1-42}	29
IV.2 – Curva temporal de internalização	32
IV.3 – Caracterização do peptídeo fluo-A β_{1-42} internalizado	34
IV.4 – Viabilidade das culturas tratadas com 10nM do peptídeo fluo-A β_{1-42}	35
IV.5 – Distribuição de miosina Vb em neurônios de retina	36
IV.6 – Colocalização de <i>clusters</i> de fluo-A β_{1-42} com miosina Vb	37
IV.7 - Curva temporal da co-localização dos <i>clusters</i> de fluo- A β_{1-42} com miosina Vb	41
V. – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	43
VI. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Marcadores histopatológicos da Doença de Alzheimer.	2
Figura 2. Processamento da proteína precursora amilóide (APP).	4
Figura 3. Filamentos que compõem o citoesqueleto.	7
Figura 4. Proteínas motoras associadas aos microtúbulos.	11
Figura 5. Proteína motora associada à actina.	12
Figura 6. Esquema representativo do ciclo ATPásico.	14
Figura 7. Árvore filogenética da superfamília das miosinas.	16
Figura 8. Diagrama da estrutura da miosina V.	19
Figura 9. Diagrama de função da miosina V.	20
Figura 10. Cromatograma representativo de gel-filtração de ADDLs.	28
Figura 11. Internalização do peptídeo fluo-Aβ42.	30
Figura 12. Confirmação da internalização do peptídeo fluo-Aβ42.	31
Figura 13. Curva temporal de internalização do peptídeo fluo-Aβ42.	33
Figura 14. Caracterização da preparação de fluo-Aβ42.	34
Figura 15. Cromatograma de gel-filtração de fluo-Aβ.	35
Figura 16. Ensaio de viabilidade celular por MTT.	36
Figura 17. Western Blot para miosina Vb.	37
Figura 18. Distribuição de miosina Vb.	38
Figura 19. Co-localização de miosina Vb e fluo-Aβ42.	40
Figura 20. Recrutamento de miosina Vb no período de internalização do fluo-Aβ42.	42

I. Introdução:

I.1. Doença de Alzheimer:

O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas na sociedade moderna vem sendo relacionado com o aumento da expectativa de vida da população. Fatores de risco associados ao estilo de vida moderno podem contribuir para a incidência desses distúrbios; dentre eles há maior prevalência da Doença de Alzheimer (DA), que afeta cerca de 25 milhões de pessoas no mundo (Mattson, 2000; Ferri et al., 2005). No curso da doença, um processo de disfunção neuronal é seguido de uma extensa degeneração em regiões específicas do cérebro, culminando em um estado de incapacidade total (Haass & Selkoe, 2007).

A primeira descrição da DA foi feita pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1906 (para revisão ver Alzheimer et al., 1995). Sua paciente Auguste D. apresentava comportamento agressivo, desorientação, alucinações e outras anormalidades cognitivas. Após a sua morte, através da análise de cortes histológicos do seu cérebro, dois tipos de lesões características foram observadas: emaranhados neurofibrilares e placas senis – estas constituídas por depósitos de peptídeos β -amilóides ($A\beta$) (Figura 1).

Os emaranhados neurofibrilares são agregados intraneuronais compostos pela proteína tau em um estado hiperfosforilado (Avila, 2006). Nesta condição, a proteína tau perde a sua capacidade fisiológica de se ligar e estabilizar os microtúbulos, e se reorganiza em filamentos que se agregam no interior dos neurônios.

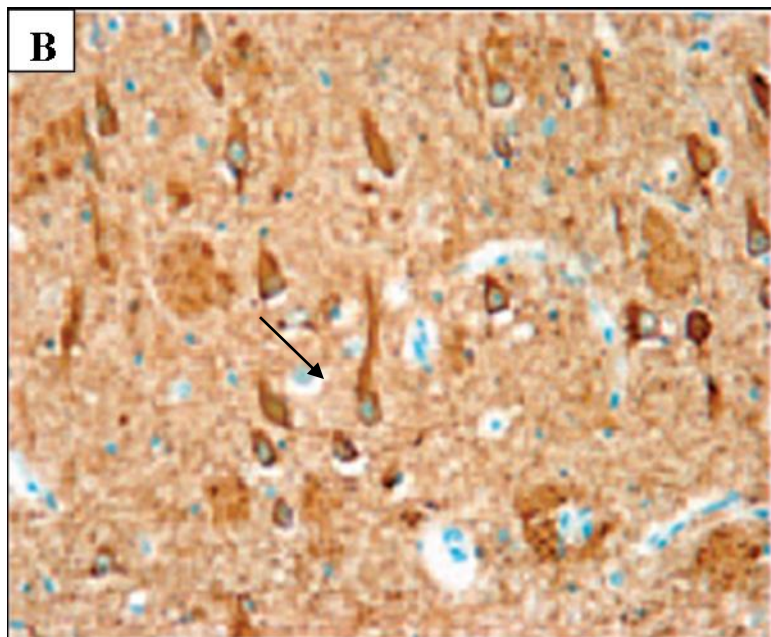
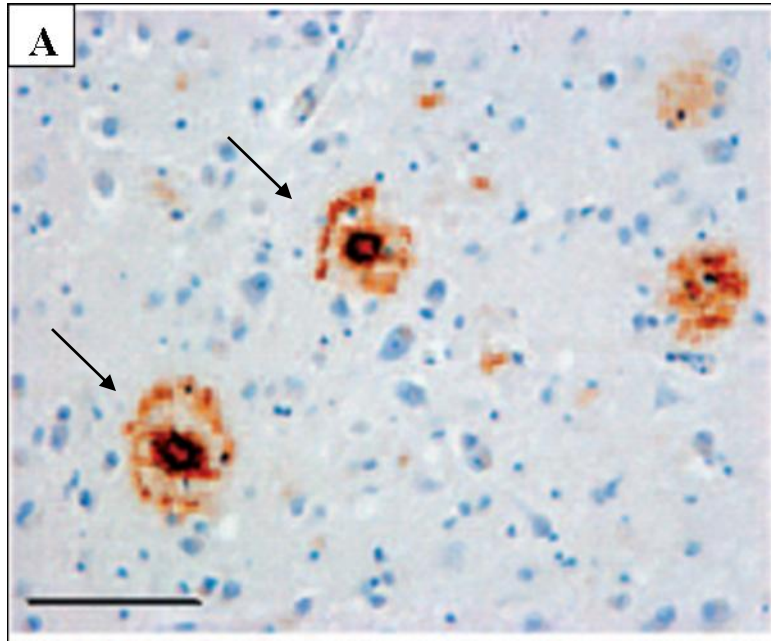
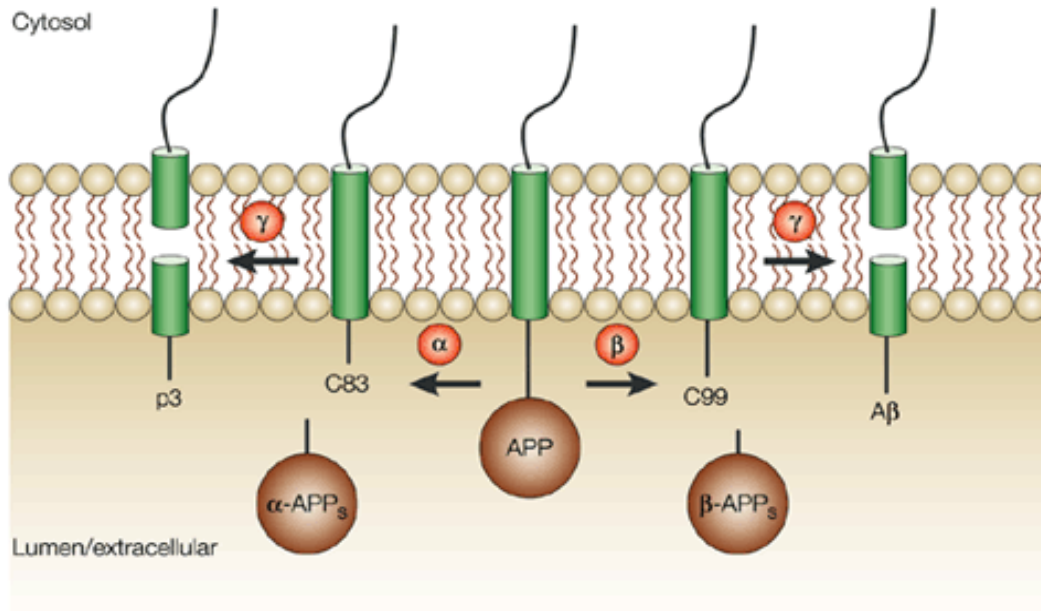


Figura 1. Marcadores histopatológicos da Doença de Alzheimer. No painel A, observa-se a formação da placa senil composta de agregados de peptídeo β -amilóide; em B, emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína Tau marcada para imunohistoquímica (adaptado de Haass & Selkoe, 2007).

O peptídeo A β é produzido pela proteólise de uma proteína encontrada na membrana plasmática de células neuronais denominada proteína precursora amilóide (APP) (Mattson, 2004). Liberado em forma monomérica e solúvel, o A β apresenta uma forte propensão de sofrer agregação, formando primeiramente oligômeros e posteriormente fibrilas, no decorrer de um processo descrito como cascata amilóide (Hardy & Higgins, 1992).

A APP está presente em diferentes isoformas na maioria dos tipos celulares e a sua forma neuronal pode sofrer dois processamentos distintos por proteólise. Estes são classificados como via amiloidogênica e via não amiloidogênica (Wolfe, 2002) (Figura 2).

O processamento da APP envolve clivagens proteolíticas sucessivas por um grupo de secretases. Na via não amiloidogênica de processamento, inicialmente ocorre uma primeira clivagem pela α -secretase, liberando um domínio extracelular solúvel chamado sAPP α , um fragmento que desempenha importantes funções durante o desenvolvimento do sistema nervoso e na plasticidade neuronal (Gralle & Ferreira, 2007). Em seguida, uma nova clivagem da APP pela γ -secretase libera um pequeno fragmento intracelular (Figura 2) que parece agir como um regulador transcripcional (Selkoe, 2001). A via amiloidogênica libera o peptídeo A β após a clivagem da APP pela ação seqüencial das β - e γ -secretases (Selkoe, 2001) (Figura 2). A sequência primária do peptídeo apresenta diferentes comprimentos que variam de 38 a 43 aminoácidos. Apenas as formas mais longas, contendo 40-43 aminoácidos, são encontradas nas placas senis, sendo a isoforma A β_{1-42} a mais presente nestas lesões (Kim & Hecht, 2005). Uma isoforma menor, A β_{1-40} , é produzida de forma mais abundante que o A β_{1-42} em condições fisiológicas, sendo a sua produção, em condições normais, cerca de 10 vezes maior do que a de A β_{1-42} (Wu et al., 2008).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 2. Processamento da proteína precursora amilóide (APP). A proteína precursora amilóide (APP) é processada por γ -secretase ou β -secretase. O processamento por γ -secretase gera um domínio γ -APPs, liberando um fragmento carbóxi-terminal de 83 resíduos de aminoácidos (C83) na membrana. Alternativamente, a clivagem por β -secretase produz β -APPs e um fragmento de 99 aminoácidos (C99). C99 é hidrolisado no seu domínio transmembrana pela γ -secretase formando assim o peptídeo amilóide beta ($A\beta$), implicado na doença de Alzheimer. C83 clivado pela γ -secretase produz p3, um variante amino-terminal truncado de $A\beta$ (Figura retirada de Wolfe, 2002).

A citada tendência de sofrer agregação do peptídeo, a formação de diferentes formas agregadas, de fibras amilóides estáveis e os diferentes estados conformacionais assumidos pelo peptídeo $A\beta$ produzem efeitos celulares importantes. Inúmeras descobertas e estudos realizados em diferentes modelos experimentais levaram à idéia de que as fibrilas seriam os agentes mais agressivos e indutores da neurodegeneração que se observa no cérebro de pacientes com DA (Glennner & Wong, 1984; Pike et al., 1992; Lorenzo & Yankner, 1994). No entanto, já é bem estabelecido que o peptídeo $A\beta$ por si só é neurotóxico em cultura de células, e esta toxicidade aparentemente envolve, entre outros fenômenos, um aumento na concentração intracelular de cálcio (Ho et al., 2001) e hiper-ativação de receptores de glutamato (Louzada, Jr. et al., 2001).

Estudos recentes propõem que modificações graduais nos níveis de peptídeo $A\beta$ promovem alterações sinápticas, ativação de microglia e astrócitos e conversão de proteína

tau em agregados (Haass & Selkoe, 2007; De Felice et al., 2007). Oligômeros de A β em sua forma solúvel são capazes de exercer um potente efeito neurotóxico e apresentam também um possível envolvimento em eventos relacionados à plasticidade sináptica (Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005). Entretanto, é importante salientar que os mecanismos envolvidos no impacto neuronal causado pelo peptídeo A β e os eventos moleculares e celulares disparados no processo da patologia continuam indefinidos.

Apesar de não existir um consenso a respeito de um alvo específico para o combate da doença de Alzheimer, um passo a ser considerado seria a neutralização do processo inicial da patogenia. O aumento dos níveis de A β pode ocorrer pelo aumento da sua produção e/ou diminuição da sua depuração. Em estudos recentes foi demonstrado que a inibição da produção fisiológica de A β resulta em comprometimento da viabilidade celular (Plant et al., 2003). Neste trabalho foi constatado que a produção de A β 40, que representa 90% do que é produzido fisiologicamente, justifica a sua necessidade e mais ainda, a importância da manutenção do equilíbrio entre concentrações de A β 40/ A β 42.

Outra hipótese a ser avaliada está relacionada a estudos recentes que suportam a hipótese de que a perda de memória recente é causada por oligômeros solúveis de A β (Kayed et al., 2003), que ocorre devido a concentrações sub-micromolares atuarem rapidamente na inibição do armazenamento de informação sináptica. A identificação de formas oligoméricas solúveis, atualmente conhecidas como ADDLs (*Amyloid-Derived Diffusible Ligands*) e o seu papel na toxicidade mediada pelo peptídeo A β (Lambert et al., 2007) reforça esta idéia, associado ao fato de que a formação de memória começa nas sinapses, sugerindo que a perda de memória no processo da doença de Alzheimer também tenha início nas sinapses (Walsh et al., 2002).

I.2 Citoesqueleto:

Presente na maioria das células eucarióticas, o citoesqueleto desempenha importante papel na determinação e manutenção da forma celular, participando também da citocinese, de transportes intracelulares, na produção de extensões citoplasmáticas requeridas para a movimentação e aquisição de nutrientes, na contração muscular e na segregação dos cromossomos na mitose. Estas funções dependem de três diferentes filamentos protéicos

que são: microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina (Baker & Titus, 1998; dos Remedios et al., 2003).

Os microtúbulos, encontrados no citoplasma de todas as células, apresentam dimensões uniformes por volta de 25 nm de diâmetro. São longos, retos e quando observados em corte transversal, apresentam uma parede densa de aproximadamente 6 nm de espessura. Cada microtúbulo é formado pela associação de dímeros protéicos que se arrumam em hélice. Os dímeros são compostos por duas cadeias polipeptídicas com estruturas semelhantes, chamadas de α e β tubulina. Quando as moléculas de tubulina se juntam para formar microtúbulos, elas formam “proto-filamentos” lineares, com subunidades β -tubulina de uma molécula de tubulina em contato com a subunidade de α -tubulina próxima. Em um microtúbulo completo, há treze proto-filamentos organizados lado a lado em torno de um cerne que aparenta estar vazio. Com todos os proto-filamentos alinhados em paralelo com a mesma polaridade, o microtúbulo é uma estrutura polar com uma ponta “plus” (crescimento rápido) e a ponta “minus” (crescimento lento) (Nogales, 2001) (Figura 3). Os microtúbulos podem ser encontrados na célula em estados de crescimento rápido ou em desagregação rápida. Esta instabilidade dinâmica dos microtúbulos ocorre em consequência do retardamento da hidrólise de GTP após a ligação com tubulina e esta dinâmica está diretamente associada as suas funções biológicas na célula (Conde & Caceres, 2009).

Os filamentos intermediários são polímeros fortes, constituídos de polipeptídeos fibrosos e alongados que formam uma estrutura dimérica em dupla α -hélice que se associam, em um arranjo antiparalelo, formando tetrâmeros à partir dos quais os filamentos se organizam de forma não polarizada (Toivola et al., 2005). Particularmente importantes no citoplasma de células sujeitas à tensão mecânica, possuem um diâmetro em torno de 8-12 nm, são muito heterogêneos, considerando suas propriedades bioquímicas, porém quanto à morfologia e localização, é possível agrupá-los em cinco tipos: filamentos de queratina, subdivididos em ácidos (Tipo I) e básicos (Tipo II); filamentos da glia, vimentina, desmina e periferina compõem os filamentos do Tipo III; neurofilamentos e internexinas (Tipo IV) e filamentos que compõem as três lâminas nucleares que dão suporte à membrana nuclear interna constituem os filamentos do Tipo V (Ndozangue-Touriguine et al., 2008). São bastonetes estáveis, ao contrário dos microtúbulos e dos filamentos de

actina, não são constituídos de monômeros precursores que constantemente se agregam e se separam, em equilíbrio, como um pool citoplasmático. Um tipo intermediário de filamento forma uma estrutura em trama chamada lâmina nuclear, logo abaixo da membrana nuclear interna, e outros tipos se estendem para a periferia da célula onde interagem com a membrana plasmática (para revisão ver Minin & Moldaver, 2008) (Figura 3).

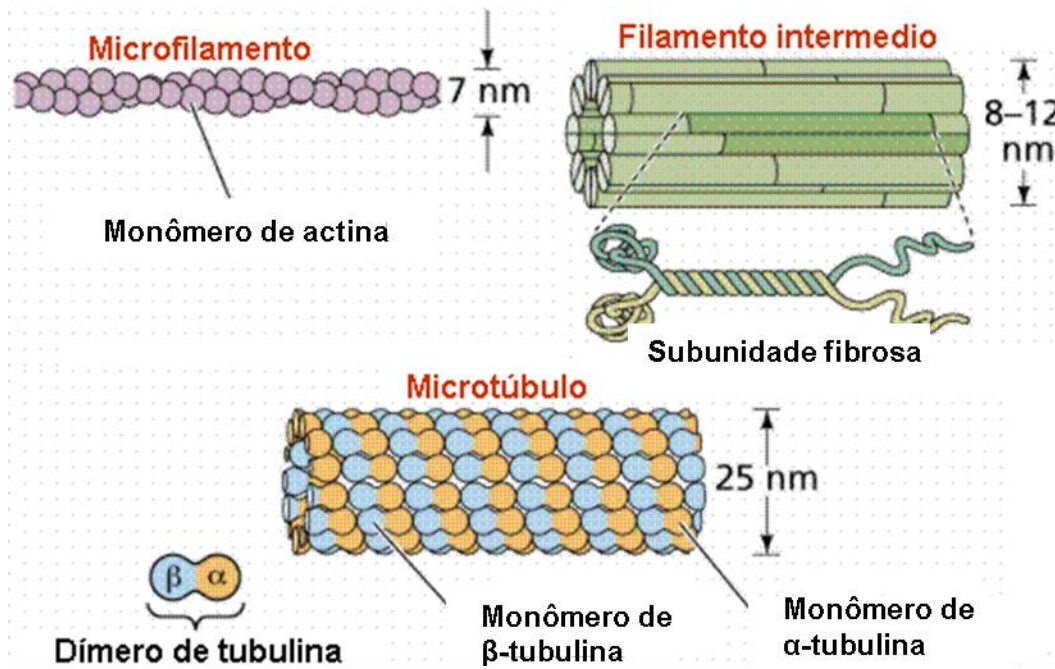


Figura 3. Filamentos que compõem o citoesqueleto. Esquema representativo das subunidades proteicas que compõem os filamentos formadores do citoesqueleto. Monômeros de actina compõem os microfilamentos (filamentos de actina); monômeros de α e β tubulina, constituintes dos microtúbulos; e a estrutura dimérica em dupla α -hélice da subunidade de polipeptídeos fibrosos que constituem os filamentos intermediários.

Modificado de: <http://whfreeman.com/life/update/chap04.html>.

A actina é a proteína mais abundante e importante em muitas células eucariotas, geralmente constituindo 5% ou mais do total de proteínas celulares. Todas as células eucariotas contêm actina; é muito encontrada no músculo, e também, em menor quantidade, distribuída no citoplasma de todas as células, sendo que os feixes formados por estes microfilamentos encontram-se em maior concentração logo abaixo da membrana plasmática (córtex) (Smythe & Ayscough, 2006; Burkel et al., 2007). Os filamentos de actina são compostos por subunidades globulares, cada uma composta por um peptídeo simples de 375 resíduos de aminoácidos, sendo conhecida como actina globular ou G actina. Os filamentos de actina podem formar estruturas estáveis, como as que formam o

núcleo de microvilosidades e a maquinaria contrátil das células musculares, ou podem formar estruturas lábeis (Winder & Ayscough, 2005). Estruturas delgadas e flexíveis, cujo diâmetro está entre 5 e 9 nm, são constituídas por uma cadeia dupla em espiral de monômeros globulares e formam uma estrutura quaternária fibrosa. A polimerização do filamento de actina é um processo dinâmico regulado pela hidrólise do nucleotídeo (ATP) que se apresenta ligado firmemente ao monômero. A dinâmica dos filamentos de actina é essencial em processos celulares, como manutenção da estrutura e da morfologia celular, citocinese, adesão, migração, crescimento de neuritos, endocitose e fagocitose (Myers & Casanova, 2008).

Logo após a polimerização, o fosfato terminal do ATP ligado à actina é hidrolisado e o ADP resultante permanece ligado ao polímero. Assim como na polimerização de tubulina, a hidrólise não é necessária para formar o filamento, e serve para enfraquecer as ligações no polímero, facilitando a despolimerização (Winder & Ayscough, 2005). As moléculas de actina polimerizam e despolimerizam continuamente no córtex de células animais. O comprimento total dos filamentos de actina em uma célula é 30 vezes maior do que o dos microtúbulos, diferença fundamental na organização e função destes dois polímeros.

A organização morfofuncional do citoesqueleto de actina depende da interação com proteínas que se ligam a esta, e são capazes de orientá-las na formação de géis frouxos ou filamentos rígidos, auxiliando na formação de estruturas de sustentação, alterando sua afinidade com outras proteínas. Existem pequenas proteínas que se ligam a actina e são capazes de inibir ou estimular a polimerização de acordo com as necessidades funcionais da célula agindo em resposta a estímulos extracelulares (Myers & Casanova, 2008).

A polimerização da actina pode ser regulada por sinais externos que se ligam a receptores de superfície celular, que atuam através de proteínas G heterotriméricas e das pequenas GTPases da família Rho (Jaffe et al., 2005).

Estes filamentos, em geral, necessitam de proteínas acessórias para a ligação dos filamentos entre si e outros componentes celulares, já que isoladamente, não conferem nem forma nem força à célula. Essas proteínas são essenciais para o controle dos filamentos protéicos, regulando a velocidade e a extensão da polimerização dos filamentos de actina e dos microtúbulos controlando onde e quando eles devem ser montados na célula e também

forneem motores moleculares para a movimentação das organelas ao longo dos filamentos (dos Remedios et al., 2003).

Diversos trabalhos substituíram a visão de que as organelas são estáticas, pela idéia de que a maioria delas possuem motilidade e que a localização e morfologia observada em várias membranas é um resultado seguro de múltiplos processos dinâmicos (Cole & Lippincott-Schwartz, 1995; Apodaca, 2001). Esses relatos sugerem que proteínas motoras assumem o papel integral na biogênese e função das organelas.

I.3 Motores Moleculares:

Proteínas motoras são uma classe especial de enzimas que vêm sendo identificadas e utilizam energia proveniente da hidrólise de ATP para deslizar ao longo de filamentos de actina e microtúbulos (Yun et al., 2001). Estes diferem entre si quanto ao tipo de filamento a que se ligam, quanto as direções que se movem ao longo do filamento e quanto a “carga” que transportam.

Motores moleculares são classificados entre aqueles que se movem ao longo de um substrato linear (motores lineares) e aqueles que possuem rotação (motores rotatórios). São então classificados como motores lineares os motores moleculares convencionais como miosina ligada a actina, dineína e kinesina ligadas a microtúbulos, e também o não convencional, como a RNA polimerase. E como exemplo de motor rotatório, temos o motor flagelar bacteriano e a F1-ATPase (Oster & Wang, 2003).

I.3.1 Kinesinas.

Sua estrutura consiste de um dímero, sendo cada monômero composto de uma região filamentar que possui uma cabeça globular, um domínio de ligação à carga a ser transportada e um domínio motor globular de aproximadamente 350 aminoácidos de ~ 40kDa. A superfamília de kinesinas é composta por moléculas convencionais e não convencionais. Os sítios de ligação a ATP e microtúbulos geram a força necessária para a motilidade e a região globular determina a especificidade funcional da kinesina. A ligação da kinesina parece causar mudanças conformacionais na tubulina (Woehlke & Schliwa, 2000) (Figura 4).

A molécula de kinesina se move progressivamente ao longo de microtúbulos em intervalos de 8nm, provavelmente pelo movimento alternado de cada uma de suas cabeças. Cada passo de 8nm parece estar associado à hidrólise de uma molécula de ATP e a força do movimento de kinesinas parece também depender da concentração de ATP (Visscher et al., 1999; Sack et al., 1999; Woehlke, 2001).

Kinesinas têm diversas funções, tais como transporte de vesículas e segregação de cromossomos durante a mitose. Diferentes kinesinas podem ser subdivididas com base em seu direcionamento, a posição do domínio motor (se está perto da extremidade amino-terminal ou carbóxi-terminal), ou pela combinação de suas subunidades (homodímeros, monômeros, heterodímeros, heterotrímeros, heterotetrâmeros, ou combinações com cadeias leves e outros). A maior parte de kinesinas se move em direção à extremidade positiva de microtúbulos, possui um domínio α -helicoidal, que age como um transdutor de força, e uma cauda com um domínio globular que se liga a cadeias leves e conecta-se à carga, como por exemplo, vesículas, organelas e cromossomos (Woehlke & Schliwa, 2000) (Figura 4).

I.3.2 Dineínas.

A dineína citoplasmática é uma proteína motora composta de duas cadeias pesadas idênticas com 500 kDa, três cadeias intermediárias com 70 kDa e quatro cadeias leves de 53-59 kDa. Nenhum caso de deleção de dineína é letal, sugerindo um sistema de apoio para a migração e divisão nuclear usando um motor como uma kinesina (Muresan et al., 2001) (Figura 4).

Cineticamente, a dineína parece comportar-se similarmente à miosina; por outro lado, a molécula de dineína possui dois domínios motores e cada um deles tem aproximadamente cinco vezes o tamanho do domínio motor de uma kinesina. Já as mudanças estruturais envolvidas na motilidade são mais complexas (Woehlke & Schliwa, 2000).

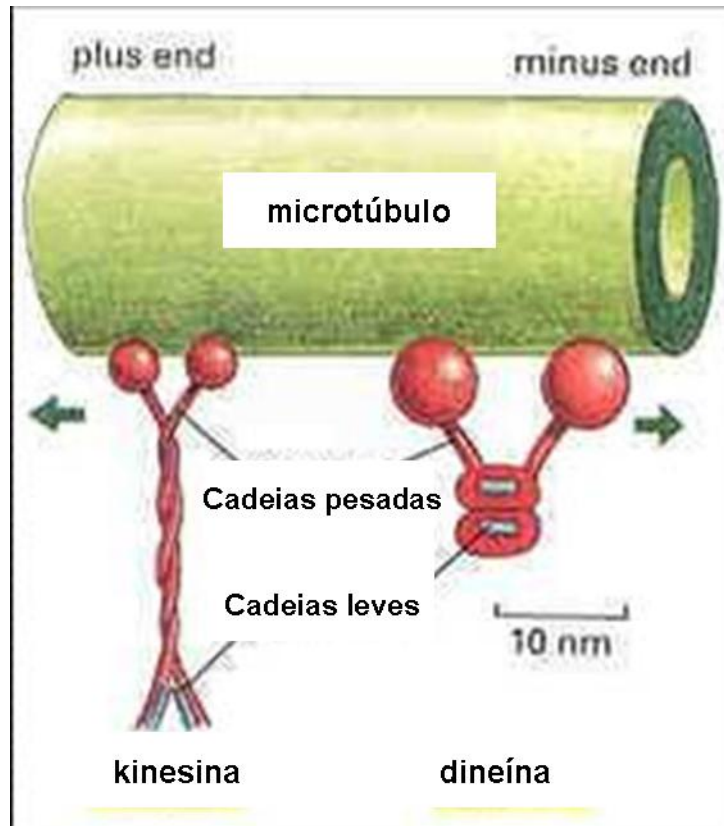


Figura 4. Proteínas motoras associadas aos microtúbulos. As kinesinas associadas ao microtúbulo realizam transporte em direção ao *plus end* e as dineínas são responsáveis pelo transporte de cargas na direção do *minus end*. Imagem adaptada de <http://fisio.ib.usp.br/labpig>.

A dineína foi descoberta como a primeira proteína motora capaz de gerar força ao longo de microtúbulos. Uma forma de dineína citoplasmática também foi identificada por participar da mitose e de vários outros movimentos celulares. Atualmente existem evidências que mostram que uma ou mais formas de dineína junto com seu co-fator, o complexo dinactina, são requeridas para manter o complexo de Golgi justanuclear em fibroblastos (Burkhardt, 1998; Muresan et al., 2001).

I.4 Miosinas:

Vista como a maior classe de proteínas responsáveis pelo direcionamento dos movimentos dependentes de actina (Baker & Titus, 1998) (Figura 5), a miosina foi descrita inicialmente em 1868 (Szent-Gyorgyi, 1953), e caracterizada como uma proteína que, em conjunto com a actina, constitui a estrutura essencial na formação dos filamentos

musculares, sendo parte da maquinaria contrátil responsável pelo deslizamento dos filamentos e encurtamento dos sarcômeros (Huxley, 1974).

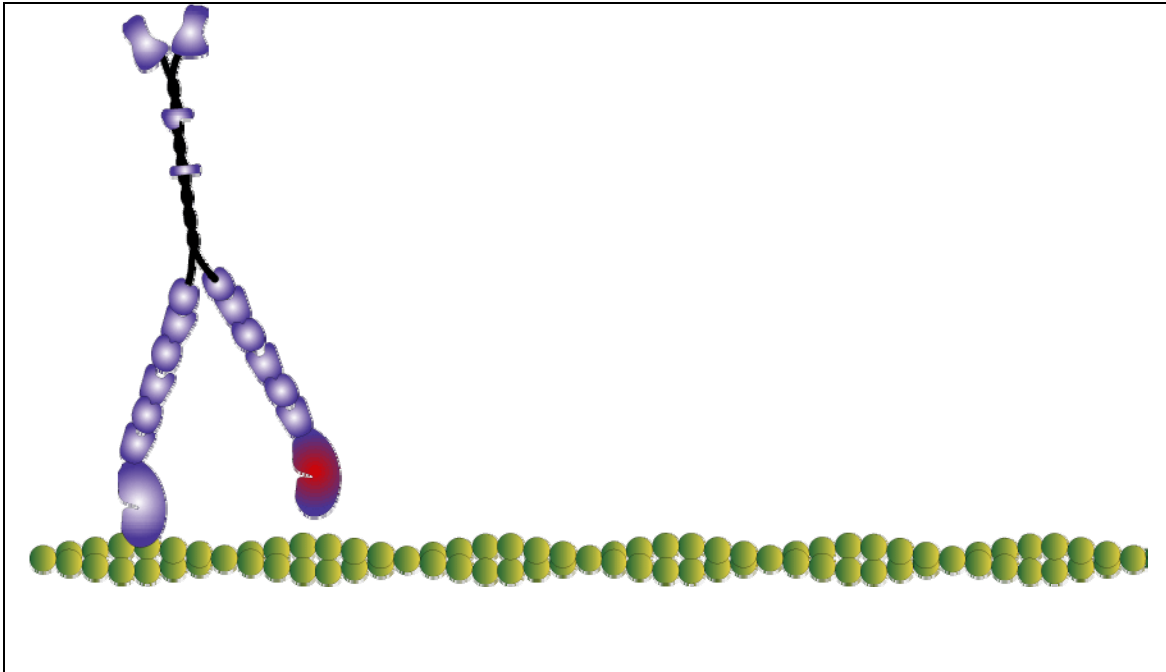


Figura 5. Proteína motora associada à actina. A miosina V (azul) se liga ao filamento de actina (verde) através dos sítios específicos (detalhe em vermelho) encontrados em cada uma das duas regiões da cabeça, domínios amino-terminais. (<http://physiology.med.uvm.edu>).

A interação entre actina e miosina foi melhor estudada em fibras musculares esqueléticas. A fibra muscular contém um grande número de miofibrilas, que são constituídas por filamentos grossos (miosina) e filamentos finos (actina) (para revisão ver Sellers, 2004).

A base da contração reside na interação entre filamentos grossos e finos, de tal forma que os filamentos delgados movem-se passando pelos filamentos espessos e indo em direção ao centro do sarcômero. Quando isso ocorre, o comprimento do sarcômero diminui. Os filamentos finos são constituídos por actina F, tropomiosina e troponina; os filamentos grossos são constituídos por moléculas de miosina (Sellers, 2004).

Quando as moléculas de miosina se reúnem em um filamento, suas cabeças projetam-se para fora formando pontes transversais que se conectam e movimentam os filamentos de actina durante a contração. Na ausência de cálcio, a tropomiosina e a troponina formam um complexo que impede ligação entre actina e a miosina. Com cálcio

presente, o complexo tropomiosina-troponina assume nova posição, possibilitando o contato entre a miosina e a actina, inclinando a cabeça da miosina e movimentando o filamento de actina (Fitts, 2008).

Como a ação de uma das cabeças da miosina pode ser responsável pelo movimento menor que 10 nm, conclui-se que ocorre uma série de interações repetitivas entre actina e miosina para promover o encurtamento observado do sarcômero. A energia para que a molécula de miosina mova os filamentos de actina é fornecida pelo ATP, que participa não só do processo de contração, mas também no de relaxamento. Sem ATP, os filamentos de actina e miosina permanecem ligados e o músculo não pode relaxar, formando pontes de rigor (Fitts, 2008) (Figura 6).

A atividade ATPásica da miosina é muito aumentada pela actina F. A actina aumenta a taxa de hidrólise (*turnover*) pela miosina em 200 vezes. Uma vez que o ATP ligado à miosina é rapidamente hidrolisado, mas a saída de ADP e Pi é lenta, a actina aumenta o “*turnover*” da miosina por se ligar ao complexo miosina-ADP-Pi e acelerar a liberação dos produtos (Fitts, 2008).

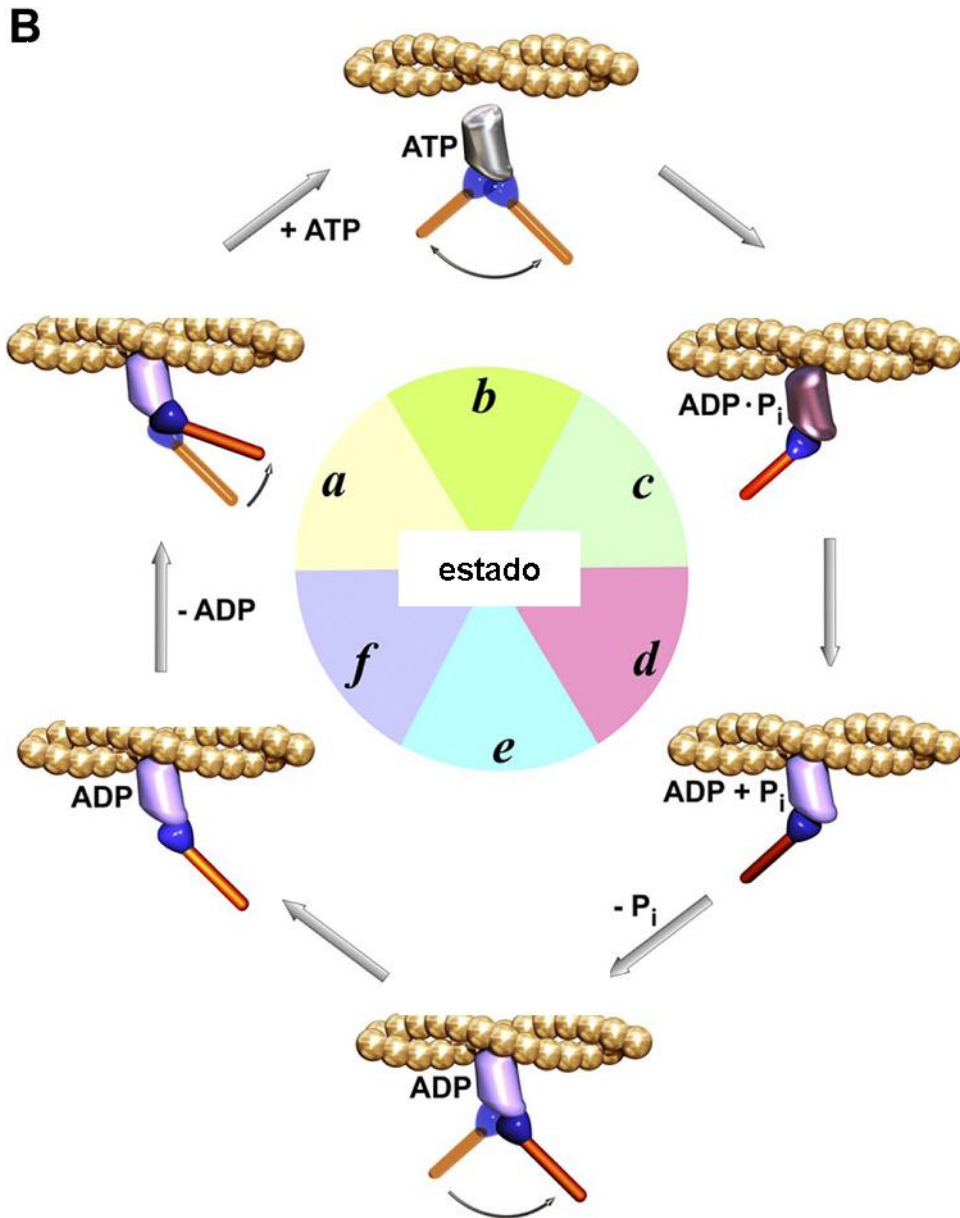


Figura 6. Esquema representativo do ciclo ATPásico. Iniciando no estado de rigor AM (estado *a*), ligação de ATP e rápida dissociação do complexo, hidrólise de ATP, seguida da liberação de P_i e então a liberação de ADP. Após a clivagem do ATP, a miosina se liga à actina por uma ligação fraca (estado *c*) e depois fortemente ligados (estado *d*). A ligação com actina induz a dissociação de P_i e o *power stroke* (estado *e*). Adaptado de Fitts (2008).

A fosforilação da miosina é um importante mecanismo de regulação da atividade de contração do músculo cardíaco mas não do músculo esquelético. O nível de fosforilação de miosina cardíaca, depende do equilíbrio das reações catalizadas por uma proteína quinase Ca²⁺ /calmodulina dependente e uma fosfatase, que através da fosforilação da cadeia leve

da miosina leva à interação com actina para produzir força e aumenta a atividade ATPásica da miosina (Sweeney, 1998).

Embora haja estruturas homólogas entre miosinas de músculo liso e esquelético, elas diferem em vários aspectos funcionais, ou seja, em sua atividade motora e em sua regulação. Para investigar as bases moleculares destas diferenças, em um estudo, foi produzida uma miosina quimérica, reunindo estruturas de miosinas de músculo esquelético e liso. Ambas as atividades ATPase e motora da miosina quimérica foram completamente reguladas pela fosforilação da cadeia leve, enquanto que o domínio motor determinou a taxa de hidrólise de ATP (Sata et al., 1997).

A miosina sarcomérica é produzida por uma grande e complexa família de genes que são diferentemente expressos durante o desenvolvimento das células musculares (Bandman, 1999). Neste cenário, a miosina gera uma força isométrica, que dirige movimentos simétricos. Em contraste, o filamento de actina uniformemente polarizado permite o movimento de miosina a longas distâncias. Deste modo, a direção da força gerada por miosina é polarizada e bem dirigida, levando a movimentos polarizados ou assimétricos, como por exemplo, o transporte de organelas por longa distância (Cramer, 2008).

A força produzida a partir da atividade da molécula de miosina dirige uma variedade de movimentos nas células eucarióticas. Fora do tecido muscular, o mecanismo preciso da participação da miosina na motilidade celular vem sendo estudado mais a fundo.

A miosina é uma proteína capaz de promover a hidrólise de ATP, executar movimento para transporte intracelular, citocinese, quimiotaxia, transporte de RNAs, locomoção celular, entre outras (Li & Nebenfuhr, 2008; Salerno et al., 2008).

A primeira classe da superfamília das miosinas descrita, miosina II, contém os tipos de miosina considerados convencionais, com duas cadeias pesadas; sendo o mais conhecido membro desta a miosina de músculo esquelético. A segunda classe descrita, miosina I, é assim chamada por apresentar apenas uma cadeia pesada. Atualmente, as moléculas de miosina que apresentam um ancestral comum similar à miosina I, representam classes de uma superfamília que são denominadas de acordo com o seu descobrimento, não havendo nenhuma correlação entre a homologia ou o número de cadeias, para classificar uma determinada classe (para revisão ver Sellers, 2000) (Figura 7).

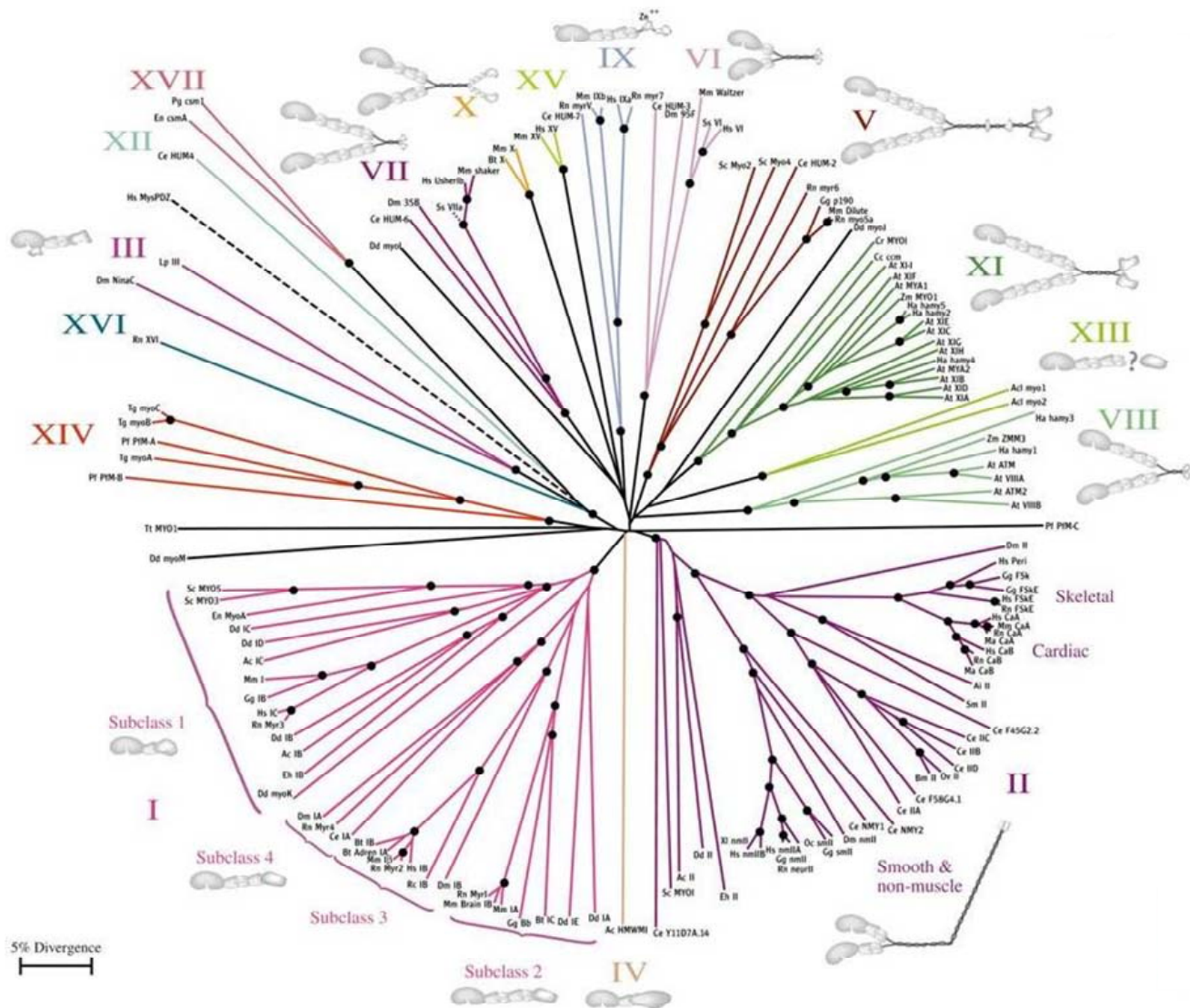


Figura 7. Árvore filogenética da superfamília das miosinas. Esquema mostrando XVII das classes descritas, dentre as mais de XX classes de miosinas existentes (Hodge & Cope, 2000).

Existe uma enorme variedade de miosinas. Isto pode ser notado, por exemplo, nas várias isoformas da miosina II que são encontradas na musculatura esquelética, lisa, cardíaca e também em células não musculares. Além de serem motores moleculares, alguns membros das subfamílias das miosinas I, III e IX também podem ser sinalizadores moleculares (Soldati, 2003). A região da cabeça da miosina, que incorpora a função de motor, contém um domínio catalítico que se liga ao ATP e um domínio que se liga a actina. Possui um domínio carboxi-terminal alongado (α -hélice) contendo um número variável de

cadeias leves, chamado pescoço. A α -hélice onde se ancoram as cadeias leves parece atuar como um braço de alavanca no mecanismo motor (Veigel et al., 2005).

Estudos têm revelado que as miosinas também possuem papel importante na função neurossensorial. Células envolvidas nesse processo de ampliação e manutenção de estruturas altamente especializadas são: estereocílios (do lado interno externo das células ciliadas do ouvido); projeções parecidas com microvilos (em *Drosophila melanogaster*) e cones de crescimento (em nervos). Muitas dessas estruturas são ricas em actina e a localização das miosinas nesses sítios e análises de miosina mutantes, sugere que diferentes miosinas são essenciais para a manutenção e/ou função dessas extensões (Baker & Titus, 1998; Kussel-Andermann et al., 2000).

As miosinas VI e VII possuem papéis essenciais na audição e no equilíbrio (Mooseker & Cheney, 1995). Os lados internos e externos das células ciliadas da cóclea estendem feixes altamente organizados de actina, os estereocílios, que são ancorados a uma lâmina cuticular rica em actina. A miosina VI no lado interno e externo das células ciliadas é localizada na lâmina cuticular e cordão pericuticular (Avraham et al., 1997). Camundongos com supressão de miosina VI (*Snell's waltzer*) exibem degeneração coclear e disfunção vestibular (Redowicz, 2002; Osterweil et al., 2005). A miosina VI pode ancorar os estereocílios na lâmina cuticular ou contribuir na manutenção de sua rigidez. A miosina VIIa expressa no interior e exterior das células ciliadas é encontrada na lâmina cuticular, no cordão pericuticular e em seus estereocílios (Hasson et al., 1997). Mutações em miosina VIIa humana resultam em perda de audição ou em retinose pigmentar (Síndrome de Usher) (Weil et al., 1996; El-Amraoui & Petit, 2005, Kremer et al., 2006).

Achados recentes mostram que as miosinas desempenham papéis na determinação da polaridade, localização e posicionamento das células, e que estas e outras proteínas do citoesqueleto, reúnem-se na membrana do complexo de Golgi durante o transporte de vesículas. O papel exato de miosinas no tráfico vesicular ainda não está bem estabelecido, mas sua participação representa um papel importante no transporte de vesículas (Tuxworth et al., 2005).

I.4.1 Miosina V:

A descoberta desta miosina não convencional deve-se a investigações do gene *dilute*, cuja supressão em camundongos produz dois tipos de anomalia. Em uma mutação, o *dilute viral (dv)* em homozigose acarreta em um fenótipo de clareamento dos pelos devido a um defeito na transferência de melanossomas do melanócito para o queratinócito; e a forma *dilute lethal (dl)*, leva a um quadro grave de defeitos neurológicos podendo manifestar ataxia, problemas de postura e equilíbrio, convulsões e morte em sua terceira semana de vida (Mercer et al., 1991).

Em humanos, na doença conhecida como síndrome de Griscelli, há uma mutação no gene que codifica a miosina Va (Pastural et al., 2000). Esta doença provoca no indivíduo clareamento de cabelo, albinismo, imunodeficiência e pequeno retardamento mental, sintomas semelhantes aos encontrados nos camundongos *dilute*.

Além da miosina Va, em mamíferos, é possível encontrar outras duas classes de miosinas. A miosina Vb é amplamente expressa em todos os tecidos e está envolvida na reciclagem de proteínas e receptores de uma variedade de tipos celulares; a miosina Vc é expressa predominantemente em células epiteliais e participa no transporte de receptores de transferrina (Rodriguez & Cheney, 2002).

I.4.1.1 Estrutura:

A estrutura primária da miosina Vb mantém alta homologia com as demais proteínas da classe V (Figura 8) e uma menor homologia com a miosina II. Sua estrutura apresenta uma cadeia pesada de 212,5 kDa que é constituída de três grandes domínios típicos da superfamília: i) a cabeça, região globular com os sítios para ligação de nucleotídeo e actina; ii) o pescoço, com os sítios consenso de ligação de cadeias leves, cada um com aproximadamente 4 calmodulinas (16,8 kDa), uma cadeia leve de 23 kDa e outra de 17 kDa (Wang et al., 2000; Espindola et al., 2000); iii) a cauda, região globular com sítios de ligação para proteínas regulatórias compostas por cadeias leves de 10 kDa com alta homologia (80-100%) à cadeia de dineína (Benashski et al., 1997).

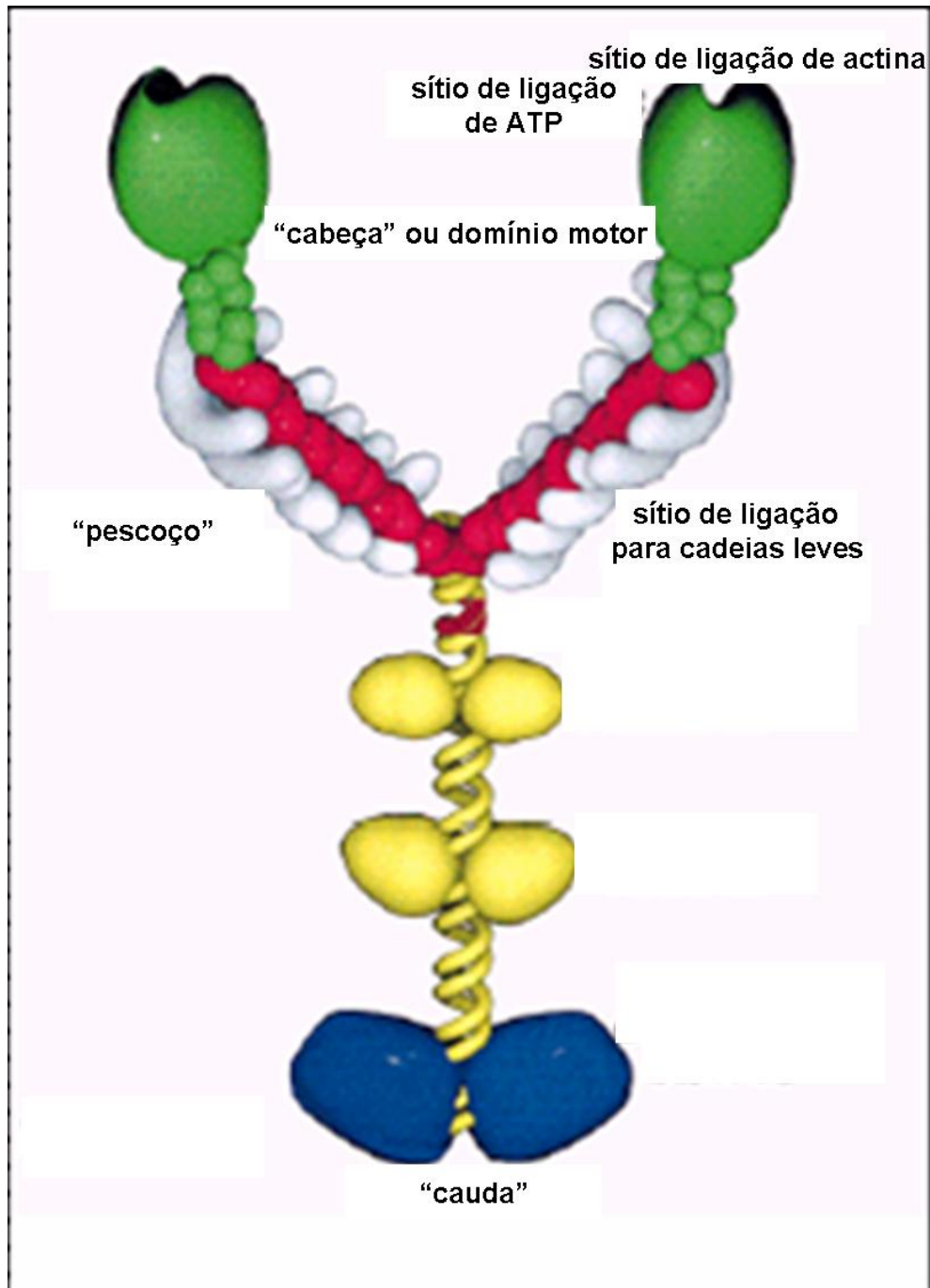


Figura 8. Diagrama da estrutura da miosina V. Em verde, a região globular amino-terminal; em vermelho, os motivos IQ, domínios de ligação de cadeias leves; em cinza, calmodulinas e cadeias leves regulatórias associadas; em amarelo, a cauda em α – hélice; em azul, as regiões globulares da cauda, responsáveis pela ligação com a carga a ser transportada. Adaptado de Langford, 2002.

Os domínios amino-terminal das miosinas são altamente conservados e contém a maquinaria para a produção de força primária, sendo responsável pela conversão da energia da hidrólise do ATP em força mecânica, através da interação com microfilamentos. Os

domínios caboxi-terminal (cauda) são altamente divergentes. A cauda é responsável pela ligação da proteína a vesículas sinápticas (Prekeris et al., 1996), sendo a cauda globular, o domínio pelo qual a miosina V se associa a sua carga (Catlett & Weisman, 1998; Catlett et al., 2000) (Figura 9).

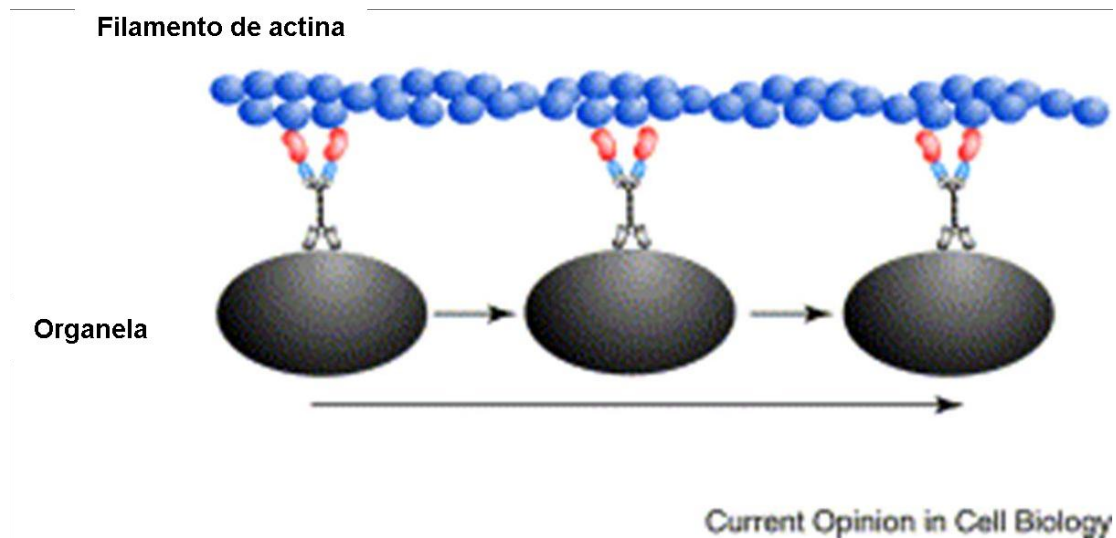


Figura 9. Diagrama de função da miosina V. Modelo mostrando que miosinas (mais de uma molécula) associa-se a vesícula a ser transportada através de sítios de ligação específicos localizados na região da cauda globular e realizam esse transporte alternado a associação das duas cabeças com o filamento de actina (Adaptado de Shimmen & Yokota, 2004).

I.4.1.2 Regulação:

A miosina V foi descrita inicialmente como uma proteína (denominada p190) com atividade Mg^{2+} ATPásica, ligante de calmodulina e dependente de Ca^{2+} , presente em encéfalo de coelho (Larson et al., 1988).

A miosina V é fosforilada por uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} e calmodulina (CaM quinase II). Esta fosforilação ocorre na cauda globular (Coelho & Larson, 1993).

A comparação com modelos de ativação em miosinas e outras proteínas sugere uma importante ação da calmodulina neste processo regulatório. O Ca^{2+} exerce importantes efeitos sobre a molécula de miosina V, estimula sua atividade $MgATP$ ásica e promove a dissociação das moléculas de CaM (Cameron et al., 1998), constituindo-se assim em um elemento chave na regulação da atividade e função desta miosina.

Outra importante diferença existente na regulação da atividade das miosinas Va e Vb com relação à miosina II convencional é a liberação lenta de ADP do complexo acto-miosina-ADP (De La Cruz et al., 1999; Watanabe et al., 2006). Além disso, foi mostrado que o ADP inibe a atividade mecânica e enzimática das miosinas Va e Vb (De La Cruz et al., 2000; Wang et al., 2000; Watanabe et al., 2006). Estudos cinéticos (Hannemann et al., 2005; Rosenfeld et al., 2005) e estruturais (Coureux et al., 2004) sugerem que, no ciclo ATPásico da miosina Va o Mg^{2+} é liberado antes do ADP e, deste modo, a concentração de Mg^{2+} poderia modular a cinética de miosina V.

I.4.1.3 Localização:

Purificada inicialmente a partir de encéfalo de coelho e até então identificada apenas como uma proteína ligante de calmodulina denominada p190 (Larson et al., 1990), foi posteriormente encontrada em encéfalo de galinha (Cheney & Mooseker, 1992), e sabe-se que apesar da alta incidência no tecido encefálico (Espindola et al., 1992), esta proteína está presente em muitos tecidos de várias espécies de vertebrados.

A miosina V também é expressa no ouvido e no olho; está localizada juntamente com microtúbulos e actina e também possui papel na distribuição intracelular de organelas membranosas em neurônios. No ouvido, ela é expressa nas células de sustentação, terminações sinápticas na base do interior de células ciliadas no ouvido e em fibras nervosas aferentes (Hasson et al., 1997). No olho, está distribuída no interior da camada nuclear e nas sinapses de células fotorreceptoras. A distribuição da miosina V em neurônios é consistente com sua participação no transporte intracelular de vesículas. É encontrada nos corpos celulares e cones de crescimento de hipocampo e astrócitos cerebelares de rato (Espreafico et al., 1992), no centróssomo de células de mamíferos (Espreafico et al., 1998), associadas com domínios ricos em microtúbulos em células em intérfase e em processo de divisão (Wu et al., 1998), e em células dendríticas de linhagens de murinos (Holt et al., 2007).

I.4.1.4 Função:

A localização da miosina V na célula, as características dos fenótipos nulos e a sua ligação a vesículas sinápticas sugerem que esta proteína deve estar envolvida no transporte de vesículas (Sweeney & Houdusse, 2007).

A miosina Va é essencial para extensão dos cones de crescimento em neurônios de gânglio da raiz dorsal do pinto, mas não para retração dos filipódios (Wang et al., 1996). Todos estes dados sugerem um papel importante da miosina Va na neuroplasticidade.

Estudos genéticos demonstraram que a distribuição anormal de melanossomos no corpo celular dos melanócitos é a causa do defeito de coloração dos pelos do mutante *dilute* (Wilson et al., 2000; revisto em Van et al., 2009). Aparentemente, o mecanismo de transporte de melanossomos obedece a uma intrincada associação entre a miosina V e outros motores baseados em citoesqueleto (Wu et al., 1998; Van et al., 2009). O transporte de vesículas mediado pela miosina V vem sendo correlacionado com um modelo molecular para a explicação da ataxia (Langford & Molyneaux, 1998). Este modelo, ainda especulativo, pode indicar mais uma das funções da miosina V.

A correlação entre modelos anteriores do produto do gene *dilute* e da miosina V foi mostrada por Bridgman, 1999) demonstrando que esta proteína é realmente a responsável pelas modificações no camundongo *dilute*.

Ensaio com a meromiosina pesada da miosina Va demonstraram que suas duas cabeças ficam ligadas à actina, caracterizando seu movimento processivo (Walker et al., 2000). Os autores propuseram que as duas cabeças realizam seus ciclos catalíticos em momentos distintos, o que favoreceria a liberação de uma cabeça enquanto a outra permanece ligada a actina.

A miosina Vb está envolvida na reciclagem do receptor M4 muscarínico de acetilcolina (Volpicelli et al., 2002), no transporte de receptores de transferrina (Provance, Jr. et al., 2004) e na reciclagem de receptores de EGF (Lapierre & Goldenring, 2005), assim como no transporte da subunidade GluR1 do receptor de glutamato (Lise et al., 2006), e na formação apical da membrana plasmática de hepatócitos (Wakabayashi et al., 2005). Até o momento parece não haver relação entre os tipos de organelas transportadas por miosina Va e Vb (Lapierre et al., 2001; Takagishi et al., 2005).

Partindo destes princípios, neste trabalho analisamos o acúmulo de A β endocitado e a presença de vesículas contendo o peptídeo A β , associadas à miosina Vb. Estas descobertas podem abrir novas perspectivas quanto à contribuição do A β intraneuronal na cascata de eventos neurodegenerativo assim como uma importante participação da miosina Vb em um processo que poderia servir como um novo mecanismo de defesa contra os oligômeros de A β . Tendo em vista que as miosinas da classe V desempenham um papel importante no transporte de vesículas granulo-secretoras, nossa hipótese é que o processo de desenvolvimento da doença resulte na quebra do equilíbrio existente entre a geração de A β e seu processamento.

II. Objetivos:

Objetivo geral:

Investigar a participação de proteínas motoras no transporte do peptídeo beta amilóide no meio intracelular com a finalidade de compreender a importância da formação de A β intraneuronal no processo neurodegenerativo e a participação da miosina Vb em uma possível interação com este peptídeo internalizado.

Objetivos específicos:

- Verificar a internalização do peptídeo A β em culturas primárias de neurônio de retina de pintos;
- Identificar isoformas do peptídeo que são internalizadas;
- Investigar a relação existente entre proteínas motoras com os agregados intracelulares.

III. Materiais e Métodos:

III.1 Reagentes:

Os peptídeos A β ₁₋₄₂ e A β ₁₋₄₀ conjugados com fluoresceína (fluo-A β ₁₋₄₂ e fluo-A β ₁₋₄₀) foram adquiridos da AnaSpec. O meio mínimo essencial (MEM) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Invitrogen (São Paulo, Brasil). Para os ensaios de imunohistoquímica, utilizamos anticorpo policlonal contra o domínio C-terminal (931 resíduos de aminoácidos) de miosina Vb purificado por afinidade, gentilmente cedido pela Dr^a. Marie France-Lisé (University of British Columbia). Os anticorpos secundários conjugados com rodamina foram obtidos da Sta Cruz Biotechnology Inc. Para os ensaios de Dot blot os anticorpos primários específicos para oligômeros de A β menores, compostos de trímeros e tetrâmeros solúveis e para espécies oligoméricas maiores (maiores que 24mers) foram produzidos no Laboratório do Prof. William Klein (Northwestern University) e gentilmente cedidos pela Prof^a. Fernanda G. De Felice (UFRJ). Os anticorpos secundários conjugados a peroxidase fazem parte do kit de revelação ECL Plus (Amersham).

Para as culturas primárias de neurônios de retina de pinto, ovos embrionados foram adquiridos em uma granja local. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas de utilização de animais em pesquisa do Instituto Nacional de Saúde, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Uso de animais experimentais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, número IBCCF 001.

III.2 Cultura primária de neurônio de retina:

As culturas de retina foram preparadas a partir de embriões de pinto com 8 dias embrionados em placas de cultura previamente tratadas com poli-L-lisina (20 μ g/mL) por 24 h, conforme descrito (Louzada et al., 2004). As retinas são dissecadas em condições estéreis em uma solução livre de cálcio e magnésio (CMF). Após uma etapa de tripsinização (0.05% tripsina em PBS) por 10 min a 37 °C em CMF o material é centrifugado por 2 min a 1000 x g, para baixar as células. O sobrenadante é descartado, e o pellet é cuidadosamente ressuspenso em meio de cultura (MEM suplementado com 5% SFB) e dissociado mecanicamente com o auxílio de uma pipeta pasteur por cerca de 10–20 vezes. Este procedimento leva à obtenção de uma cultura de baixa densidade enriquecida de neurônios (contendo > 90 % células neuronais) com aproximadamente 2 x 10⁶ células/mL.

O meio de cultura é trocado 24 horas após o plaqueamento e as culturas são mantidas em estufa em uma atmosfera de 8% CO₂ a 37 °C. Para os experimentos de internalização de Aβ as culturas foram tratadas após 4 dias “*in vitro*” (DIV), com 2 nM fluo-Aβ por 5, 10, 30 e 60 minutos.

III.3 Ensaio de viabilidade celular:

A avaliação da viabilidade das células em cultura após o incubação com 10 nM de fluo-Aβ por 60 minutos foi realizada usando o ensaio de redução de brometo de 3-[4,-dimetil 2- tiazolil]-2,5-difenil tetrazolium (MTT) conforme descrito (De Felice et al., 2001). Resumidamente, as células são incubadas com uma solução de 0,5 mg/mL de MTT a 37°C por 4 horas para que ocorra a redução de MTT em azul de formazan pelas células metabolicamente ativas. As células são lisadas e os cristais de azul de formazan solubilizados através de uma incubação com 0,01 N HCl contendo 10% SDS “*overnight*” a temperatura ambiente. A densidade óptica foi medida a 540 nm em um leitor de placa ThermoMax. A viabilidade das células tratadas foi comparada com a viabilidade de células controle não tratadas, mantidas pelo mesmo período experimental. Foram realizados quatro repetições do experimento com três condições em triplicata.

III.4 Imunocitoquímica:

As células em cultura são fixadas com 4% paraformaldeído por 15 minutos e lavadas 3x com PBS (± 10 min/vez). Após as lavagens as células são permeabilizadas com 0,2% Triton por 5 minutos, sendo novamente lavadas 3x com PBS. Os sítios não específicos são bloqueados com 5% PBS-BSA por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Após o bloqueio as lâminas são incubadas “*overnight*” com anticorpo primário contra o domínio C-terminal de miosina Vb, diluído a 1 µg/ml em solução de bloqueio em câmara úmida a 4°C. Após mais 3 lavagens com PBS (± 10 min/vez) as células são incubadas com anticorpo secundário policlonal conjugado com rodamina (1:1000) por 1 hora à temperatura ambiente. As lamínulas são novamente lavadas com PBS (3x - ± 10 min/vez), tratadas com N-propil-galacto e montadas em lâminas para microscopia. A visualização é feita em microscópio de fluorescência Apo Tome, Axio CSM 700 (Zeiss). As análises de co-localização do peptídeo com a proteína (MVb) são

obtidas em microscópio confocal LSM510 (Zeiss). Para cada condição foram preparados quatro experimentos em duplicata e foram adquiridas 8-10 imagens de cada uma das duplicatas.

III.5 Dot blot:

As amostras de preparação do fluo-A β_{1-42} são aplicadas em membranas de nitrocelulose. Após secagem em temperatura ambiente, a membrana é incubada com leite desnatado (5%) preparado com TBS-Tween (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) para bloqueio dos sítios livres inespecíficos. Todos os passos a seguir foram feitos sob agitação suave: 1) lavagem da membrana (3x por 10 minutos/cada) com TBS-Tween 0,05%, sob agitação; 2) incubação com anticorpo primário diluído contra as diferentes isoformas do peptídeo (1:500) em TBS-Tween, “*overnight*”, também sob agitação; 3) nova lavagem com TBS-Tween (3x por 10 minutos/cada), sob agitação; 4) incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído (1:1000) em TBS-Tween por 2 horas, sob agitação; 5) lavagem com TBS-Tween (3x por 10 minutos). A revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando kit ECL Plus (Amersham).

III.6 Gel-filtração por HPLC:

A caracterização do peptídeo fluo-A β_{1-42} utilizado nos experimentos de internalização foi realizada utilizando 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 7,0, filtrado através de membrana de nitrocelulose Millipore 0,45 μ m, mantido em gelo durante todo o processo. As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alta eficiência (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 fluo-A β_{1-42} , 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 uma solução contendo 4 μ M de fluo-A β_{1-42} 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 analisados.

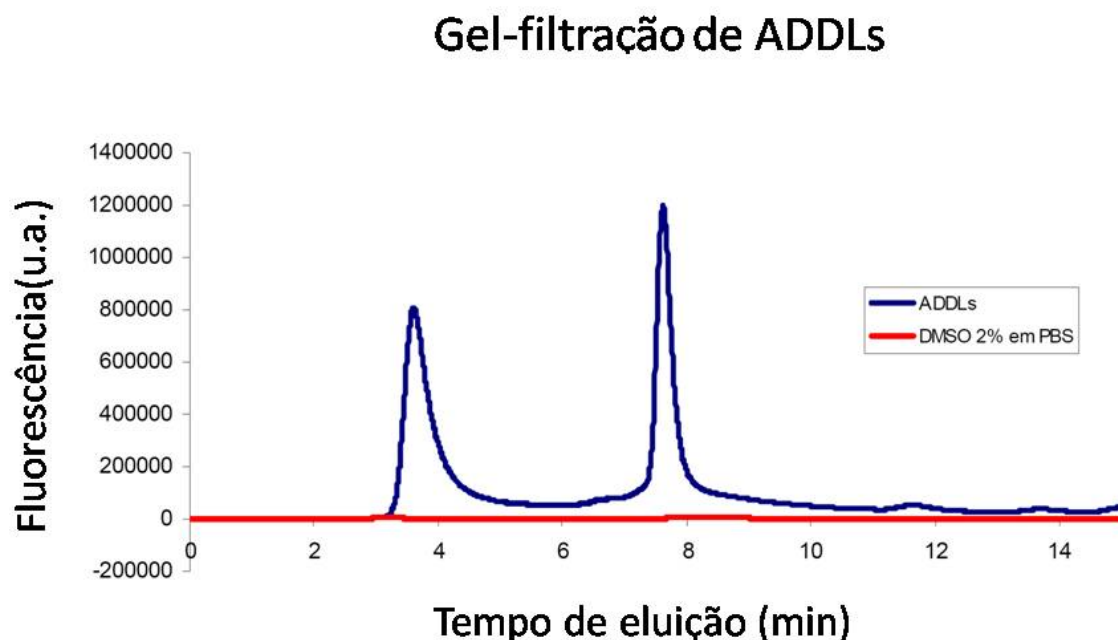


Figura 10. Cromatograma representativo de gel-filtração de ADDLs. Através da gel-filtração é possível detectar duas populações de agregados. A primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), elui entre 3,5 – 4 minutos. Agregados de 2-3 monômeros eluem mais tarde, entre 7,5 – 8 minutos (Produzido e gentilmente cedido por Jordano Brito Moreira (UFRJ)).

III.7 Análise estatística:

Os resultados dos experimentos foram analisados através de teste t não pareado para a comparação de duas médias, considerando a diferença significativa para valores de $p < 0.05$. Os resultados expressos são a média \pm erro padrão dos dados obtidos com $n \geq 3$ culturas preparadas de animais distintos.

IV. Resultados:

IV.1 Internalização do peptídeo fluo-A β ₁₋₄₂:

O acúmulo cerebral de amilóide beta é o fator comum de todos os casos descritos da DA. Segundo a hipótese da cascata amilóide, quando inicialmente descrita (Hardy & Selkoe, 2002), o acúmulo de A β desencadearia uma série de eventos celulares que resultam em demência. Tal hipótese de cascata amilóide, recentemente revista (Haass & Selkoe, 2007), propõe que oligômeros solúveis promovem alterações que resultam em perda neuronal, disfunções nos sistemas de neurotransmissores e déficit cognitivo.

Ao levantarmos a possibilidade de haver um desequilíbrio entre a produção e a depuração de A β , buscamos primeiramente avaliar a possibilidade de uma internalização do peptídeo que indicaria uma via de depuração. Para isso, utilizamos culturas primárias de baixa densidade de neurônios de células de retina, preparadas como descrito em Material e Métodos, expostas a concentrações de 2 nM fluo-A β ₁₋₄₂ (A β 42) ou fluo-A β ₁₋₄₀ (A β 40) durante uma hora na estufa. Depois de fixadas, as lamínulas foram preparadas para microscopia e as análises realizadas em microscópio de fluorescência, o que possibilitou a observação da internalização do peptídeo A β 42 (Figura 11). Os dados desta internalização foram confirmados com a utilização do programa de reconstrução de imagem Zeiss AxioVision 3.0 (Figura 12).

O mesmo não foi observado para culturas submetidas ao mesmo tratamento utilizando o peptídeo A β 40 (Figura 11). Esse resultado representa um bom indício de que a internalização inicialmente vista não ocorre em função da sonda fluorescente associada ao peptídeo. Mais importante, esse fato indica que se trata de um processo seletivo.

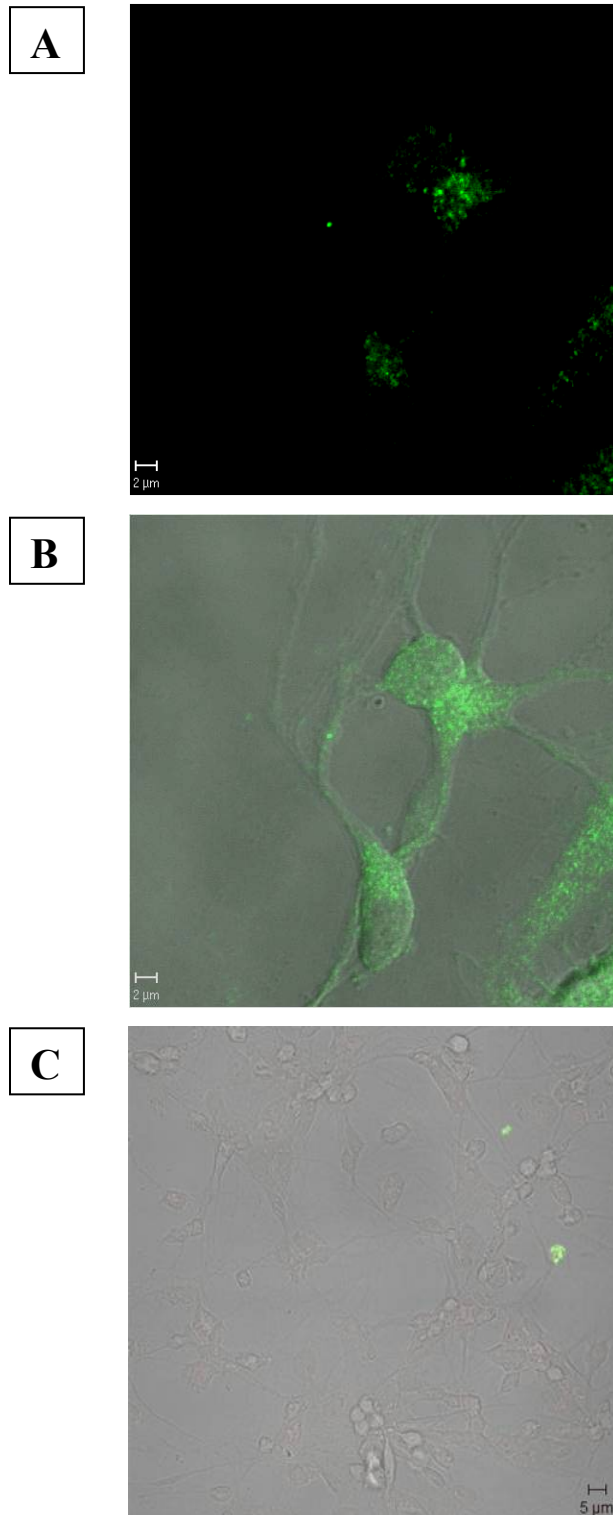
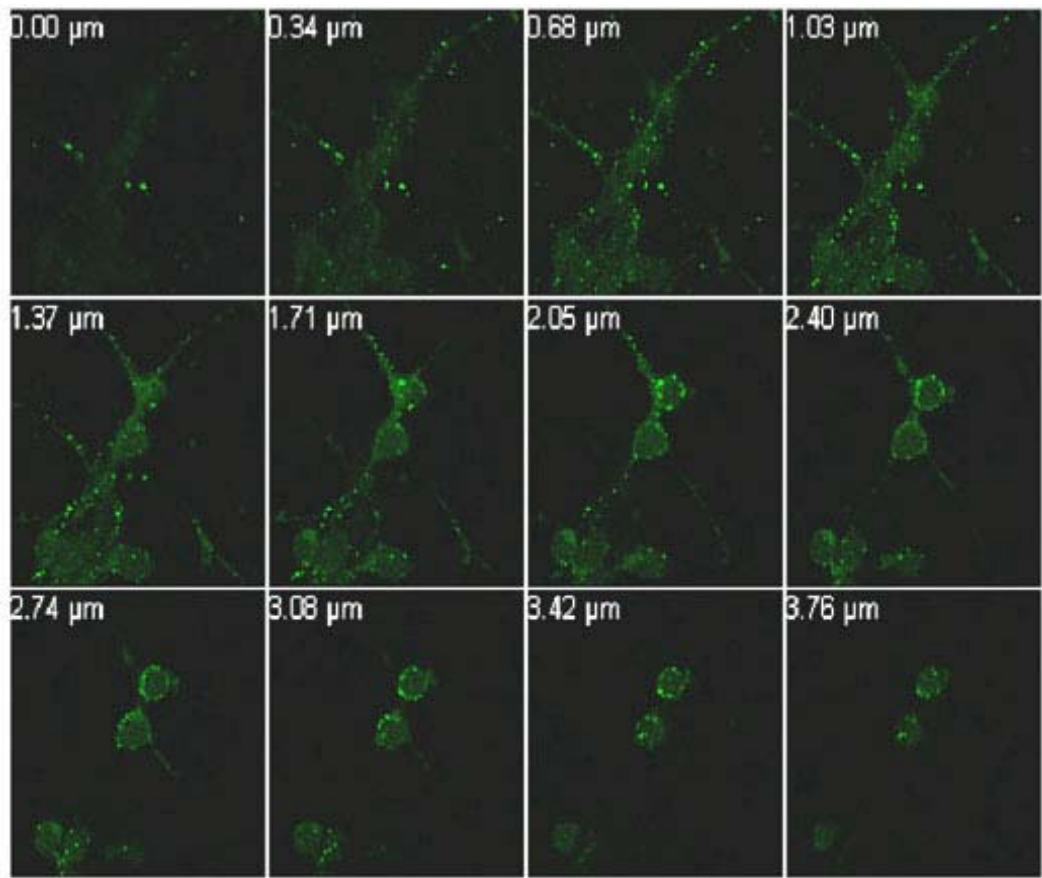
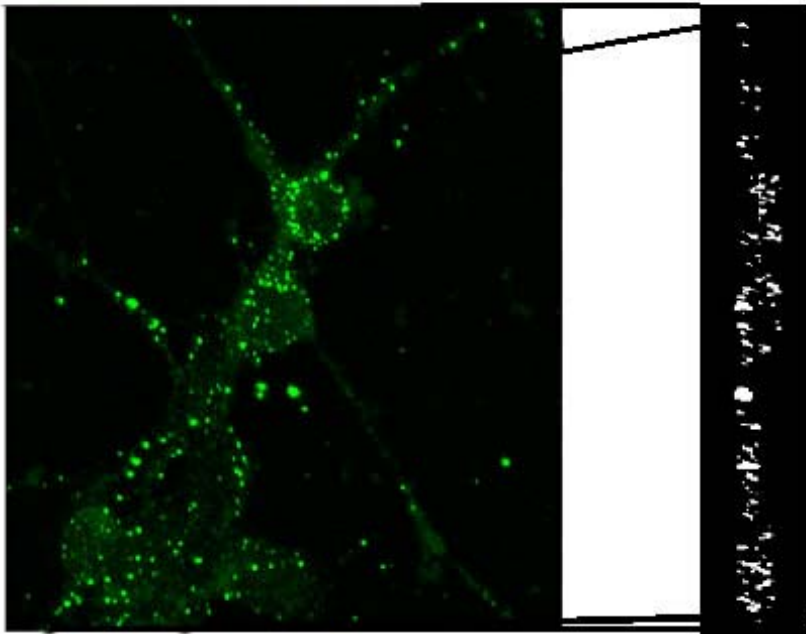


Figura 11. Internalização do peptídeo fluo-A β 42. Culturas primárias de neurônio de retina de embrião de pinto (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 2 nM fluo-A β 42 por 60 min . Imagem de microscopia de fluorescência (A), sobreposição das imagens em DIC e fluorescência (B). Aumento de 100x (2x zoom digital). Barra de calibração = 2 μ m. Nas culturas tratadas com 2 nM fluo-A β 40 (C) não encontramos o mesmo padrão de internalização. Aumento de 63x e barra de calibração = 5 μ m.

A



B



C



Figura 12. Confirmação da internalização do peptídeo fluo-A β 42. Culturas primárias de neurônio de retina de embrião de pinto (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 2 nM fluo-A β 42 por 60 min, exibindo vesículas contendo o peptídeo em diferentes corpos celulares. No painel A imagens de cortes de 0,34 μ m em Z, a partir da membrana superior de uma célula (0,0 μ m) em direção a base inferior da célula (3,76 μ m), obtidos por microscopia confocal. O painel B representa a projeção da reconstrução das imagens em A. Em C temos uma projeção lateral da reconstrução da imagem B. Aumento de 100x.

IV.2 Internalização:

Visto que as culturas tratadas com (A β 42) por um período de 1 hora exibiam um número elevado de pontos de fluorescência, avaliamos o tempo mínimo em que se poderia observar a internalização do peptídeo. Assim, as culturas foram tratadas com 2 nM fluo-A β ₁₋₄₂ em intervalos de tempo de 5, 10, 30, 60 minutos, obtendo-se um painel com uma curva temporal de internalização do A β 42. Pode ser observado na Figura 13A que, após 5 minutos de tratamento, o peptídeo está internalizado; o mesmo pode ser observado após 10 minutos de tratamento (Figura 13B). Observa-se também um aumento progressivo dos pontos de fluorescência após o tratamento por 30 e 60 minutos (Figura 13C e D, respectivamente). Curiosamente, observamos também uma discreta concentração dos pontos de fluorescência quando as células foram expostas ao peptídeo por 60 minutos, o que nos sugere que exista uma agregação ou uma vesiculação do peptídeo internalizado (Figura 13D e Figura 12B).

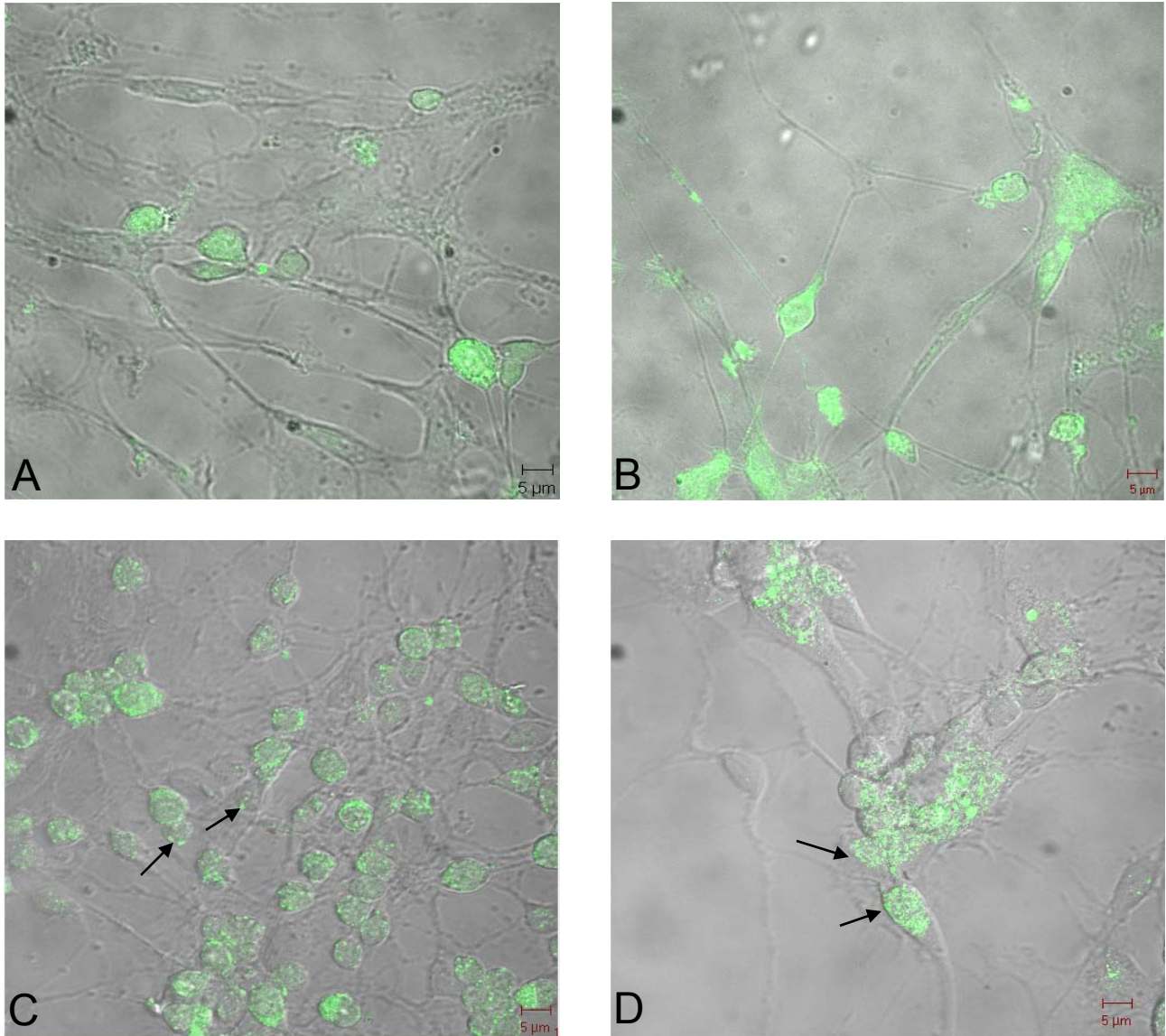


Figura 13. Internalização do peptídeo fluo-A β 42. Culturas primárias de neurônio de retina de pinto (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 2 nM fluo-A β 42 por 5 min (A), 10 min (B), 30 min (C), 60 min (D). Aumento de 63x. Barra de calibração, 5 μ m.

IV.3 Caracterização do peptídeo fluo-A β ₁₋₄₂ internalizado:

Durante anos acreditou-se que a causa dos distúrbios observados na DA seriam as placas amilóides, porém descobertas recentes demonstraram que os grandes vilões seriam as estruturas oligoméricas de A β , e que possivelmente a formação das placas seria, na verdade, um mecanismo de defesa do organismo (Carter & Lippa, 2001). Para analisar o estado conformacional do peptídeo que se mostra internalizado nas células em cultura utilizamos anticorpos específicos para estruturas oligoméricas. Neste método, uma gota (~2 μ L) das amostras de A β ₄₂, preparadas conforme descrito por Chang e colaboradores (2000), foi aplicada em membrana de nitrocelulose; esta membrana então foi tratada com um anticorpo específico para oligômeros de A β menores, compostos de trímeros e tetrâmeros solúveis (11B5 – Figura 14), e também com um outro anticorpo para espécies oligoméricas maiores (maiores que 24mers (20C2 – Figura 14)) (Lambert et al., 2007). Pode ser observado na Figura 14 que o peptídeo fluo-A β ₁₋₄₂ apresenta marcação específica para a forma oligomérica menor (11B5).

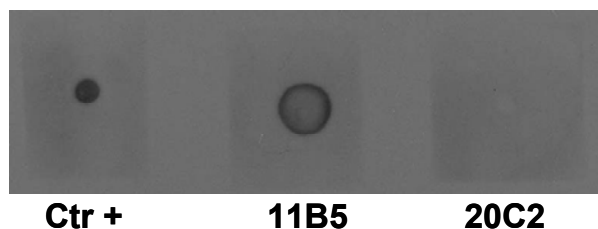


Figura 14. Caracterização da preparação de fluo-A β ₄₂. Dot Blot utilizando anticorpo anti-A β (Sta Cruz Biotechnology Inc.) como controle positivo (**Ctrl +**), anticorpos anti-oligômeros solúveis menores (**11B5**) e anticorpos anti-oligômeros maiores (**20C2**).

Visando confirmar este resultado, traçamos uma comparação entre o padrão de cromatografia por gel filtração do peptídeo conjugado utilizado nas culturas de célula e o padrão cromatográfico de preparações específicas de espécies oligoméricas solúveis de A β (ADDLs) realizadas no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas chefiado pelo Prof. Sérgio Ferreira. Puderam ser observadas no perfil de eluição duas populações de agregados, sendo a primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), que elui entre 3,5 – 4 minutos, e uma segunda fase que elui entre 7,5 – 8 minutos, composta de

agregados de 2-3 monômeros (Figura 10). Os resultados dessa comparação mostram claramente que as preparações de fluo-A β_{1-42} apresentam espécies oligoméricas similares às vistas na cromatografia de preparações específicas de ADDLs (Figura 15).

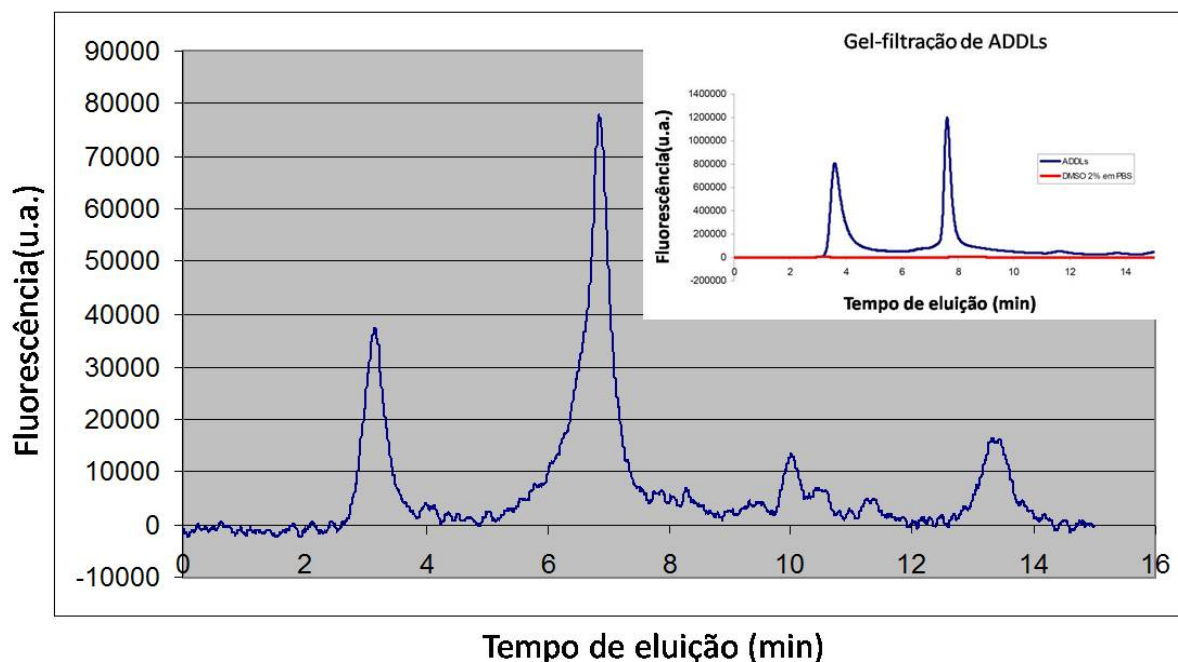


Figura 15. Cromatograma de gel-filtração de fluo-A β . Através da gel-filtração, utilizando uma coluna de sílica SynChropak® GPC 100, é possível detectar duas populações de agregados. A primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), elui entre 3,5 – 4 minutos. Eluição entre 6 – 8 minutos apresenta pequenos oligômeros solúveis. No inserto o cromatograma representativo de gel filtração de ADDLs.

IV.4 Viabilidade das culturas tratadas com o peptídeo fluo-A β_{1-42} :

Sendo as estruturas oligoméricas consideradas atualmente as maiores vilãs da DA (Lambert et al., 2007), e tendo em vista que as preparações utilizadas nos experimentos de internalização apresentam majoritariamente espécies oligoméricas solúveis, avaliamos a viabilidade das culturas tratadas com fluo-A β_{1-42} nas condições utilizadas nos experimentos e descritas anteriormente. As células tratadas foram submetidas a um ensaio de viabilidade celular por MTT. As culturas expostas à concentrações subletais do peptídeo no período de tempo máximo em que observamos internalização (60 min) mostraram-se metabolicamente ativas, apresentando uma pequena diferença não significativa em relação ao controle (Figura 16).

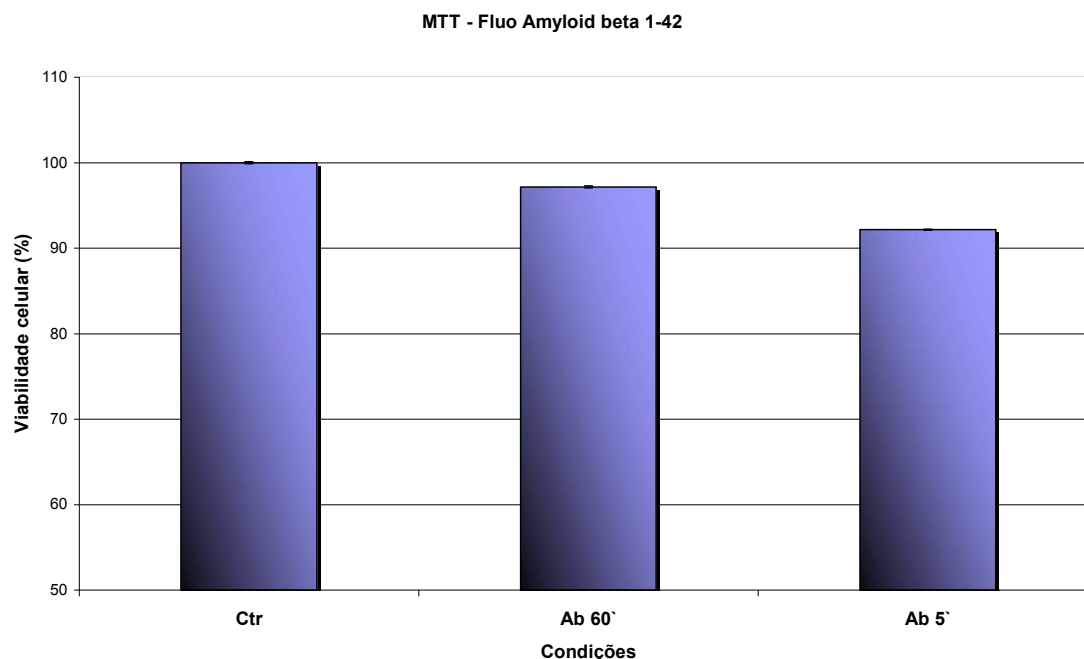


Figura 16. Ensaio de viabilidade celular por MTT. Viabilidade das culturas primárias de neurônio de retina (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 10 nM fluo-A β 42 por 5 min (**Ab5'**) e 60 min (**Ab60'**). Resultados apresentados em valores percentuais de viabilidade celular relativo ao controle (**Ctr** - não tratadas). n=4, *mean* \pm SE.

IV.5 Distribuição de miosina Vb em neurônios de retina:

Visando avaliar se a internalização do peptídeo é dependente de proteínas motoras, utilizamos anticorpo anti-miosina Vb para determinar a distribuição da proteína motora nos neurônios em cultura. Pode ser observado na Figura 18 a distribuição da MVb. Para confirmar a especificidade do anticorpo anti-miosina Vb utilizado, foi preparado um homogenato a partir da raspagem das células da cultura primária de neurônios de retina de embriões de pinto. As proteínas foram separadas em gel de eletroforese com SDS e transferidas para membrana de nitrocelulose. Em seguida, foram submetidas ao tratamento com o anticorpo anti-miosina Vb em *Western blot*, e revelaram marcação de banda única correspondente à miosina Vb (~ 212 kDa) (Figura 17).



Figura 17. *Western Blot* para miosina Vb. Duas diluições do homogenato das células de cultura primária de neurônios de retina (E8). As proteínas, após separadas em gel de SDS, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, submetidas ao tratamento com o anticorpo anti-miosina Vb e reveladas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, exibindo marcação de banda única correspondente à miosina Vb (~ 212 kDa).

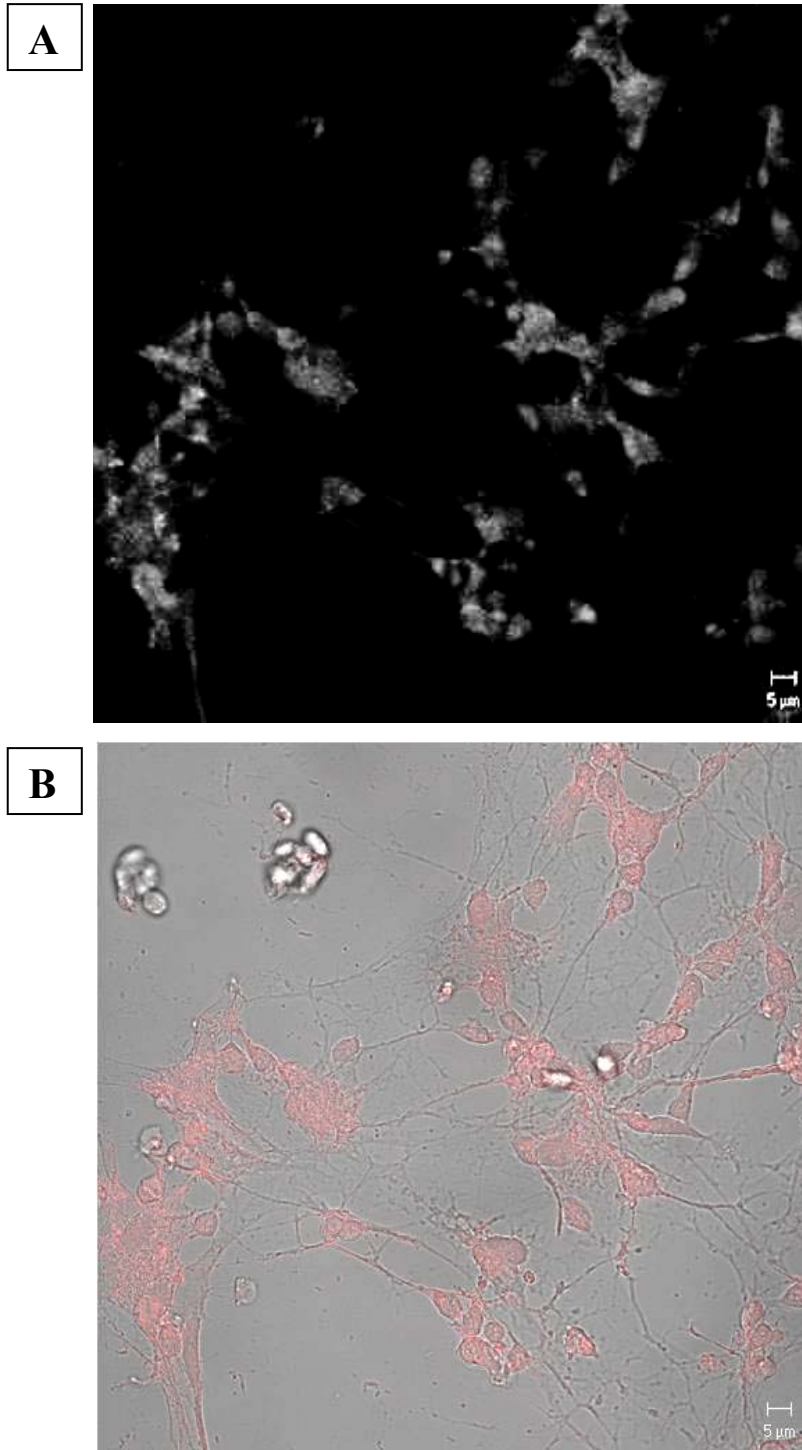


Figura 18. Distribuição de miosina Vb. Culturas primárias de neurônio de retina (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com anticorpo anti-miosina Vb* (1µg/ml), revelada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com rodamina. Aumento de 63X.*Gentilmente cedido pela Dr^a. Marie-France Lise (The Brain Centre, Dept. Psychiatry – University of British Columbia). Em A, imagem de microscopia de fluorescência e em B, sobreposição da imagem de fluorescência com a imagem de campo claro. Barra de calibração = 5 µm.

IV.6 Co-localização de *clusters* de fluo- A β ₁₋₄₂ com miosina Vb:

Visto que a internalização de espécies oligoméricas solúveis ocorre em um período em torno de 5 minutos e que o padrão de distribuição do peptídeo internalizado apresenta modificações no decorrer do tempo, podemos afirmar que o peptídeo internalizado se desloca no interior das células em cultura. Quando as culturas primárias de células neuronais foram expostas ao tratamento com 2nM A β 42 e preparadas para imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-miosina Vb, observou-se com a utilização do microscópio confocal, uma marcante co-localização entre a proteína (MVb) e o peptídeo, sugerindo a interação entre ambos (Figura 19).

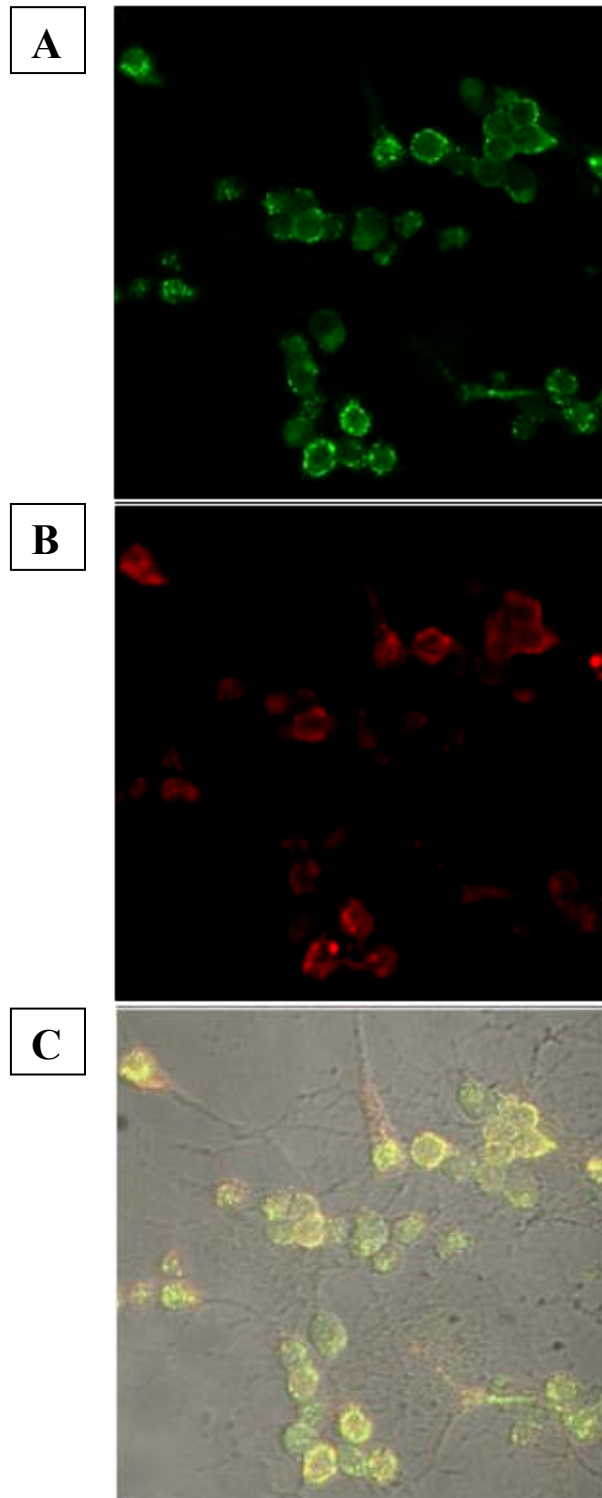


Figura 19. Co-localização de miosina Vb e fluo-A β 42. Culturas primárias de neurônio de retina (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 2 nM fluo-A β 42 por 60 min fixadas e marcadas com anticorpo anti-miosina Vb, revelado com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com rodamina. Aumento de 63X. No painel A vemos as vesículas contendo fluo-A β 42 intraneuronais; podemos observar o mesmo padrão de distribuição de miosina Vb marcada com rodamina (B) e no painel C temos a sobreposição das duas imagens mostrando uma intensa co-localização de vesículas contendo fluo-A β 42 com miosina Vb.

IV.7 Curva temporal da co-localização dos *clusters* de fluo- $A\beta_{1-42}$ com miosina Vb:

No decorrer do tempo de tratamento com fluo- $A\beta_{1-42}$, quando realizamos os ensaios de imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-miosina Vb, observamos que ocorre uma intensificação dessa co-localização em função do tempo de exposição ao peptídeo (Figura 20). Estes dados nos levam a acreditar que é possível que a interação entre a proteína motora MVb e os “*clusters*” intracelulares de $A\beta$ seja sinalizada de maneira que, quanto maior o acúmulo de $A\beta$, maior a necessidade de recrutamento de proteínas motoras.

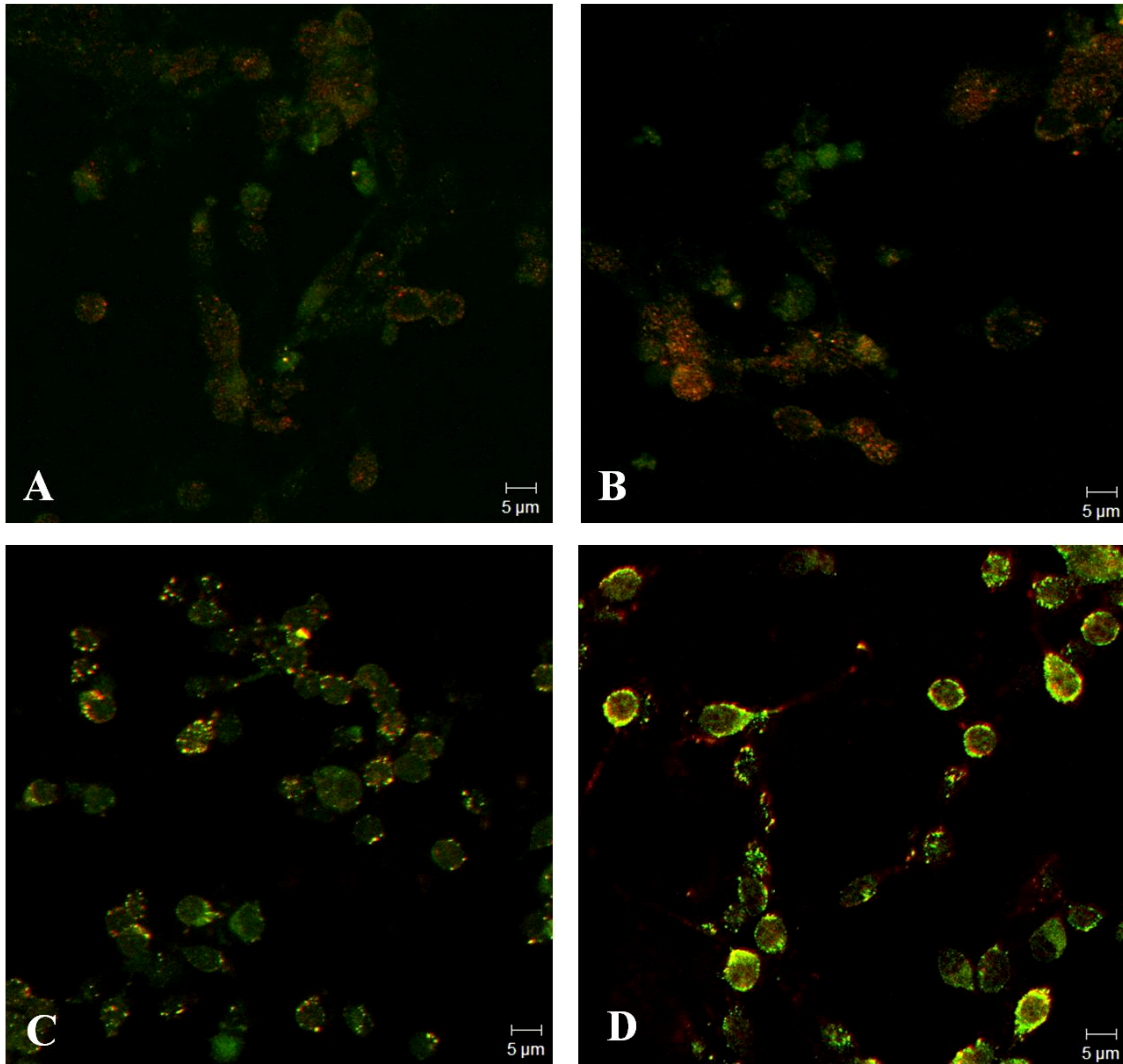


Figura 20. Recrutamento de miosina Vb no período de internalização do fluo-A β 42. Culturas primárias de neurônio de retina (E8) mantidas por 4 dias *in vitro* (4DIV) e depois tratadas com 2 nM fluo-A β 42 por 5 min (A), 10 min (B), 30 min (C) e 60 min, posteriormente fixadas e marcadas com anticorpo anti-miosina Vb, revelado com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com rodamina. Observa-se uma mudança progressiva no padrão de distribuição de miosina Vb com o tempo. Aumento de 63X. Barra de calibração = 5 μ m.

V. Discussão e conclusões:

Com o envelhecimento progressivo da população e a possibilidade de surgimento de uma epidemia de demência e reconhecendo que a probabilidade da ocorrência da doença de Alzheimer aumenta com a idade, grandes esforços têm sido feitos a fim de identificar e desenvolver fármacos com uso potencial no tratamento da DA. Para isso é fundamental uma melhor compreensão da etiologia da DA (Jantas-Skotniczna et al., 2006). Inicialmente foi postulado que a formação de agregados de A β teria como conseqüência a disfunção sináptica, estresse oxidativo, alteração na resposta a neurotransmissores e demais eventos característicos da DA. Porém, os estudos que levaram a estas conclusões trabalhavam com altas concentrações de A β , que apresentavam não somente oligômeros, mas também a formação de fibrilas, fibras e placas amilóides.

Apesar de existirem muitas lacunas com respeito aos mecanismos envolvidos nos eventos disparados pelo peptídeo A β na DA, já foi proposto muito sobre o A β , em sua forma oligomérica solúvel, nas alterações sinápticas, na formação de memória e nos demais processos que caracterizam seu efeito neurotóxico (Cleary et al., 2005; Haass & Selkoe, 2007; De Felice et al., 2007). Dentre os atuais mecanismos propostos de ação do A β podemos destacar um possível desequilíbrio entre as formas de A β 40/A β 42 produzidas. Foi demonstrado que a agregação e a toxicidade dependem da manutenção do equilíbrio na produção de A β ; outra idéia seria que os oligômeros de A β disparem mecanismos de toxicidade ao penetrarem na célula (Yoshiike et al., 2003).

Neste trabalho buscamos avaliar as duas possibilidades a partir da internalização do peptídeo em baixas concentrações, considerando que essa seria uma possível via de depuração do peptídeo. Os resultados obtidos (Figura 11) não só comprovam uma internalização como também nos induzem a acreditar que a internalização seria realmente um mecanismo de proteção contra o A β 42, uma vez que o A β 42 é internalizado e a isoforma A β 40 não é. Este resultado evidencia que a internalização é altamente seletiva.

Partindo basicamente destas hipóteses, Plant *et al.* (2003) descreveram possíveis mecanismos para regulação destes processos e demonstraram que a inibição da produção fisiológica de A β implica em toxicidade e comprometimento de viabilidade celular; que a utilização de A β 40 exógeno é capaz de reverter este quadro e que a utilização de A β 42 exógeno não tem a mesma eficácia neste processo. Foi sugerido também que o A β 40

produzido fisiologicamente é necessário para o funcionamento normal de células neuronais (Plant et al., 2003). Estes dados confirmam que o fato da produção de A β 40 representar 90% da produção fisiológica de A β não ocorre ao acaso e que o desequilíbrio na produção de A β com um conseqüente decréscimo na produção de A β 40 por si só já representaria um problema para a célula. Este fato somado ao aumento da produção de A β 42 resultaria em uma severa redução na viabilidade dos neurônios.

Nosso resultado ao identificar a conformação das isoformas do peptídeo assim como a utilização de concentrações abaixo do limiar descrito como letal, nos permite assim mimetizar uma situação anterior ao aparecimento de danos característicos da doença, na qual temos monômeros, formando pequenos oligômeros em concentrações muito baixas. Vimos que, em baixas concentrações, mesmo havendo internalização o tratamento não representa dano tóxico às células em cultura (Fig. 16).

A internalização do peptídeo A β e o seu acúmulo gerando disfunção sináptica já haviam sido sugeridos (Kayed et al., 2003). Nossos dados sugerem que essa internalização seria uma consequência de dois fatores: o excesso de A β 42 encontrado do lado de fora da célula e a seletividade da autofagia.

Termo genérico utilizado para descrever os processos de transporte de componentes do citosol para os lisossomos, a autofagia apresenta três tipos de processos (macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas), dos quais a macroautofagia é responsável majoritariamente pelo processo de degradação protéica (Cuervo et al., 2004).

O acúmulo de vacúolos autofágicos vem sendo relacionado com inúmeras doenças humanas, dentre elas doenças tipicamente neurodegenerativas como DA, doença de Huntington e Parkinson (Mizushima & Hara, 2006). Nestes casos a autofagia seria aumentada para eliminar proteínas anormais. Estas poderiam se acumular dentro das células em agregados ou corpos de inclusão (Ravikumar et al., 2003), tendo assim o processo de autofagia um papel importante no *clearance* destas proteínas (Komatsu et al., 2005).

Notadamente em nossos resultados observamos que durante a exposição das células ao peptídeo ocorre um aumento na concentração do A β em pontos específicos (Figura 13), sugerindo que pode haver uma agregação intraneuronal. Imaginamos que esse acúmulo poderia ser responsável por iniciar o processo degenerativo, ou de maneira oposta,

representar um acúmulo em grandes vesículas agrupadas para a degradação do peptídeo formado.

A contribuição do A β intraneuronal na cascata de eventos neurodegenerativos vem sendo reconhecida recentemente. Apesar das evidências que indicam que o A β extracelular contribui para o acúmulo de A β intracelular (Glabe, 2001; D'Andrea et al., 2001), os mecanismos envolvidos na internalização do peptídeo pelos neurônios permanecem indefinidos. Foi demonstrado que a internalização de A β é mais eficiente nos axônios do que no corpo celular dos neurônios, sugerindo que esse seja o ponto de entrada e que o processo de internalização deve ser mediada por proteínas concentradas nos axônios (Kokubo et al., 2005; Saavedra et al., 2007). Daí o crescente interesse em verificar possíveis alterações na expressão e distribuição de proteínas como a miosina Vb.

Estudos em modelos animais da DA sustentam que o acúmulo de A β precede a formação das placas amilóides (Wirhth et al., 2001) e que anormalidades na LTP e disfunções cognitivas estão correlacionadas ao seu aparecimento antes mesmo da ocorrência de placas e emaranhados (Oddo et al., 2003; Billings et al., 2005).

Já foi sugerido que o acúmulo de A β intracelular seria resultado da diminuição da produção de APP nas células (Small, 1998). Posteriormente, foram propostos mecanismos que envolviam endocitose (Gouras et al., 2000). Atualmente postula-se que o acúmulo intracelular de A β resulta de uma combinação entre os processos de diminuição da degradação de A β ; aumento da produção intracelular de A β ; e aumento da captação de A β extracelular (D'Andrea et al., 2001).

Proteínas motoras que se movem ao longo de filamentos de actina ou microtúbulo são responsáveis pelo movimento de organelas e seu transporte entre compartimentos celulares. Os filamentos de actina e os microtúbulos são conhecidos por ajudar na separação do material celular durante a divisão celular, conferir forma à célula, compor a arquitetura subcelular e ainda funcionar como “trilho” para esse transporte de organelas. Em modelos animais, foi observado que em microtúbulos ocorre o transporte de longa distância enquanto que os filamentos de actina são mais utilizados para transporte de curta distância, tanto na periferia celular quanto no corpo celular (para revisão ver Soldati & Schliwa, 2006). Estes movimentos ocorrem pela ação de 3 proteínas motoras dependente de ATP: miosina, kinesina e dineína, proteínas que apresentam uma diversidade de famílias com

funções específicas. Dentre essas funções destacamos o envolvimento dessas proteínas motoras no transporte de endossomos e no tráfego de vesículas ao longo de processos de endocitose e reciclagem.

Os processos de endocitose envolvem a “captação” de nutrientes do meio e evitam a necessidade de secreção de enzimas com propósito de digestão extracelular, sendo dividido em fagocitose; pinocitose; macropinocitose; endocitose mediada por clatrina; endocitose mediada por caveolina; e endocitose independente de clatrina ou calveolina (Conner & Schmid, 2003; Nichols, 2002).

Processos de reciclagem de materiais endocitados e componentes da superfície digital envolvem uma variedade de eventos em diferentes compartimentos ao longo do processo (Maxfield & McGraw, 2004). A maioria dos processos de reciclagem se inicia na formação de endossomos primários, de onde componentes da superfície celular podem ser reciclados e redirecionados à membrana plasmática em um processo de reciclagem rápida, assim como pode ser envolvido em um sistema de membranas conhecido como compartimento de reciclagem endocítica onde ocorre a formação dos chamados endossomos tardios. Neste processo o material pode retornar à superfície celular por um processo de reciclagem mais lento ou até mesmo ser direcionado para lisossomos ou para o complexo *trans*-Golgi.

No processo de internalização, a miosina V é encarregada de direcionar o fagossomo para o sistema de transporte baseado em microtúbulos (Araki, 2006). No transporte de componentes da membrana plasmática, dos endossomos para a superfície celular, a miosina V também desempenha um papel importante. Em vários tipos celulares foi descrito a participação da miosina Vb na reciclagem de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), de receptores de transferrina, quimoquinas e acetilcolina (Lindsay & McCaffrey, 2002; Volpicelli et al., 2002; Wakabayashi et al., 2005). As duas outras integrantes da superfamília da miosina V também têm seu papel destacado em processos de reciclagem. Foi descrito em astrócitos a associação da miosina Va com endossomos de reciclagem (Stachelek et al., 2001). Em cultura de células humanas a miosina Vc parece contribuir na reciclagem de receptores de transferrina (Rodriguez & Cheney, 2002).

Um dos pontos de maior destaque deste trabalho vai um pouco além da marcante co-localização da miosina Vb com o A β (Figura 19). Observamos que assim como a internalização do peptídeo se intensifica com tempo de exposição, também é possível

observar um aumento na intensidade da co-localização da miosina Vb com o A β internalizado. Tal fato sugere a existência de um mecanismo capaz de recrutar a miosina Vb em função do aumento da concentração intracelular de A β .

Apesar do que se sabe sobre a miosina V, algumas perguntas ainda estão por ser respondidas. Sabe-se da existência de inúmeras proteínas acessórias capazes de ligar a proteína motora a sua carga específica (para revisão ver Li & Nebenfuhr, 2008). Existem outros casos em que a proteína acessória é desconhecida, assim como casos em que não se sabe o mecanismo que determina a formação ou dissociação na hora e no local certo. Não está totalmente esclarecido se a ligação da carga, somente, seria suficiente para ativar a miosina V. A interação entre miosina V e outras proteínas motoras de uma célula, através da presença simultânea destas na mesma carga é atualmente um campo de estudo muito explorado.

Nossos resultados, até aqui, sugerem um novo mecanismo de defesa contra os oligômeros de A β . Trata-se de um processo de depuração, no qual a internalização do A β se mostra bastante específica. Qualquer progresso em identificar eventos moleculares envolvidos na internalização neuronal de A β e em um possível sistema de depuração da isoforma tóxica deste peptídeo representa um potencial alvo terapêutico.

Podemos afirmar também que estes resultados criam uma nova visão sobre a importância da participação da miosina Vb em processos de endocitose, reciclagem e no transporte de vesículas granulo-secretoras e levanta novas propostas de estudos sobre a interação entre proteínas motoras e vesículas, proteínas acessórias às proteínas motoras e, principalmente, mecanismos de regulação do tráfego de vesículas.

VI. Referências bibliográficas

1. Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., & Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin. Anat.* 8, 429-431.
2. Apodaca, G. (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic.* 2, 149-159.
3. Araki, N. (2006). Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front Biosci.* 11, 1479-1490.
4. Avila, J. (2006). Tau protein, the main component of paired helical filaments. *J. Alzheimers. Dis.* 9, 171-175.
5. Avraham, K.B., Hasson, T., Sobe, T., Balsara, B., Testa, J.R., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (1997). Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1225-1231.
6. Baker, J.P. & Titus, M.A. (1998). Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 80-86.
7. Bandman, E. (1999). Functional properties of myosin isoforms in avian muscle. *Poult. Sci.* 78, 729-734.

8. Benashski, S.E., Harrison, A., Patel-King, R.S., & King, S.M. (1997). Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *J. Biol. Chem.* 272, 20929-20935.
9. Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., & LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* 45, 675-688.
10. Bridgman, P.C. (1999). Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J. Cell Biol.* 146, 1045-1060.
11. Burkel, B.M., von, D.G., & Bement, W.M. (2007). Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64, 822-832.
12. Burkhardt, J.K. (1998). The role of microtubule-based motor proteins in maintaining the structure and function of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404, 113-126.
13. Cameron, L.C., Carvalho, R.N., Araujo, J.R., Santos, A.C., Tauhata, S.B., Larson, R.E., & Sorenson, M.M. (1998). Calcium-induced quenching of intrinsic fluorescence in brain myosin V is linked to dissociation of calmodulin light chains. *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 35-42.

14. Carter, J. & Lippa, C.F. (2001). Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.* 1, 733-737.
15. Catlett, N.L., Duex, J.E., Tang, F., & Weisman, L.S. (2000). Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *J. Cell Biol.* 150, 513-526.
16. Catlett, N.L. & Weisman, L.S. (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14799-14804.
17. Cheney, R.E. & Mooseker, M.S. (1992). Unconventional myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 27-35.
18. Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., & Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79-84.
19. Coelho, M.V. & Larson, R.E. (1993). Ca(2+)-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin-V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 465-472.
20. Cole, N.B. & Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 55-64.
21. Conde, C. & Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 319-332.

22. Conner, S.D. & Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422, 37-44.
23. Coureux, P.D., Sweeney, H.L., & Houdusse, A. (2004). Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J.* 23, 4527-4537.
24. Cramer, L. (2008). Organelle transport: dynamic actin tracks for myosin motors. *Curr. Biol.* 18, R1066-R1068.
25. D'Andrea, M.R., Nagele, R.G., Wang, H.Y., Peterson, P.A., & Lee, D.H. (2001). Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology*. 38, 120-134.
26. De Felice, F.G., Houzel, J.C., Garcia-Abreu, J., Louzada, P.R., Jr., Afonso, R.C., Meirelles, M.N., Lent, R., Neto, V.M., & Ferreira, S.T. (2001). Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy. *FASEB J.* 15, 1297-1299.
27. 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, 11590-11601.

28. De La Cruz, E.M., Sweeney, H.L., & Ostap, E.M. (2000). ADP inhibition of myosin V ATPase activity. *Biophys. J.* 79, 1524-1529.
29. De La Cruz, E.M., Wells, A.L., Rosenfeld, S.S., Ostap, E.M., & Sweeney, H.L. (1999). The kinetic mechanism of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13726-13731.
30. dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., & Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83, 433-473.
31. El-Amraoui, A. & Petit, C. (2005). Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J. Cell Sci.* 118, 4593-4603.
32. Espindola, F.S., Espreafico, E.M., Coelho, M.V., Martins, A.R., Costa, F.R., Mooseker, M.S., & Larson, R.E. (1992). Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell Biol.* 118, 359-368.
33. Espindola, F.S., Suter, D.M., Partata, L.B., Cao, T., Wolenski, J.S., Cheney, R.E., King, S.M., & Mooseker, M.S. (2000). The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 47, 269-281.

34. Espreafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A., De Camilli, P.V., Larson, R.E., & Mooseker, M.S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 119, 1541-1557.
35. Espreafico, E.M., Coling, D.E., Tsakraklides, V., Krogh, K., Wolenski, J.S., Kalinec, G., & Kachar, B. (1998). Localization of myosin-V in the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8636-8641.
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., & Sczuzfca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 366, 2112-2117.
37. Fitts, R.H. (2008). The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 104, 551-558.
38. Glabe, C. (2001). Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 17, 137-145.
39. 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, 1131-1135.
40. Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., Greengard, P., &

- Relkin, N.R. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15-20.
41. 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, 11-32.
42. Haass, C. & Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101-112.
43. Hannemann, D.E., Cao, W., Olivares, A.O., Robblee, J.P., & De La Cruz, E.M. (2005). Magnesium, ADP, and actin binding linkage of myosin V: evidence for multiple myosin V-ADP and actomyosin V-ADP states. *Biochemistry.* 44, 8826-8840.
44. Hardy, J. & Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297, 353-356.
45. Hardy, J.A. & Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256, 184-185.
46. Hasson, T., Gillespie, P.G., Garcia, J.A., MacDonald, R.B., Zhao, Y., Yee, A.G., Mooseker, M.S., & Corey, D.P. (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* 137, 1287-1307.

47. Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., & Shea, T.B. (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* 78, 249-253.
48. Hodge, T. & Cope, M.J. (2000). A myosin family tree. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3353-3354.
49. Holt, J.P., Bottomly, K., & Mooseker, M.S. (2007). Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64, 756-766.
50. Huxley, A.F. (1974). Muscular contraction. *J. Physiol.* 243, 1-43.
51. Jaffe, A.B., Hall, A., & Schmidt, A. (2005). Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr. Biol.* 15, 405-412.
52. Jantas-Skotniczna, D., Kajta, M., & Lason, W. (2006). New targets for putative neuroprotective agents. *Acta Pol. Pharm.* 63, 359-368.
53. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., & Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 300, 486-489.

54. Kim, W. & Hecht, M.H. (2005). Sequence determinants of enhanced amyloidogenicity of Alzheimer A β 42 peptide relative to A β 40. *J. Biol. Chem.* 280, 35069-35076.
55. Kokubo, H., Kaye, R., Glabe, C.G., & Yamaguchi, H. (2005). Soluble A β oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1031, 222-228.
56. Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., & Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425-434.
57. Kremer, H., van, W.E., Marker, T., Wolfrum, U., & Roepman, R. (2006). Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No 2, R262-R270.
58. Kussel-Andermann, P., El-Amraoui, A., Safieddine, S., Hardelin, J.P., Nouaille, S., Camonis, J., & Petit, C. (2000). Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein. *J. Biol. Chem.* 275, 29654-29659.
59. Lambert, M.P., Velasco, P.T., Chang, L., Viola, K.L., Fernandez, S., Lacor, P.N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E.H., Shaw, P., De Felice, F.G., Krafft, G.A., & Klein, W.L. (2007). Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . *J. Neurochem.* 100, 23-35.

60. Langford, G.M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic*. 3, 859-865.
61. Langford, G.M. & Molyneaux, B.J. (1998). Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28, 1-8.
62. Lapierre, L.A. & Goldenring, J.R. (2005). Interactions of myosin vb with rab11 family members and cargoes traversing the plasma membrane recycling system. *Methods Enzymol.* 403, 715-723.
63. Larson, R.E., Espindola, F.S., & Espreafico, E.M. (1990). Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem.* 54, 1288-1294.
64. Larson, R.E., Pitta, D.E., & Ferro, J.A. (1988). A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 213-217.
65. Li, J.F. & Nebenfuhr, A. (2008). The tail that wags the dog: the globular tail domain defines the function of myosin V/XI. *Traffic*. 9, 290-298.
66. Lindsay, A.J. & McCaffrey, M.W. (2002). Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277, 27193-27199.
67. Lise, M.F., Wong, T.P., Trinh, A., Hines, R.M., Liu, L., Kang, R., Hines, D.J., Lu, J., Goldenring, J.R., Wang, Y.T., & El-Husseini, A. (2006).

- Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 281, 3669-3678.
68. Lorenzo, A. & Yankner, B.A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12243-12247.
69. 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, 59-63.
70. 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, 511-518.
71. Mattson, M.P. (2000). Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary restriction, telomerase activation, and stem cell therapy. *Exp. Gerontol.* 35, 489-502.
72. Mattson, M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430, 631-639.
73. Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 121-132.

74. Mercer, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*. 349, 709-713.
75. Minin, A.A. & Moldaver, M.V. (2008). Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc.)*. 73, 1453-1466.
76. Mizushima, N. & Hara, T. (2006). Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy*. 2, 302-304.
77. Mooseker, M.S. & Cheney, R.E. (1995). Unconventional myosins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 633-675.
78. Muresan, V., Stankewich, M.C., Steffen, W., Morrow, J.S., Holzbaur, E.L., & Schnapp, B.J. (2001). Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol. Cell*. 7, 173-183.
79. Myers, K.R. & Casanova, J.E. (2008). Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. *Trends Cell Biol.* 18, 184-192.
80. Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., & Breard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76, 11-18.
81. Nichols, B.J. (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 374-378.

82. Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 397-420.
83. Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., & LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 24, 1063-1070.
84. Oster, G. & Wang, H. (2003). Rotary protein motors. *Trends Cell Biol.* 13, 114-121.
85. Osterweil, E., Wells, D.G., & Mooseker, M.S. (2005). A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J. Cell Biol.* 168, 329-338.
86. Pastural, E., Ersoy, F., Yalman, N., Wulffraat, N., Grillo, E., Ozkinay, F., Tezcan, I., Gedikoglu, G., Philippe, N., Fischer, A., & de Saint, B.G. (2000). Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics.* 63, 299-306.
87. Pike, C.J., Cummings, B.J., & Cotman, C.W. (1992). beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. *Neuroreport.* 3, 769-772.
88. Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., & Pearson, H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci.* 23, 5531-5535.

89. Prekeris, R., Mayhew, M.W., Cooper, J.B., & Terrian, D.M. (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell Biol.* 132, 77-90.
90. Provance, D.W., Jr., Gourley, C.R., Silan, C.M., Cameron, L.C., Shokat, K.M., Goldenring, J.R., Shah, K., Gillespie, P.G., & Mercer, J.A. (2004). Chemical-genetic inhibition of a sensitized mutant myosin Vb demonstrates a role in peripheral-pericentriolar membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1868-1873.
91. Ravikumar, B., Stewart, A., Kita, H., Kato, K., Duden, R., & Rubinsztein, D.C. (2003). Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 12, 985-994.
92. Redowicz, M.J. (2002). Myosins and pathology: genetics and biology. *Acta Biochim. Pol.* 49, 789-804.
93. Rodriguez, O.C. & Cheney, R.E. (2002). Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 991-1004.
94. Rosenfeld, S.S., Houdusse, A., & Sweeney, H.L. (2005). Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J. Biol. Chem.* 280, 6072-6079.

95. Saavedra, L., Mohamed, A., Ma, V., Kar, S., & de Chaves, E.P. (2007). Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 282, 35722-35732.
96. Sack, S., Kull, F.J., & Mandelkow, E. (1999). Motor proteins of the kinesin family. Structures, variations, and nucleotide binding sites. *Eur. J. Biochem.* 262, 1-11.
97. Salerno, V.P., Calliari, A., Provance, D.W., Jr., Sotelo-Silveira, J.R., Sotelo, J.R., & Mercer, J.A. (2008). Myosin-Va mediates RNA distribution in primary fibroblasts from multiple organs. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 65, 422-433.
98. Sata, M., Stafford, W.F., III, Mabuchi, K., & Ikebe, M. (1997). The motor domain and the regulatory domain of myosin solely dictate enzymatic activity and phosphorylation-dependent regulation, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 91-96.
99. Selkoe, D.J. (2001). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11039-11041.
100. Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496, 3-22.
101. Sellers, J.R. (2004). Fifty years of contractility research post sliding filament hypothesis. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 475-482.

102. Shimmen, T. & Yokota, E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 68-72.
103. Small, D.H. (1998). The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem. Res.* 23, 795-806.
104. Smythe, E. & Ayscough, K.R. (2006). Actin regulation in endocytosis. *J. Cell Sci.* 119, 4589-4598.
105. Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic.* 4, 358-366.
106. Soldati, T. & Schliwa, M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 897-908.
107. Stachelek, S.J., Tuft, R.A., Lifschitz, L.M., Leonard, D.M., Farwell, A.P., & Leonard, J.L. (2001). Real-time visualization of processive myosin 5a-mediated vesicle movement in living astrocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 35652-35659.
108. Sweeney, H.L. (1998). Regulation and tuning of smooth muscle myosin. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 158, S95-S99.
109. Sweeney, H.L. & Houdusse, A. (2007). What can myosin VI do in cells? *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 57-66.

110. Szent-Gyorgyi, A.G. (1953). Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch. Biochem. Biophys.* 42, 305-320.
111. Takagishi, Y., Futaki, S., Itoh, K., Espreafico, E.M., Murakami, N., Murata, Y., & Mochida, S. (2005). Localization of myosin II and V isoforms in cultured rat sympathetic neurones and their potential involvement in presynaptic function. *J. Physiol.* 569, 195-208.
112. Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J., & Omary, M.B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15, 608-617.
113. Tuxworth, R.I., Stephens, S., Ryan, Z.C., & Titus, M.A. (2005). Identification of a myosin VII-talin complex. *J. Biol. Chem.* 280, 26557-26564.
114. Van, G.M., Dynoodt, P., & Lambert, J. (2009). Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 268-282.
115. Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., & Sellers, J.R. (2005). Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat. Cell Biol.* 7, 861-869.
116. Visscher, K., Schnitzer, M.J., & Block, S.M. (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature.* 400, 184-189.

117. Volpicelli, L.A., Lah, J.J., Fang, G., Goldenring, J.R., & Levey, A.I. (2002). Rab11a and myosin Vb regulate recycling of the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurosci.* 22, 9776-9784.
118. Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J., & Arias, I.M. (2005). Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15087-15092.
119. Walker, M.L., Burgess, S.A., Sellers, J.R., Wang, F., Hammer, J.A., III, Trinick, J., & Knight, P.J. (2000). Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature.* 405, 804-807.
120. Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., & Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416, 535-539.
121. Wang, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E.V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer, J.A., III, & Sellers, J.R. (2000). Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J. Biol. Chem.* 275, 4329-4335.
122. Wang, F.S., Wolenski, J.S., Cheney, R.E., Mooseker, M.S., & Jay, D.G. (1996). Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. *Science.* 273, 660-663.

123. Watanabe, S., Mabuchi, K., Ikebe, R., & Ikebe, M. (2006). Mechanoenzymatic characterization of human myosin Vb. *Biochemistry*. 45, 2729-2738.
124. Weil, D., Levy, G., Sahly, I., Levi-Acobas, F., Blanchard, S., El-Amraoui, A., Crozet, F., Philippe, H., Abitbol, M., & Petit, C. (1996). Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3232-3237.
125. Wilson, S.M., Yip, R., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Zhang, Y., Novak, E.K., Swank, R.T., Russell, L.B., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7933-7938.
126. Winder, S.J. & Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118, 651-654.
127. Wirths, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., & Bayer, T.A. (2001). Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci. Lett.* 306, 116-120.
128. Woehlke, G. (2001). A look into kinesin's powerhouse. *FEBS Lett.* 508, 291-294.

129. Woehlke, G. & Schliwa, M. (2000). Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 50-58.
130. Wolfe, M.S. (2002). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 859-866.
131. Wu, G., Sankaranarayanan, S., Tugusheva, K., Kahana, J., Seabrook, G., Shi, X.P., King, E., Devanarayan, V., Cook, J.J., & Simon, A.J. (2008). Decrease in age-adjusted cerebrospinal fluid beta-secretase activity in Alzheimer's subjects. *Clin. Biochem.* 41, 986-996.
132. Wu, X., Kocher, B., Wei, Q., & Hammer, J.A., III. (1998). Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 40, 286-303.
133. Yoshiike, Y., Chui, D.H., Akagi, T., Tanaka, N., & Takashima, A. (2003). Specific compositions of amyloid-beta peptides as the determinant of toxic beta-aggregation. *J. Biol. Chem.* 278, 23648-23655.
134. Yun, M., Zhang, X., Park, C.G., Park, H.W., & Endow, S.A. (2001). A structural pathway for activation of the kinesin motor ATPase. *EMBO J.* 20, 2611-2618.

Leandro Teixeira de Oliveira

Mestre em Química Biológica - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Endereço para correspondência:

Rua Oto de Alencar 31/103

Tijuca

Rio de Janeiro - Brasil

CEP: 20.271-220

Telefone: 2254-0202 / 2568-5174 / 9335-1817

E-mail: ltoliv@bioqmed.ufrj.br

Nascido a 04 de setembro de 1976, no Rio de Janeiro, Brasil, Solteiro.

Educação

- | | |
|------|--|
| 2001 | Ciências Biológicas (modalidade médica). Universidade do Rio de Janeiro. Concluído. |
| 2005 | Aperfeiçoamento. Laboratório de Biofísica Química de Proteínas. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). |
| 2009 | Mestrado em Química Biológica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). |
| 2009 | Doutorado em Química Biológica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). |

Distinções

- | | |
|-------------|---|
| 2004 - 2005 | Bolsista FAPERJ – Apoio Técnico. Laboratório de Biofísica Química de Proteínas. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). "Bases moleculares de abordagens terapêuticas inovadoras no tratamento de Doenças amiloidogênicas" |
| 2005 | Fellowship - PASI on Unconventional Myosins. Montana – EUA. |
| 2007 - | Bolsista CNPq – Mestrado – Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). |
| 2007 | Fellowship - 1st South American Workshop on Advanced Fluorescence Microscopy Techniques. Buenos Aires – Argentina. |
| 2008 | Prêmio 3º Melhor Trabalho de Mestrado – II Semana de Pós-graduação de Bioquímica Médica |
| 2009 | Bolsista CNPq – Doutorado – Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). |

Trabalhos apresentados em Congressos

- 2000 "Expression of myosin Va in mouse retina during development". Oliveira, LT; Chiarini, LB; Casaletti-Rosa, L; Linden, R; Cameron, LC. International Symposium on Myosin V.
- 2005 "Amyloid beta peptide toxicity is not mediated by hyperactivation of NO-Synthase in the avian retina". Oliveira, LT; Louzada, PRF; Mello, FG; Ferreira, ST. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq
- 2005 "A toxicidade do peptídeo beta amilóide não é mediada pela hiperativação da NO-sintase em retina de pinto". Oliveira, LT; Louzada, PRF; Mello, FG; Ferreira, ST. V Reunião Anual de Pesquisadores em Doenças de Alzheimer e Desordens Relacionadas.
- 2006 Palestra: "Neuroplasticidade, exercício e Alzheimer". III Simpósio Norte-Fluminense de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.
- 2007 "Intraneural A β peptide accumulation and the role of actin-based motors." Oliveira, L.T.; Salerno V.P.; de Carvalho, N.H.V.; Andrade, L.R.; de Mello, F.G.; Sorenson, M.M. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq.
- 2007 "Intraneural A β peptide accumulation and the role of actin-based motors." Oliveira, L.T.; Salerno V.P.; de Carvalho, N.H.V.; Andrade, L.R.; de Mello, F.G.; Sorenson, M.M. I Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica.
- 2008 "Class V myosin working against the clock: The participation of myosin V in A β peptide endocytosis and accumulation." Oliveira, L.T.; Matos P.A.; Andrade, L.R.; de Mello, F.G.; Sorenson, M.M.; Salerno V.P. I Congresso IBRO/LARC de Neurociências.
- 2008 "Miosinas da classe V trabalhando contra o relógio: Participação da miosina V na endocitose e no acúmulo do peptídeo Beta-amilóide." Oliveira, L.T.; Matos P.A.; Andrade, L.R.; de Mello, F.G.; Sorenson, M.M.; Salerno V.P. II Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica.

Participação em eventos Internacionais

- 2005 PASI on Unconventional Myosins. Montana – EUA.
- 2005 III International Training Course "Proteins as Cellular nanomachines: Molecular Motors, Channels & Pumps". RJ – Brasil.
- 2006 9th Meeting of the UNESCO Chair of Developmental Biology. RJ – Brasil.
- 2007 International Course in Molecular Motors, Cytoskeleton and Disease. RJ – Brasil.
- 2007 1st South American Workshop on Advanced Fluorescence Microscopy Techniques. Buenos Aires – Argentina.
- 2008 "Symposium on development and plasticity of the nervous system". RJ – Brasil
- 2008 I Congresso IBRO/LARC de Neurociências. RJ – Brasil.

Participação em Eventos Nacionais

- 2000 XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq
- 2004 XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq
- 2005 XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq
- 2005 V Reunião Anual de Pesquisadores em Doenças de Alzheimer e Desordens Relacionadas.
- 2006 III Simpósio Norte-Fluminense de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.
- 2007 XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq
- 2007 I Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica.
- 2008 Cátedra UNESCO – UFRJ. Bases Moleculares e Celulares das Doenças do Século XXI.
- 2008 II Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica.

Experiência em Pesquisa

- 1998 - 2001 Iniciação Científica – Laboratório de Bioquímica de Proteínas. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. “Identificação e caracterização de MiosinaV em retina de ratos.” Prof. L.C. Cameron (UNI-RIO) e Prof. Rafael Linden(UFRJ).
- 2003 - 2006 Aperfeiçoamento/Apoio Técnico – Laboratório de Biofísica Química de Proteínas. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. “Bases moleculares de abordagens terapêuticas inovadoras no tratamento de Doenças amiloidogênicas” Prof. Sergio T. Ferreira (UFRJ).
- 2007- 2009 Mestrado – Laboratório de Química Fisiológica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. “Interações moleculares entre o peptídeo A β e proteínas motoras neuronais.” Prof. Martha M. Sorenson e Prof. Verônica P. Salerno (UFRJ).
- 2009 - Doutorado – Laboratório de Química Fisiológica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. “Interações moleculares entre o peptídeo A β e proteínas motoras neuronais.” Prof. Martha M. Sorenson e Prof. Verônica P. Salerno (UFRJ).

Publicações

- 2007 “Excitotoxic concentrations of glutamate and β -amyloid peptide decrease nitric oxide production in retinal neurons in culture” **Oliveira, L.T.**; Louzada, P.R.F.; Mello, F.G.; Ferreira, S.T. (Manuscrito em preparação)
- 2008 “Class V myosin working against the clock: The participation of myosin Vb in A β peptide endocytosis and accumulation.” **Oliveira, L.T.**; Matos P.A.; Andrade, L.R.; de Mello, F.G.;

Sorenson, M.M.; Salerno V.P. (Manuscrito em preparação)

Experiência Didática

- 2002 Monitoria do I International Symposium on Myosin V and Training Course on Cell Motility, Molecular motors and the Cytoskeleton.
- 2004 Monitoria do II International Symposium on Myosin V and Training Course on Cell Motility, Molecular motors and the Cytoskeleton.
- 2006 Monitoria do III International Training Course “Proteins as Cellular nanomachines: Molecular Motors, Channels & Pumps”
- 2006 Palestra: “Neuroplasticidade, exercício e Alzheimer”. III Simpósio Norte-Fluminense de Fisiologia e Bioquímica do Exercício.
- 2008 - Orientação da aluna de Iniciação Científica Priscila de Araújo Matos.

Rio de Janeiro, Dezembro de 2009.

Leandro Teixeira de Oliveira

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](#)