

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA e IMUNOLOGIA - ICB

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL-FAC. MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA - FaFiCH

Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em
modelo experimental animal e estudo de mecanismos de
neurodegeneração em cultura celular

IÊDA DE FÁTIMA OLIVEIRA SILVA

Orientadora: Profa. Angela Maria Ribeiro

Co-Orientadora: Profa. Sílvia R. C. Pereira

BELO HORIZONTE

2007

IEDA DE FÁTIMA OLIVEIRA SILVA

Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Geral.

Orientadora: Profa. Ângela Maria Ribeiro

Co-Orientador: Profa. Sílvia Rejane Castanheira Pereira

Universidade Federal de Minas Gerais

2007

Agradecimentos

“Sustento que a religiosidade cósmica é a fonte mais forte e mais nobre da pesquisa científica. Só quem pode avaliar os esforços enormes e, sobretudo, o devotamento, sem o qual as criações científicas que abrem novos caminhos não poderiam ser realizadas, está em condições de apreciar a força do sentimento que, sozinho, pôde dar nascimento a um tal trabalho, desligado da vida prática imediata. Em nossa época materialista, os trabalhadores científicos sérios são os únicos homens que se conservam profundamente religiosos. Não posso conceber um cientista sem uma fé profunda. A ciência sem religião é manca, e religião sem ciência é cega.” ...

Albert Einstein

Os meus agradecimentos às professoras Ângela e Silvia, a minha gratidão pela orientação, amizade e apoio para a realização deste trabalho através do sólido suporte científico, durante todos esses anos. Agradeço principalmente por me ensinarem que não existem coisas difíceis, existe apenas o que conhecemos e o que não conhecemos.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo e observações bem humoradas.

Agradeço também à minha família, pais e irmãos por sempre acreditarem em mim e por estarem presentes em minha vida não só nos momentos felizes, mais principalmente naqueles difíceis.

Ao meu companheiro e grande amigo, Marcinho, que por todo estes anos sempre esteve ao meu lado, apoiando e me incentivando na busca dos meus sonhos e realidades.

Meus filhos, André e Ariana, vocês me fazem compreender que a vida é algo bom e verdadeiro. Vocês me levam a ter um poder de percepção para compreender que na vida tudo é possível. Deste que, se possa agir de maneira humana e de forma absolutamente conhecida por nós.

E, sobretudo a "Deus" por me fazer crer e acreditar que tudo é constante transformação e tudo deveria caminhar para o aperfeiçoamento.

Lista de abreviaturas

5-HIAA	Ácido 5 hidróxi-indolacético
5-HT	Serotonina
aa	Aminoácido
AMPARs	Receptores tipo ionotrópico para o glutamato : α -amino-3-hidróxi-5-metil-4- Isoxazole- propiônico,
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CAA	Controle Água Adulto
CAI	Controle Água Idoso
CaMPKII/CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i> (cinase dependente de Ca^{2+} / calmodulina)
KARs	Receptores tipo ionotrópico para glutamato: cainato
cdk5	<i>cyclin-dependent protein kinase 5</i> (proteína cinase dependente de ciclina 5)
CEI	Controle Etanol Idoso
CREB	<i>Response element binding protein</i> (proteína ligadora ao elemento responsivo ao AMP-c)
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
ERKs	<i>Extracellular signal-regulate protein kinases</i> (proteína cinase regulada por sinal extracelular)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLUT	Transportador de glutamato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GS	Glutamina sintetase
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i> (cinase 3 da glicogênio sintase)
HBSS	<i>Hank's balanced salts solution</i> (solução salina de Hank balanceada)
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho

OH ·	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
JNKs	<i>c-Jun N-terminal protein kinase</i> (proteína cinase N-terminal C-Jun)
MAO	Monoamina oxidase
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i> (proteína associada à Microtubulo)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> (cinase ativada por mitogeno)
MARK	<i>Microtubule-affinity regulating kinase</i> (cinase reguladora com afinidade para microtubulos)
mGluR	Receptor metabotrópico para glutamato
NMDARs	Receptores ionotrópicos para glutamato: N-metil-D-aspartato
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NB27	solução neurobasal para meio de cultura adicionada de suplementos B-27 (catálogo <i>Sigma</i>)
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i> (enovelamentos neurofibrilares)
NGF	Fator de crescimento neuronal
NMR	Núcleo medial da rafe

Lista de Figuras

Figura 01:	Esquema de um neurônio serotonérgico.....	29
Figura 02:	Esquema do labirinto aquático de Morris.....	46
Figura 03:	Estrutura da serotonina e Ácido 5-Hidroxiindolacético	48
Figura 04:	Corte histológico do tronco encefálico mostrando a localização do núcleo dorsal da rafe (experimento controle).....	52
Figura 05:	Perfil típico de um cromatograma	55
Figura 06:	Dados do modelo experimental.....	58
Figura 07:	Desempenho dos animais idosos no treino no labirinto aquático	61
Figura 08:	Desempenho dos animais adultos e idosos no treino no labirinto aquático	62
Figura 09:	Desempenho dos animais no teste comprobatório: Memória	63
Figura 10:	Desempenho dos animais no teste comprobatório: extinção de um comportamento.....	64
Figura 11:	Concentração de serotonina e do ácido 5-hidroxi-indolacético	66
Figura 12:	Taxa [5-HIAA]/[5-HT] no neocórtex, hipocampo, tálamo e núcleo dorsal da rafe	67
Figura 13:	Concentração de 5-HIAA em amostras de urina 24 h.....	68
Figura 14:	Concentração de óxido nítrico no neocortex.....	70
Figura 15:	Correlações entre a taxa [5-HIAA]/[5-HT] e desempenho no 1º. minuto do teste comprobatório (painel A) e índice de extinção (painel B).....	71
Figura 16:	Esquema de um terminal glutamatérgico.....	97
Figura 17:	Esquema de uma célula indicando diferentes componentes de sistemas de tradução de sinais	100
Figura 18:	Efeitos da concentração de glutamato e peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular.....	119

Figura 19:	Efeitos do glutamato e peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de incubação.....	120
Figura 20:	Ilustrações de imagens de <i>Western blot</i> , revelação por imunofluorescência (análise qualitativa)	122
Figura 21:	Ilustrações de imagens de <i>Western blot</i> (controle e proteína <i>tau</i>)	123
Figura 22:	Dados da análise qualitativa e quantitativa das proteínas fosfotirosina total.....	125
Figura 23:	Dados da análise quantitativa das isoformas da proteína <i>tau</i>	127
Figura 24:	Dados da análise quantitativa da GSK-3 $\alpha\beta$	130
Figura 25:	Dados da análise quantitativa da p38	132
Figura 26:	Dados da análise quantitativa da p44.....	134
Figura 27:	Dados da análise quantitativa da p42.....	136

Tabela

Tabela I:	Sítios de proteínas cinases para a proteína <i>tau</i>	107
-----------	--	-----

SUMÁRIO

RESUMOS EM PORTUGUÊS E EM INGLÊS.....	09
INTRODUÇÃO GERAL:	19

I-PARTE I: Experimentos com modelo experimental animal

I.1 INTRODUÇÃO

Aprendizagem, memória e extinção.....	22
Processo de envelhecimento e disfunções cognitivas.....	25
Sistemas neurotransmissores com enfoque no sistema serotoninérgico e disfunção cognitiva no envelhecimento.....	27
O sistema serotoninérgico.....	28
Sistema serotoninérgico, memória e envelhecimento.....	31
Radicais livres, restrição alimentar e envelhecimento.....	33
Consumo crônico de etanol, memória e envelhecimento.....	36

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 Gerais.....	40
I.2.2 Específicos.....	40

I.3 MATERIAL E MÉTODOS

Modelo animal e delineamento experimental.....	41
Esquema do delineamento experimental.....	43
Estudo comportamental.....	44
Estudo bioquímico.....	47
Análise estatística.....	57

I.4 RESULTADOS.....	58
I.5 DISCUSSÃO.....	72
I.6 CONCLUSÃO Parte I.....	80
Anexo:	
cópia do artigo publicado com resultados dos dados obtidos na Parte I...	184

II-PARTE II: Experimentos em cultura celular

II.1 INTRODUÇÃO

Mecanismos de morte celular

Neurodegeneração: apoptose e necrose.....	81
Morte celular induzida por:	
Excitotoxicidade.....	83
Espécies reativas de oxigênio.....	85
Degradação e agregação de proteínas.....	87
Componentes do sistema de neurotransmissão glutamatérgica.....	89
Glutamato e envelhecimento neurofibrilares.....	94
Glutamato e sistema de tradução de sinais.....	98
Peróxido de hidrogênio e envelhecimento neurofibrilares.....	101
Peróxido de hidrogênio e sistema de tradução de sinais.....	102
Estrutura e papel da proteína <i>tau</i>	104
Cinases e fosfatases envolvidas com a regulação da proteína <i>tau</i>	106
II.2 OBJETIVOS	
II.2.1 Geral.....	110

II.2.2 Específicos.....	110
II.3 MATERIAIS E MÉTODOS	
Cultura primária de neurônios.....	111
Delineamento experimental.....	112
Avaliação da viabilidade celular.....	112
Efeitos de diferentes concentrações de glutamato ou peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular.....	113
Efeitos do tempo de incubação na presença de glutamato ou peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular.....	113
Avaliação dos efeitos do glutamato (100 µM) e do peróxido de hidrogênio (1000 µM) sobre os níveis de fosforilação da proteína <i>tau</i> e de proteínas cinases.....	114
Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	114
<i>Western blot</i>	115
Anticorpos utilizados para detecção das fosfoproteínas.....	116
Análise estatística.....	117
II.4 RESULTADOS.....	118
II.5 DISCUSSÃO.....	137
II.6 CONCLUSÃO Parte II.....	144
CONCLUSÃO GERAL.....	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

Resumo

Os dois fenômenos, biológico e comportamental, abordados no presente trabalho são, envelhecimento cerebral e memória espacial. Vários estudos, comparativos e experimentais, têm mostrado que sujeitos idosos apresentam desempenho significativamente prejudicado em diferentes tipos de tarefas cognitivas. Sabe-se também que, existem contradições na literatura com relação às consequências da interação entre os efeitos do envelhecimento com os efeitos do consumo crônico de etanol e da restrição alimentar, tanto com relação aos efeitos biológicos quanto comportamentais. Apesar dos avanços e dos vários trabalhos realizados na tentativa de se entender os mecanismos neurobiológicos responsáveis por essas disfunções, pouco ainda se sabe sobre as bases biológicas correlacionadas com aspectos específicos de disfunções cognitivas no idoso. Dentre os diferentes sistemas neuroquímicos, um relativamente pouco estudado, com relação aos déficits no aprendizado e memória espacial no idoso, é o sistema serotoninérgico central. Uma outra questão relevante nessa abordagem biológica está relacionada com os mecanismos responsáveis pela neurodegeneração que possivelmente resultam em disfunções na atividade de circuitos neuroquímicos. Nesse sentido, a identificação precoce de alterações moleculares, associadas a esse processo, tem sido cada vez mais importantes para a compreensão das bases biológicas relacionadas com os déficits comportamentais normalmente associados com o envelhecimento e/ou com diversas neuropatologias. Um mecanismo comum que as células neuronais sofrem devido a injúrias agudas é desencadeado pela excitotoxicidade, um fenômeno que se desencadeia quando há um excesso na ativação de receptores de glutamato, os quais induzem uma série de processos intracelulares possivelmente associados com a neurodegeneração. Existem também evidências de que espécies reativas de oxigênio (p.ex. peróxido de hidrogênio), tanto no envelhecimento, como no alcoolismo crônico, e em várias doenças

cerebrais neurodegenerativas (p.ex. Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, etc), parecem estar envolvidos com o mecanismo de morte celular. Por outro lado, alguns trabalhos indicam que a Restrição Alimentar (RA), que consiste em uma redução do aporte calórico habitual, tem efeitos benéficos sobre o organismo, provavelmente através de um mecanismo que resulta na diminuição das espécies reativas de oxigênio. Já foi relatado que ela atua aumentando o tempo de vida dos animais e retarda o desenvolvimento de doenças degenerativas. Foram demonstrados efeitos protetores da RA sobre o SNC, como prevenção e/ou redução do estresse oxidativo, de insultos excitotóxicos ou metabólicos, défices sensoriais e motores e prejuízos cognitivos. Entre os sistemas intracelulares envolvidos com o mecanismo de morte celular, induzida altas concentrações de por glutamato e/ou espécies reativas de oxigênio, destaca-se o processo de fosforilação de proteínas. As reações de fosforilação e defosforilação são catalisadas por proteínas cinases e fosfatases, respectivamente. Elas desempenham um importante papel na tradução de sinais, responsáveis por uma série de eventos celulares, tais como, proliferação e morte celular. Alterações nas proteínas cinases e fosfatases estão relacionadas a várias disfunções celulares. As proteínas cinases não somente fosforilam seus substratos protéicos, como também são fosforiladas e defosforiladas sendo, portanto, também reguladas por fosforilação. O presente trabalho se divide em duas etapas, que correspondem a dois níveis diferentes de estudos. **(i)** Na primeira etapa, as variáveis independentes são: idade, consumo crônico de etanol e restrição alimentar calórica. Nessa etapa foi utilizado **modelo experimental animal**, ratos adultos (5 meses de idade) e idosos (16 meses de idade), e métodos da psicologia experimental e da bioquímica para avaliar aspectos do aprendizado e memória espacial e determinar parâmetros funcionais do sistema serotoninérgico central, respectivamente. Além disso, foi realizada uma avaliação da correlação entre os dados comportamentais e biológicos. **(ii)** Na segunda etapa, as variáveis independentes são diferentes condições de estímulos neurodegenerativos. Foi utilizado **cultura**

celular de neurônios e métodos bioquímicos para o estudo de componentes envolvidos com os mecanismos de morte celular. Na primeira etapa, utilizando ratos Wistar, observamos alterações relacionadas com a idade em aspectos da aprendizagem, memória e extinção de um comportamento no labirinto aquático de Morris. Utilizando o método cromatográfico (HPLC= *High Performance Liquid Chromatography*), verificamos também efeito significativo da idade nos níveis endógenos de serotonina (5-HT) e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no neocortex, hipocampo, tálamo e núcleo dorsal da rafe (NDR). Os animais idosos foram capazes de aprender a tarefa, no entanto, apresentaram um pior desempenho comparado ao dos animais adultos. Verificamos um declínio significativo dos níveis do 5-HIAA no hipocampo e no NDR dos animais idosos em relação aos níveis dos adultos. Observamos também uma diminuição da atividade serotoninérgica (taxa 5-HIAA/5-HT) nesta região cerebral. Análises de regressão mostraram uma correlação significativa, entre a taxa de atividade serotoninérgica no NDR e o desempenho dos animais nos testes de memória espacial e extinção. Além disso, foi usada análise de variância 2 X 2 para verificar os efeitos do consumo crônico de etanol e da restrição alimentar sobre parâmetros bioquímicos e sobre o desempenho dos animais idosos nos testes comportamentais. Nenhum dos dois tratamentos teve efeito significativo sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos estudados, com exceção do índice de extinção, o qual foi significativamente afetado pelo consumo crônico de etanol. Observamos que, o consumo crônico de etanol reverteu o prejuízo causado pelo envelhecimento na flexibilidade comportamental dos indivíduos idosos. Os dados dessa primeira etapa foram publicados na revista *Behavioural Brain Research*, em 2007. Na segunda etapa desse trabalho, utilizando cultura primária de neurônios corticais, investigamos o envolvimento de componentes moleculares do citoesqueleto, proteína *tau*, e de sistemas de tradução de sinais, MAPKs e GSK3, no mecanismo de ação de dois fatores neurotóxicos: i) alta concentração de glutamato e, ii) estresse oxidativo, provocado pelo

peróxido de hidrogênio. As fosfoproteínas foram separadas por eletroforese e identificadas com anticorpos, por imunofluorescência, através da técnica de *Western blot*. As análises quantitativas foram realizadas por densitometria. Como primeiro passo, confirmamos dados da literatura os quais mostram que, tanto uma alta concentração de glutamato quanto o peróxido de hidrogênio causam perda significativa de neurônios corticais. Além disto, acrescentamos uma informação, mostrando que esses efeitos são dependentes do tempo de incubação. O próximo passo foi verificar se uma alta concentração de glutamato ou peróxido de hidrogênio tinham efeitos sobre o nível de fosforilação e/ou concentração total das seguintes classes de fosfoproteínas: fosfoproteínas tirosinas, isoformas da fosfoproteína *tau*, e fosfoproteínas cinases. Tanto o peróxido de hidrogênio quanto o glutamato provocaram um aumento da forma defosforilada da proteína *tau*. No entanto, os efeitos do glutamato e do peróxido de hidrogênio diferem quanto aos alvos afetados, isoformas da *tau* alteradas e, além disto, se considerarmos a curva de tempo dos efeitos causados pelos dois tratamentos (glutamato e peróxido de hidrogênio), verificamos que o glutamato induz um aumento da forma defosforilada de maneira temporalmente diferente do peróxido de hidrogênio. Ambos os estímulos provocam alterações específicas, sendo esses efeitos dependentes do tempo em sub-classes de MAPKs. Alguns desses efeitos se referem a disfunções em componentes do sistema de fosforilação relacionados apenas com mudanças conformacionais, ou seja, da forma ativa para a inativa ou vice-versa e, outros, resultam em alterações na expressão de fosfoproteínas importantes do sistema de sinalização celular, possivelmente, relacionadas com a morte neuronal.

Abstract

The two phenomena, biological and behavioural, approached in the present work are brain aging and spatial memory. Several studies, comparative and experimental, have shown that aged subjects present significantly impaired performances in different types of cognitive tasks. It is also known that contradictions in literature exist in relation to consequences of the interaction between the effects of aging with the effects of chronic ethanol consumption and food restriction, in relation to the biological as well as the behavioural effects. Despite the advances and several studies carried out in an attempt to understand the neurobiological mechanisms responsible for these dysfunctions, little is known about the biological basis correlated with specific aspects of cognitive dysfunction in the aged. Within the different neurochemical systems, one relatively less studied, with relation to the deficits in learning and spatial memory in the aged, is the serotonergic central system. Another relevant question in this biological approach is related to the mechanisms responsible for neurodegeneration that possibly results in dysfunctions neurochemical circuit activity. In this case, early identification of molecular alterations, associated to this process, has been even more important for the understanding of biological basis related to behavioral deficits normally associated to aging and/or to several neuropathologies. A common mechanism that neuronal cells suffer due to acute injuries is unchained by the excitotoxicity, a phenomenon that becomes unchained when there is an excess of activity of glutamate receptors, which induce a series of intracellular processes possibly associated with neurodegeneration. There is also evidence that reactive species of oxygen (ex. hydrogen peroxide) as much in aging as in chronic alcoholism and in various neurodegenerative cerebral diseases (ex. Parkinson's and Alzheimer's disease, etc) seem to be involved with cell death. On the other hand, some works indicate that food restriction (FD), that consist in reduction of the habitual caloric quantity, has

beneficial effects on the organism, probably through a mechanism that results in decrease of the reactive species of oxygen. It has already been reported that it acts by increasing the time of life of the animals and retards the development of degenerative diseases. Protective effects of FD over central nervous system were shown as a prevention in/or the reduction of oxidative stress, excitotoxic or metabolic insults, sensorial and motor deficits and cognitive damage. Among the intracellular systems involved with the mechanisms of cell death, induced by high concentrations of glutamate and/or reactive species of oxygen, the process of protein phosphorylation stands out. The reactions of phosphorylation and subsequently dephosphorylation are catalyzed by kinase proteins and fosfatases, respectively. They have an important role in the translation of signs, responsible for a series of cellular events, such as proliferation and death cell. Alterations in the kinase proteins and fosfatases are intimately related to various cellular dysfunctions. The kinase proteins not only phosphorylate their proteic substrates, but they are also phosphorylated and dephosphorylated being, however, regulated by phosphorylation, too. The present work is divided into two parts, which correspond to two different levels of studies. **(i) The first stage**, the independent variables are age, chronic consumption of ethanol and caloric food restriction. In this stage, adult rats (5 months) and aged rats (16 months) were used as **experimental animal models**, as well as methods of experimental psychological and biochemistry, to assess aspects of learning and spatial memory and to determine functional parameters of the central serotonergic central system, respectively. In addition, the correlation between behavioral and biological data was assessed. **(ii) In the second stage**, the independent variables are different conditions of neurodegenerative stimuli. **Cell culture of neurons** and biochemical methods were used for the study of the components involved in the mechanisms of cell death. In the first stage, using wistar rats we observed changes related to age in the aspects of learning, memory and behavioral extinction in the Morris water maze. Using the chromatographic method (HPLC= High

Performance Liquid Chromatography), we verified also the significant effect of age in the endogenous levels of serotonin (5-HT) and of 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in the neocortex, hippocampus, thalamus and dorsal raphe nucleus (DRN). The middle-aged subjects succeeded in learning the behavioural task, albeit with significantly worse performance when compared to adult animals. Aging also had significant main effects on memory and extinction. An age-dependent decrease in 5-HIAA levels was observed in both hippocampus and dorsal raphe nucleus (DRN). The decrease in DRN 5-HIAA was paralleled by a decrease in 5-HIAA/5-HT ratio in this brain area, which was significantly correlated to the animals' spatial memory performance and behavioural extinction. In addition, using middle-aged rats, a 2×2 factorial study was carried out to examine the effects of food restriction and chronic ethanol consumption on rat's performance in a spatial behavioural task and on central serotonergic parameters. None of these two treatments had a significant effect on the behavioural and biochemical parameters assessed, with the exception of extinction index, which was significantly affected by ethanol consumption. Long-term ethanol ameliorated the impairment in behavioural flexibility caused by aging. The data of the first stage were published in the journal "Behavioral Brain Research" in 2007. In the second stage of the study, using primary culture of cortical neurons, we investigated the involvement of molecular components of cytoskeletal elements, tau protein, and the system of translation of signs, MAPKs and GSK3, mechanism of two neurotoxic factors: i) high concentration of glutamate and, ii) oxidative stress, provoked by hydrogen peroxide. The phosphoproteins were separated by gel electrophoresis and identified with antibodies, by immunofluorescence, through the Western blot technique. The quantitative analyses were done by densitometer. As first step, we confirmed data of literature which showed that a high concentration of glutamate as well as hydrogen peroxide caused significantly loss of cortical neurons. In addition, we added information, showing that these effects are dependent on incubation time. The next step was to verify if the high

concentration of glutamate or hydrogen peroxide had effects on the level of phosphorylation and/or total concentration of the following classes of phosphoproteins: tyrosine phosphoproteins, isoforms of phosphoproteins tau, and kinase phosphoproteins. Hydrogen peroxide as well as glutamate provoked an increase in the dephosphorelated form of tau protein. However, the effects of glutamate and of hydrogen peroxide differed and the affected aims, tau isoforms changed and besides that, if we consider the curve of time of the effects caused by the two treatments (glutamate and hydrogen prpxide), we verified that the glutamate induces an increase of the dephosphorolated form in a temporarily different way from hydrogen peroxide. Both stimuli provoke specification alterations, these being dependent effects of time in sub classes of MAPKs. Some of these effects are dysfunctions in components of the phosphorylation systems relation only with conformation changes, in other words, the active for inactive form or vice verse and, others; result in alterations in the expression of important phosphoproteins of the cellular signal systems, possibly, relate with cell death.

A primeira etapa do presente estudo foi realizada no Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC-UFMG). Com o apoio do CNPq, através de uma "bolsa de doutorado sanduíche", a segunda etapa foi realizada no Laboratório de Neurociências do Instituto de Psiquiatria da Universidade de Londres, através de projeto em colaboração com o prof. B.Anderton e a Dra. D.Hanger.

Dados parciais obtidos no presente trabalho foram apresentados em reuniões científicas e publicados em revistas científicas indexadas, conforme especificado abaixo:

1. Coelho, V.A. A.; Pinto, L.S.N.M.; Gualberto, F.A.S.; Souza, V.F.; Silva, I.F.O.; Faleiro, R.M.R.; Perreira, S.R.C.; Franco, G.C.; Ribeiro, A.M.; Cruz, J.S. Avaliação da interação entre tratamento de longa duração com restrição alimentar e consumo crônico de etanol sobre parâmetros comportamentais e colinérgicos de ratos Wistar. *Anais da XIII Semana de Iniciação Científica da UFMG*. Outubro de 2004. Belo Horizonte - MG.

2. Gualberto, F.A.S.; Pinto, L.S.N.M.; Andrade, V.C.; Souza, V.F.; Silva, I.F.O.; Perreira, S.R.C.; Faleiro, R.M.R.; Franco, G.C.; Ribeiro, A.M. A restrição alimentar interfere nos efeitos do envelhecimento, consumo crônico de etanol, memória e parâmetros neuroquímicos? *Anais da XIII Semana de Iniciação Científica da UFMG*. Outubro de 2004. Belo Horizonte - MG.

3. Ieda F. Oliveira-Silva, Lucas Pinto, Silvia R.C.Pereira, Vany P. Ferraz, Alfredo J.A.Barbosa, Vivian A.A. Coelho, Felipe F.A.S. Gualberto, Valeria F. Souza, Rosiane R.M. Faleiro, Glaura C. Franco e Angela M. Ribeiro. Age-related deficit in behavioral extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: correlation between 5-HIAA/5-HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. 2nd Neuroscience Symposium,

February 23-25, 2007, International Institute for Neuroscience of Natal, Natal – RN, resumo nº 218, página 45.

4. Ieda F. Oliveira-Silva, Lucas Pinto, Sílvia R.C.Pereira, Vany P. Ferraz, Alfredo J.A. Barbosa, Vivian A.A. Coelho, Felipe F.A.S. Gualberto, Valeria F. Souza, Rosiane R.M. Faleiro, Angela M. Ribeiro. Age-related alterations in 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus is correlated to extinction of a behavior acquired in Morris water maze (*Behavioural Brain Research*, Available online 16 March 2007).

Outros trabalhos em colaboração, executados e publicados, durante o período do meu doutorado.

1. Rita G. W. Pires, Sílvia R. C. Pereira, Ieda F. Oliveira-Silva, Glaura C. Franco, Angela M. Ribeiro. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*, 162, 11-21, 2005.

2. Carvalho, Fabiana M., Pereira, Sílvia R.C., Pires, Rita G. W., Ferraz, Vany P., Romano-Silva, Marco Aurélio; Oliveira-Silva, Ieda F. and Ribeiro, Angela M. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83, 481-489, 2006.

3. Rita G W Pires, PhD; Sílvia R C Pereira, MS; Fabiana M, Carvalho, MS; Ieda F Oliveira-Silva, MS; Vany P Ferraz, PhD; Angela Maria Ribeiro, PhD. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86 kD protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*, Available online 21 February 2007.

INTRODUÇÃO GERAL

ENVELHECIMENTO CEREBRAL

O processo de envelhecimento é extremamente complexo e multifatorial e, pela sua natureza multidisciplinar, o estudo das bases moleculares desse fenômeno tem gerado um grande número de teorias e uma vasta literatura (por ex., Iampolskii e Galimov, 2005; Krause, 2007; Ishii e cols. 2007; Harman, 1955; Verzár, 1957; Szilard, 1959; Orgell, 1963; Sheineider, 1987; Beckman e Ames, 1998; Peinado e cols. 2000; Kowald, 2001). Nesse campo se destacam as teorias estocásticas, baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais ou funcionais, e as teorias não-estocásticas relacionadas com mecanismos programados no genoma de cada organismo (Lukiw, 2007; Lee e cols. 2006). Dentre as teorias estocásticas incluem-se as seguintes: radicais livres, lesão mitocondrial, alteração do colágeno, lesão de membrana, mutação genética e "erro catastrófico" na síntese de proteínas, e as teorias neuroendócrina e imunológica (Letiembre e cols. 2007). Com relação às não-estocásticas podemos mencionar a teoria da senescência programada, proposta por Hayflic (1968), que se baseia na deterioração do programa genético que regula o desenvolvimento celular.

Durante o processo de envelhecimento ocorrem diversas alterações macro e microscópicas no encéfalo que incluem o peso e o volume do órgão, o aspecto dos giros e sulcos, o volume dos ventrículos, o tamanho e o número dos neurônios. A extensão da ramificação dendrítica, o número de espinhos e de sinapses, o acúmulo de pigmento de lipofuscina nos neurônios e células gliais, e o aparecimento de modificações microscópicas características, quais sejam, as placas senis, os enovelamentos ou emaranhados neurofibrilares, a degeneração grânulo-vacuolar, os corpos de Hirano e a angiopatia amilóide cerebral (Martin, 2006; Mattson, 2007; Scahill e cols. 2003).

Existe uma proposição de que os diversos fatores que produzem neurodegeneração o fazem através de processos diferentes, que culminam em uma via comum de cascata de sinalização que resulta na morte celular. Essas perdas celulares no sistema nervoso central (SNC) podem se manifestar como disfunções comportamentais, como por exemplo, déficits cognitivos. Portanto, o estudo dos mecanismos responsáveis pela neurodegeneração e a identificação precoce de alterações moleculares, tem sido cada vez mais importante para a compreensão das bases biológicas relacionadas com as alterações comportamentais normalmente associadas com o envelhecimento e/ou com as diversas neuropatologias. Alterações celulares e fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento parecem ter efeitos pronunciados sobre doenças neurodegenerativas. Existe uma proposta de que alterações celulares, provocadas por fatores ambientais e ou genéticos, as quais acontecem ao longo do envelhecimento, aceleram a progressão de processos neurodegenerativos com disfunções cognitivas, associadas ou não com sintomas de demência (Troulinaki e Tavernarakis, 2005).

Vários fatores externos, como o consumo crônico de etanol, podem ser responsáveis por danos celulares relacionados com o envelhecimento (Pfefferbaum e cols. 2006). Tem sido reconhecido que algumas alterações neuropatológicas observadas devido ao consumo crônico de etanol são comuns àquelas encontradas no processo de envelhecimento (Borges e cols. 1986). Por outro lado, Krazem e cols. (2003), mostraram que, animais idosos, consumindo etanol cronicamente tiveram melhoras em déficits cognitivos normalmente associados com o envelhecimento, enquanto que, os efeitos crônicos do etanol foram prejudiciais para animais adultos avaliados em tarefas de aprendizado e memória.

Existem também evidências de que o consumo crônico de etanol induz a produção de radicais livres, causando danos celulares oxidativos (Vallett e cols. 1997). Alguns estudos têm mostrado que os radicais livres

contribuem para a ação do etanol no SNC, principalmente em indivíduos idosos (Calapai e cols. 1996). O papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade induzida pelo etanol também é reforçado por resultados que mostram um efeito benéfico de terapias anti-oxidantes durante a exposição ao álcool (Baydas e Tuzcu, 2005).

Por outro lado, a restrição alimentar parece proteger o SNC dos efeitos relacionados com o envelhecimento (por ex., Eckles-Smith e cols. 2000; Mattson e cols. 2003; Prolla e Mattson, 2001). Apesar das controvérsias, alguns estudos sugerem que uma diminuição da taxa de produção de espécies reativas de oxigênio é um dos efeitos responsáveis pelo papel protetor da restrição alimentar. A restrição alimentar parece diminuir o estado oxidativo e danos em lipídios, proteínas e especialmente no DNA mitocondrial, podendo também diminuir mutações no DNA e, portanto, apresentar um efeito benéfico durante o envelhecimento (Barja, 2004a; Barja, 2004b; Gredilla e Barja, 2005).

Existem evidências de que os sistemas de regulação celular do íon Ca^{+2} estão comprometidos nos indivíduos idosos sendo responsáveis por disfunções sinápticas, prejuízos na plasticidade celular e degeneração neuronal (por ex., Raza e cols. 2007). Os efeitos adversos da idade na regulação neuronal de Ca^{+2} estão sujeitos a modificações genéticas (p.ex. mutações em presenilinas, alfa sinucleinas, huntingtina, Cu/Zn superóxido dismutase e isoformas da apolipoproteína E) e também a fatores ambientais (dieta alimentar, exercícios, exposição a toxinas, drogas, etc.) os quais podem causar ou afetar o risco de doenças neurodegenerativas (Mattson, 2007).

Dados obtidos por vários autores apontam para diferentes tipos de disfunções sinápticas causadas pelo envelhecimento, entre essas disfunções destacam-se as alterações na neurotransmissão e em componentes de sistemas de tradução de sinais, como por exemplo, proteínas cinases (por ex., Smith e cols. 2007; Williams e cols. 2007; Lee e cols. 2006). Vários sistemas neurotransmissores são afetados

pelo envelhecimento, como por exemplo, serotoninérgico, glutamatérgico, aminérgico e colinérgico (Ossowska, 1993; Stong, 1998; Barili e cols. 1998; Francis e cols. 1999; Stemmelin e cols. 2000). Sabe-se que, existe uma interação entre o sistema colinérgico e serotoninérgico, indicando uma modulação conjunta em processos de aprendizado e memória (Richter-Levin e Segal, 1993; Little e cols. 1995; Steckler e Sahgal, 1995). Alguns autores observaram que o nível de serotonina cerebral está alterado no envelhecimento, tanto em seres humanos como em animais de laboratório (Luine e Hearn, 1990; Steinbusch e cols. 1990; Meltzer e cols. 1998).

Estudos com animais têm demonstrado um envolvimento do sistema serotoninérgico nas disfunções cognitivas relacionadas com o envelhecimento (Luine e Hearn, 1990; Normile e Altman, 1992; Gottfries, 1993; Flood e cols. 1993; Fontana e cols. 1995; Levkovitz e cols. 1994; Little e cols. 1995) e com o consumo crônico de etanol (Martin e cols. 1995).

I-PARTE I: EXPERIMENTOS COM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

Envelhecimento, consumo crônico de etanol e restrição calórica: efeitos sobre o aprendizado e memória espacial e parâmetros serotoninérgicos centrais em ratos Wistar.

I.1 INTRODUÇÃO:

APRENDIZAGEM, MEMÓRIA E EXTINÇÃO

Kandel e cols. (1997), (Kandel e Schwartz, 1987), descrevem que a aquisição, o armazenamento e a evocação de informação são os aspectos centrais nos processos de aprendizagem e memória. Em conjunto, estes três fatores se constituem em processos adaptativos ao

meio ambiente com claro significado biológico. É extremamente difícil definir aprendizagem e memória e, em geral, estes processos são inferidos a partir de alterações do comportamento e não são medidos diretamente. Conforme esses autores, uma das definições correntes indica que o aprendizado é uma modificação do comportamento, como resultado de uma experiência ou a aquisição de um novo conhecimento acerca do meio. A memória é a retenção deste conhecimento por um determinado tempo. De maneira geral, os mecanismos cerebrais de memória e aprendizagem estão ligados a processos neurais responsáveis pela atenção, motivação e outros processos neuropsicológicos de forma que perturbações nos mesmos afetam de alguma forma o aprendizado e a memória.

Em estudos sobre aprendizagem e memória, o intervalo de tempo sob o qual determinada informação pode e deve ser arquivada pelo sistema de memória, caracteriza-se como um fator de controvérsias na literatura. Durante algum tempo considerava-se a existência de dois sistemas de memória: o sistema de curta duração, responsável pelo arquivamento temporário de informações e o sistema de longa duração, responsável pelo arquivamento de informações por períodos mais longos (Santos, 1996). Segundo outros autores (Olton, 1979; Olton e Papas, 1979), o tempo cronológico não seria o fator determinante sobre a manutenção ou não de uma informação, mas sim o processamento inicial que a originou. Informações apresentadas em contextos temporais específicos seriam manipuladas por um sistema de memória denominado operacional (ou memória de trabalho), sendo as informações mantidas por períodos de tempo durante os quais fossem relevantes, devendo ser posteriormente apagadas para evitar a sobrecarga do sistema. Informações que são utilizadas em diferentes situações e que, portanto, independem do contexto específico sob o qual foram adquiridas, seriam arquivadas sob a forma de memória de referência, e poderiam ser arquivadas por diferentes intervalos de tempo, ou até mesmo por toda a vida do indivíduo (Walker e Olton, 1984). Outras correntes, baseadas

em experimentos realizados principalmente com primatas, humanos e não-humanos, descrevem ainda outros tipos de memória a declarativa, p.ex. a episódica de fatos, e a não declarativa, p.ex. a procedural (Squire, 1982; Squire, 1987; Squire e Zola-Morgan, 1991; Squire e Knowlton, 1995).

Estudos de memória em modelo experimental freqüentemente utilizam a idéia de uma memória de trabalho (curto prazo) e uma memória de referência (longo prazo). Nesses estudos, a memória de trabalho é definida como a recuperação de informações adquiridas para a utilização em uma única tentativa em um experimento, mas não para tentativas subseqüentes. Por outro lado, a memória de referência é definida como a recuperação de informações que são úteis por várias tentativas em sessões (ou dias) sucessivas, normalmente, por todo o experimento (Honig, 1978).

Durante a "extinção" de um comportamento previamente adquirido a freqüência de resposta anteriormente estabelecida diminui resultando em mudanças comportamentais de longa duração (Lattal e Abel, 2001). A extinção de um comportamento tem sido considerada um novo aprendizado que se sobrepõe a um antigo e está relacionada à flexibilidade comportamental do indivíduo (Bouton, 2002). Pouco se sabe sobre o mecanismo molecular responsável pela extinção de um comportamento.

Guan e cols (Guan e cols. 2002), mostraram evidências indicando que a memória de curto prazo envolve a modulação de canais iônicos e outros substratos protéicos pela ação de segundo mensageiros citoplasmáticos. A modulação desses canais envolve alteração da excitabilidade de neurônios específicos e liberação de neurotransmissores de seus terminais. Enquanto que a memória de curta duração resulta de modificações covalentes em proteínas preexistentes, a memória de longa duração requer um processamento de síntese protéica. Admite-se

também, que a ponte entre os processos de curta e longa duração seja feita pelos sistemas de segundo mensageiro, como adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que também são potentes ativadores da síntese protéica. Parece que o aprendizado está associado a mecanismos que aumentam a eficiência sináptica e que o processo de fortalecimento de conexões sinápticas pode implicar na ativação de sinapses previamente latentes (Kandel e cols. (1997).

PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÕES COGNITIVAS

Alterações celulares e fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento “normal” parecem ter efeitos pronunciados sobre processos neurodegenerativos. Apesar dos grandes avanços científicos nessa área, os mecanismos moleculares que representam uma interface entre envelhecimento e patologias neurodegenerativas continuam obscuros. Existe na literatura uma proposta de que alterações celulares, provocadas por fatores ambientais e ou genéticos, os quais acontecem ao longo do envelhecimento aceleram a progressão de processos neurodegenerativos com disfunções cognitivas (Troulinaki e Tavernarakis, 2005).

Muitas das características histológicas da Doença de Alzheimer (DA) e da Doença de Parkinson são também encontradas, em menor proporção, no envelhecimento “normal” e o perfil das alterações de sistemas neurotransmissores nestas doenças parece representar uma exacerbação daquele encontrado no envelhecimento (Troulinaki e Tavernarakis, 2005). Existem evidências de que alterações em componentes moleculares de processos bioquímicos podem estar relacionadas com o desenvolvimento de alterações neurodegenerativas associadas ou não com sintomas de déficits cognitivos (de Magalhaes e Sandberg, 2005). Apesar dos vários estudos para o entendimento das

bases biológicas relacionadas com as disfunções cognitivas no envelhecimento, vários pontos ainda continuam sem explicação.

A partir de certa idade, indivíduos idosos relatam pequenos esquecimentos relacionados à sua vida diária, como dificuldades de lembrar nomes ou palavras, perda de objetos, ou erros ao cumprir uma rotina familiar de comportamentos. Estudos têm mostrado que pessoas idosas apresentam desempenho significativamente prejudicado em tarefas de memória episódica de curto prazo (Verhaeghen e Marcoen, 1993) e dificuldade em identificar a fonte de uma dada informação lembrada. Já foi sugerido que os problemas mnemônicos dos idosos se devem à diminuição da velocidade de processamento mental, o que prejudicaria o desempenho em tarefas de memória de trabalho (Caggiano e cols. 2006; Salthouse, 1994). Por outro lado, os idosos apresentam resultados comparáveis aos adultos em testes de reconhecimento (em oposição a testes de evocação), e em outras tarefas, como por exemplo, memória implícita e memória semântica. Isto levou a uma sugestão de que os problemas de memória ligados a senescência aparecem quando a tarefa exige um processamento mental auto-iniciado (Mutter e cols. 2006; Craik e cols. 1994). Em outras palavras, os idosos encontram dificuldades em situações que a evocação não é provocada por estímulos presentes no ambiente.

Em modelo experimental, Rodefer e cols (2006), mostraram diferenças no desempenho de animais idosos em testes de discriminação. Outros autores observaram que em testes menos complexos, como a localização de um novo objeto, a habilidade cognitiva em animais idosos não é influenciada nem pela mudança do tipo de objeto nem pela combinação de objetos. No entanto, a memória espacial destes animais, na identificação de dicas distais, se encontrava prejudicada (Murai e cols. 2007).

O estudo de diferenças individuais em habilidades de aprendizado tem sido objetivo de pesquisas em roedores e humanos, uma vez que existe uma grande variabilidade entre os indivíduos. Essa variabilidade no desempenho em tarefas cognitivas parece ainda maior na população idosa (Rapp e Amaral, 1992). Topic e cols. (Topic e cols. 2005) verificaram que o sub-grupo de animais idosos que apresentaram pior desempenho na aquisição de uma tarefa espacial também mostrou diferença significativa no comportamento de extinção. Shulz e cols. (Schulz e cols. 2004) observaram que o comportamento de extinção, medido em tarefas de nado forçado, é diferente quando comparado aos animais adultos.

SISTEMAS NEUROTRANSMISSORES COM ENFOQUE NO SISTEMA SEROTONÉRGICO E DISFUNÇÃO COGNITIVA E ENVELHECIMENTO

Trabalhos apontam para diferentes tipos de alterações em sistemas neurotransmissores durante o processo de envelhecimento, como alterações em parâmetros serotoninérgico, glutamatérgico, aminérgico e colinérgico (Ossowska, 1993; Strong, 1998; Barili e cols. 1998; Francis e cols. 1999; Stemmelin e cols. 2000). Um dos sistemas mais bem estudados com relação ao processo de envelhecimento é o colinérgico (Decker, 1987; Muller e cols. 1991). Embora exista controvérsia sobre quais neurotransmissores desempenham papel importante nas funções cognitivas (Mason e Fibiger, 1979; Arendt e cols. 1983), alguns pesquisadores consideram o sistema colinérgico, pois, uma hipofunção desse sistema é comumente encontrada no idoso com alterações cognitivas (Hodges e cols. 1995). Sabe-se também que existe interação entre o sistema colinérgico e serotoninérgico, indicando uma possível modulação conjunta em processos de aprendizado e memória (Richter-Levin e Segal, 1993; Little e cols. 1995). Utilizando métodos de lesões específicas do sistema serotoninérgico, Barnes e Sharp (Barnes e Sharp, 1999), mostraram que esse sistema parece estar envolvido com

processos de aprendizado e memória. Existem também evidências de que alterações na liberação de serotonina (5-HT) resultam em disfunções cognitivas em ratos (Santucci e cols. 1996). No entanto, comparado ao sistema colinérgico, relativamente poucos estudos têm focado o sistema serotoninérgico e sua possível relação com aspectos de disfunções cognitivas normalmente encontradas no idoso.

O SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina (5-HT) tem implicações na regulação de numerosos comportamentos, incluindo sono-vigília, ritmo circadiano, alimentação, memória, humor e cognição e resposta ao abuso de drogas, processamento emocional (Buhot e cols. 2000; Jacobs e Fornal, 1999; Leonard, 1996; Morin, 1999; Thase, 2000; Buhot, 1997; Ericsson e cols. 1996; Julius, 1998; Jacobs e Azmitia, 1992).

Este neurotransmissor é uma amina biogênica (5-hidroxitriptamina), tendo um papel proeminente na evolução da fisiologia de vertebrados e invertebrados (Turlejski, 1996). A **figura 01**, apresentada abaixo, representa um esquema de um terminal serotoninérgico. Na via de síntese da 5-HT, o triptofano sofre uma hidroxilação, através da triptofano hidroxilase, sendo transformado em 5-hidroxitriptofano, o qual é então descarboxilado por uma descarboxilase produzindo 5-HT. A 5-HT pode atuar em receptores presentes nas células pré e pós sinápticas. O neurotransmissor é degradado pela monoamina oxidase (MAO) no seu principal metabólito que é o ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA) ou é recaptado para dentro do terminal pré-sináptico, por ação de proteínas transportadoras (Cooper e cols. 1996; Van Haard e Pavel, 1988). O sistema serotoninérgico está amplamente distribuído por todo cérebro e medula espinhal, particularmente em áreas que recebem estímulos sensoriais (Jacobs e Azmitia, 1992).

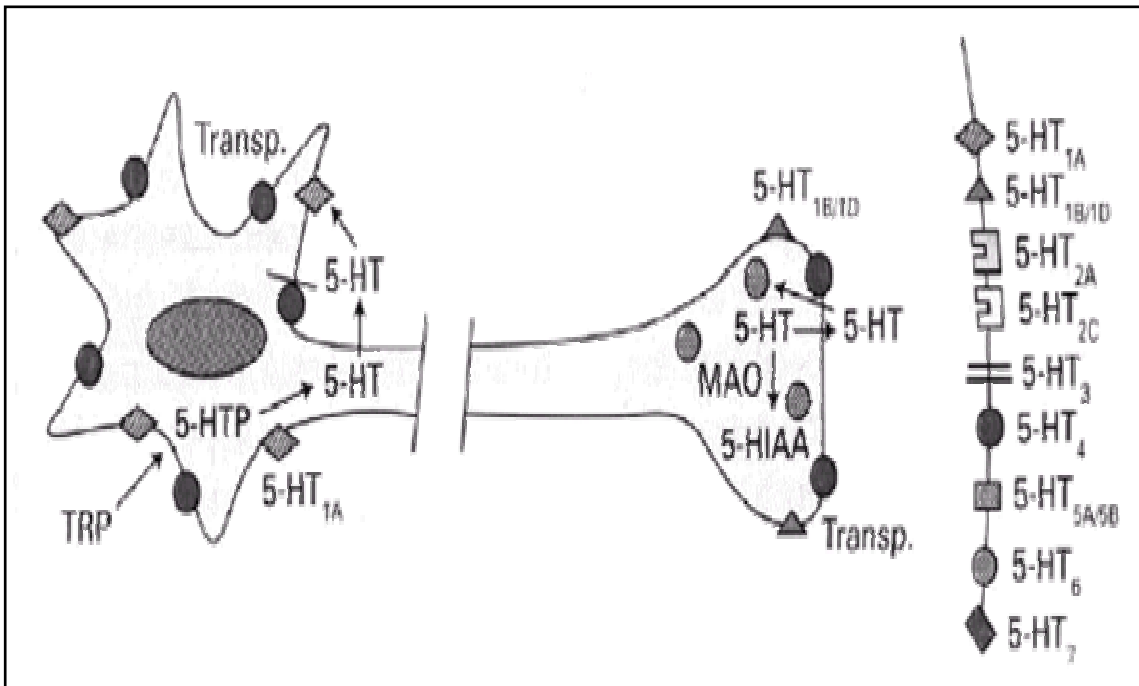


FIGURA 01:

Esquema de um neurônio serotoninérgico mostrando os processos de síntese e degradação do neurotransmissor (5-HT), assim como, a sua re-captção (transporte) pelo terminal pré-sináptico e sua ação sobre receptores pré e pós-sinápticos. 5-HT= serotonina; 5-HIAA= ácido 5-Hidroxi-indolacético; TRP= Triptofano; 5HTP= Triptamina (M. Victoria Puig Velasco, 2004).

O tronco encefálico é formado pelo bulbo, ponte e mesencéfalo, e situa-se entre a medula e o diencéfalo. O tronco possui núcleos bem definidos (os núcleos sensitivos e motores dos nervos cranianos), feixes de fibras nervosas descendentes e ascendentes (tratos, fascículos e lemniscos) e uma formação especial que preenche o resto do tronco denominado de formação reticular. Os principais núcleos presentes na formação reticular são: núcleos da rafe: neurônios ricos em serotonina; lócus cerúleo: neurônios ricos em noradrenalina; substância cinzenta periaquedutal: neurônios ricos em gama-aminobutírico (GABA); área tegmental ventral: neurônios ricos em dopamina (Halliday e cols. 1995; Behbehani e cols. 1990).

Os núcleos da rafe são divididos em dois grupos: superior e inferior. A parte superior divide-se em núcleo dorsal da rafe (NDR) e núcleo medial da rafe (NMR) os quais estão localizados no mesencéfalo e ponte superior. Sendo estes dois núcleos, NDR, e NMR, considerados núcleos da rafe mesencefálicos. Estes dois núcleos fazem projeções para o próprio tronco cerebral, diencéfalo e telencéfalo (Halberstadt e Balaban, 2003; Abrams e cols. 2004). A divisão da parte inferior inclui os núcleos da rafe obscuros (ROb), rafe palidos (RPa) e rafe magno (RMg) localizados no bulbo e na parte caudal (inferior) da ponte (Jacobs e Azmitia, 1992). Os núcleos inferiores enviam projeções descendentes para o próprio tronco cerebral e medula espinhal.

Projeções ascendentes dos núcleos da rafe inicialmente se reúnem em feixes de fibras serotoninérgicas no mesencéfalo anterior divergindo dentro de diferentes redes para então inervar suas estruturas alvos. As principais estruturas alvos dessas fibras são o bulbo olfatório, hipotálamo, tálamo, área septal, estriato, hipocampo e córtex cerebral (Vertes, 1991; Araneda e cols. 1989). A grande maioria dos neurônios contendo 5-HT no SNC está agrupada ao longo da linha média do tronco cerebral na parte rostral (superior) e caudal (inferior) dos núcleos da rafe (Halberstadt e Balaban, 2003).

As ações intracelulares da 5-HT são mediadas através de diversas famílias de receptores ligados à membrana. Existem pelo menos sete subfamílias distintas de receptores (5-HT₁-5-HT₇), contendo pelo menos 14 subtipos de receptores (Barnes e cols, 1999). Com exceção do subtipo do receptor 5-HT₃, (R 5-HT₃), os outros receptores são acoplados à proteína-G influenciando uma grande variedade de sistemas efetores intracelulares. O receptor 5-HT₃ é o único entre os receptores monoamínicos que funciona como canal iônico acionado por ligantes.

SISTEMA SEROTONÉRGICO, MEMÓRIA E ENVELHECIMENTO

Existem evidências de que o sistema serotoninérgico está envolvido em processos mnemônicos (Nabeshima e cols. 1992; Quartermain e cols. 1993; Staubli e Xu, 1995), embora deva ser considerado que alguns autores não observaram nenhum papel do sistema serotoninérgico na memória de trabalho espacial (Jäkälä e cols. 1993) e que danos seletivos no sistema serotoninérgico parecem não ser suficientes para prejudicar o desempenho em tarefas que envolvem memória recente (Ricaurte e cols. 1993). Por outro lado, outros autores mostraram evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico tanto na memória de longo como de curso prazo (Meneses, 2007). A formação hipocampal é uma estrutura crucial para o aprendizado e memória espacial (Van der Zee e cols. 1995), e a 5-HT juntamente com outros neurotransmissores parece ter um importante papel nestes processos (Van der Zee e cols. 1995; Luine e Hearn, 1990).

O hipocampo e o córtex possuem um importante papel em funções cognitivas. O mecanismo biológico através dos quais essas duas estruturas interage para processar uma informação e formar uma memória continua obscuro. O que se sabe é que existe forte interconecções entre o hipocampo e o córtex e essa integração, em parte, é mediada através de núcleos do tálamo (Bokor e cols. 2002; Vertes, 2002; Wouterlood, 1991). Essas tres regiões, córtex, hipocampo e tálamo possuem terminais serotoninérgicos (Bennett-Clarke e cols. 1996; Morgane e cols. 2005).

Alterações no sistema serotoninérgico estão bem documentadas no envelhecimento e na doença de Alzheimer (Steinbusch e cols. 1990; Davidoff e Lolova, 1991; Van Luijtelar e cols. 1992; Grad e Rozencwaig, 1993; Richter-Levin e Segal, 1993; Venero e cols. 1993). Alguns autores observaram que o nível de serotonina está alterado no envelhecimento, tanto em seres humanos como em animais de

laboratório (Luine e Hearn, 1990; Steinbusch e cols. 1990; Meltzer e cols. 1998).

Muitos dos comportamentos mencionados acima mudam com a idade, e essas mudanças podem estar relacionadas com alterações no sistema serotoninérgico (Bliwise, 2000; Meltzer e cols. 1998; Reynolds, III e Kupfer, 1999). Estudos utilizando modelo experimental têm demonstrado uma vulnerabilidade do sistema serotoninérgico com a idade. Fibras serotoninérgicas com anormalidades morfológicas têm sido relatadas no córtex prefrontal e frontoparietal, estriato, tálamo, hipotálamo, hipocampo, mesencéfalo e medula espinhal de ratos idosos (Behan e Brownfield, 1999; Crow e cols. 1984; Meltzer e cols. 1998; Rosier e cols. 1996).

Vários autores, usando animais, mostraram um envolvimento do sistema serotoninérgico nas disfunções cognitivas relacionadas com o envelhecimento (Luine e Hearn, 1990; Normile e Altman, 1992; Gottfries, 1993; Flood e cols. 1993; Fontana e cols. 1995; Levkovitz e cols. 1994; Little e cols. 1995) e com o alcoolismo (Martin e cols. 1995). Por exemplo, Meneses e cols. (2004), sugeriram que a expressão de receptores serotoninérgicos é alterada durante o envelhecimento.

Embora o efeito da idade relacionado com vários neurotransmissores tem sido investigado, ainda não está totalmente claro se o sistema serotoninérgico se altera no hipocampo durante o envelhecimento. Estudos em ratos têm mostrado alterações morfológicas no giro denteado relacionadas com a idade, envolvendo perdas de fibras serotoninérgicas no hipocampo. Esses estudos utilizando técnica imunocitoquímica com anticorpo contra 5-HT para avaliar a densidade de fibras serotoninérgicas em sub-regiões do hipocampo de animais adultos e idosos, mostraram redução da densidade de fibras serotoninérgicas nas regiões CA1 e CA3 de animais idosos (por ex., Keuker e cols. 2005).

RADICAIS LIVRES, RESTRIÇÃO ALIMENTAR E ENVELHECIMENTO

Dentre as teorias sobre o envelhecimento, a teoria dos radicais livres, é uma das mais conhecidas e é considerada por muitos pesquisadores a explicação mais convincente para várias das alterações degenerativas associadas com o envelhecimento (Nohl, 1993; Fukagawa, 1999); Krause, 2007). Além disso, há evidências sugerindo ligações entre a teoria dos radicais livres e outras teorias do envelhecimento (como por exemplo, lesão mitocondrial, alteração do colágeno, lesão de membrana e mutação gênica). Entretanto, apesar do grande número de dados que sugerem uma associação entre lesão oxidativa e envelhecimento, não existe ainda evidências diretas e definitivas que comprovem a associação entre marcadores de lesões oxidativas cerebrais e o processo de envelhecimento (Nohl, 1993; Fukagawa, 1999).

Evidências experimentais indicam que os metabólitos reativos do oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS= *reactive oxygen specie*) os quais incluem os radicais livres de oxigênio, como por exemplo, o superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são importantes mediadores de danos em diversos tecidos e órgãos (Sohal e cols. 1994; Sohal e Weindruch, 1996; Zhu e cols. 2005). Estas espécies reativas podem ser geradas no citoplasma das células, em mitocôndrias ou no núcleo das células. A concentração intracelular de radicais livres pode ser aumentada pela maior geração desses radicais ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes e existem evidências de que no envelhecimento, além de ocorrer um aumento na produção de formas oxidantes, observa-se também uma diminuição significativa no poder redutor das células o que leva a um desequilíbrio metabólico (Chaves e cols. 1998; Williams e Chung, 2006).

Estudos sugerem que uma diminuição da taxa de produção de espécies reativas de oxigênio é um mecanismo comum que ocorre com a restrição alimentar em animais. A restrição alimentar parece diminuir o estado oxidativo e danos em lipídios, proteínas e especialmente no DNA mitocondrial, podendo também diminuir mutações no DNA e o efeito do envelhecimento (Barja, 2004a; Barja e Herrero, 2000; Gredilla e cols. 2001; Gredilla e Barja, 2005). De acordo com alguns autores a restrição alimentar atrasa mudanças fisiológicas relacionadas com a idade, diminui a incidência de câncer e aumenta a longevidade em mamíferos. Alguns trabalhos indicam que a restrição alimentar, que consiste em uma redução do aporte calórico habitual, tem efeitos protetores sobre o SNC, como prevenção e/ou redução do estresse oxidativo (Dubey e cols. 1996; Prolla e Mattson, 2001), de insultos excitotóxicos ou metabólicos, déficits sensoriais e motores e prejuízos cognitivos (Ingram e cols. 1987; Bruce-Keller e cols. 1999).

Em animais, o efeito da RA sobre as células parece aumentar a resistência dos neurônios a alterações relacionadas à neurodegeneração, associada ao envelhecimento (Bruce-Keller e cols. 1999; Duan e Mattson, 1999; Yu e Mattson, 1999). Yu e cols (1992), mostraram que os benefícios induzidos pela RA em roedores estão relacionados com uma melhora do estresse oxidativo mitocondrial.

Outros estudos, realizados em ratos, têm apresentado evidências da relação entre RA e a produção de ROS (Gredilla e cols. 2001; López-Torres e cols. 2002; Drew e cols. 2003; Judge e cols. 2004; Ramsey e cols. 2004; Sanz e cols. 2005; Bevilacqua e cols. 2005). Estes investigadores utilizam 40% da RA, e demonstraram que a RA usada por longo período de tempo (mais de quatro meses) leva a uma diminuição significativa da taxa de geração de ROS nos tecidos incluindo, músculo esquelético, fígado, rins, coração e cérebro; ao passo que, a RA utilizada por um período de tempo menor (algumas semanas ou no máximo 4

meses), essas diferenças podem algumas vezes não ser detectadas (Gredilla e Barja, 2005).

Apesar dos estudos descritos acima indicarem um papel benéfico da restrição alimentar, outros autores (Carney e cols. 2004; Lederman e Rosso, 1980) não observaram esses efeitos e, portanto, esse é um assunto que precisa ser melhor esclarecido. Considerando as controvérsias descritas na literatura com relação aos efeitos benéficos da RA, conclui-se que esse efeito sobre o processo de envelhecimento cerebral continua obscuro.

Existem evidências de que outra classe de espécie reativa denominada espécie reativa de nitrogênio (RNS=*reactive nitrogen species*), o óxido nítrico (NO) também está envolvido com processos fisiológicos e patológicos (Ledo e cols. 2004). O NO é um importante mensageiro biológico em vários sistemas de sinalização celular incluindo o tecido nervoso e alterações no sistema envolvido com sua produção parecem estar relacionadas com processos neurodegenerativos (Ledo e cols. 2004). O NO, o qual é sintetizado através do nitrogênio guanidínico da L-arginina pela óxido nítrico síntase, estimula a produção de GMPC (Bredt e cols. 1990). O NO atuando como mensageiro molecular a nível cerebral, parece ter um papel considerável na memória e no aprendizado, em particular na via de sinalização ERK/CREB. O NO é também um agente neuroprotetor, e múltiplos mecanismos têm sido demonstrados contribuir para a sobrevivência das células; como os níveis de antioxidante e fatores tróficos os quais são reduzidos com a idade (Siles e cols. 2002). Pequenas moléculas podem mimetizar a atividade do NO, incluindo os doadores de NO, levando assim a uma melhora na cognição e promoção da neuroproteção. Existem evidências diretas demonstrando que a peptídeo β -amilóide, envolvida com processos neurodegenerativos, leva a uma diminuição da via NO/cGMP/CREB. No entanto evidências sugerem que o NO pode desempenhar um papel independente da ativação da guanilato ciclase e

produção de cGMP, como por exemplo, pode operar em múltiplas vias de sinalização bioquímicas para assegurar a sobrevivência de neurônios em pessoas expostas ao estresse (Thatcher e cols. 2006).

Em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta alimentar, a presença do estresse oxidativo e seu impacto no metabolismo do NO parecem estar bem estabelecidas (Barja e cols. 1994; Carney e cols. 1991).

O estresse oxidativo pode ser resultado do excesso de ROS ou da deficiência da capacidade antioxidativa. De acordo com a teoria do estresse oxidativo, um aumento intracelular na ativação de proteases e lipases dependentes de Ca^{+2} levam a um prejuízo na fosforilação oxidativa mitocondrial e geração de espécies reativas de O_2 e nitrogênio, mais especificamente NO, via ativação da Ca^{+2} calmodulina cinase que ativa a enzima óxido nítrico sintase neural (nNOS= *neural nitric oxide synthase*) (Choi, 1988; Fadda e Rossetti, 1998).

CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL, MEMÓRIA E ENVELHECIMENTO

Algumas evidências sugerem que o sistema do óxido nítrico (NO), mencionado acima, pode estar envolvido com o consumo crônico de etanol. Por exemplo, Inibidores da óxido nítrico sintase diminuem o consumo e a preferência de etanol em ratos (Calapai e cols. 1996; Rezvani e cols. 1995). No entanto, outros trabalhos sugerem que os efeitos comportamentais relacionados ao consumo de etanol não são mediados pelo óxido nítrico (Green e cols. 1997). Sabe-se também que a oxidação do etanol no SNC tem sido relacionada com o aumento da formação de radicais livres (Ponnappa e Rubin, 2000). Portanto, de forma semelhante ao processo de envelhecimento, existe uma hipótese de que os efeitos deletérios causados pelo consumo crônico de etanol

podem estar relacionados a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Calapai e cols. 1996).

Vários trabalhos têm mostrado que o consumo crônico de etanol, ainda que não correlacionado com prejuízos em desempenho intelectual medido por testes de inteligência geral acaba afetando o desempenho cognitivo em testes neuropsicológicos de funções mais especializadas (Ganguli e cols. 2005; Cermak, 1990; Beatty e cols. 1995). Estudos comparativos demonstraram que os alcoolistas apresentam prejuízos em processos cognitivos básicos como percepção (Mergler e cols, 1988), rapidez e precisão motora (Sullivan e Pfefferbaum, 2005; Sullivan e cols. 2000; York e Biederman, 1988), aprendizagem espacial (Santín e cols. 2000; Oscar-Berman e Zola-Morgan, 1980) verbal (Parsons, 1998; Dopkins e cols. 1990), atenção seletiva (Garrido e Fernandez-Guinea, 2004; Oscar-Berman e Bonner, 1985) e soluções de problemas (Parsons, 1998; Becker e cols. 1986).

Dados da literatura apontam que o consumo crônico de etanol afeta o funcionamento do cérebro, causando alterações em sistemas neuroquímicos e diferentes distúrbios comportamentais incluindo déficits cognitivos (Fadda e Rossetti, 1998; Pereira e cols. 1998; Santín e cols. 2000) e alteração no comportamento exploratório (Pires e cols. 2001).

Quando associado ao envelhecimento, alguns dados indicam que o etanol potencia o prejuízo comportamental e cognitivo relacionado com o envelhecimento (Sullivan e cols. 2000; Ryan e Butters, 1980; Wood e Armbrrecht, 1982; Freund, 1984; DeFranco e cols. 1985). Tem sido reconhecido que algumas alterações neuropatológicas observadas durante o consumo crônico de etanol são comuns àquelas encontradas no processo de envelhecimento (Borges e cols. 1986). Sabe-se também que existem semelhanças entre os problemas cognitivos apresentados por pessoas idosas e alcoolistas crônicos. A partir destas evidências, lançou-se a hipótese de que os efeitos do álcool sobre a cognição se

devem à aceleração do processo de envelhecimento cerebral ("hipótese do envelhecimento prematuro causado pelo consumo crônico de álcool"). Vários estudos têm, entretanto, mostrados que os desempenhos de alcoolistas e idosos apresentam diferenças tanto quantitativas quanto qualitativas em testes de memória episódica (Kramer e cols. 1989), aprendizagem, generalização (Oscar-Berman e cols. 1990), e atenção seletiva (Oscar-Berman e Bonner, 1985). Além disso, alguns dos danos cognitivos associados ao alcoolismo são reversíveis, após períodos prolongados de abstinência (Fein e cols. 2006; Reed e cols. 1992).

Por outro lado, Krazem e cols (2003), encontraram que, em camundongos, o consumo crônico de etanol restaura o nível de RNA mensageiro da neurogranina hipocampal, na pré senescência e senescência. Essa proteína está relacionada com a via de sinalização da Ca^{+2} -calmodulina e parece relacionada com aspectos de memória e aprendizado. Esses autores mostraram que, o consumo crônico de etanol em camundongos adultos tem efeitos deletérios em processos de aprendizado e memória, ao passo que, animais idosos, consumindo etanol cronicamente tiveram melhoras em déficits cognitivos normalmente associados ao envelhecimento. A partir desses resultados, esses autores sugeriram que o consumo moderado de etanol pode ter influência benéfica no aprendizado durante o envelhecimento.

Tanto o consumo de etanol quanto o envelhecimento são acompanhados por redução significativa no número de receptores da 5-hidroxitriptamina (5-HT_{1A}). Alterações nestes receptores podem refletir alterações no cérebro relacionadas às deficiências cognitivas observadas nestas duas condições (Dillon e cols. 1991). Martin e cols, (1995) mostraram que uma redução na concentração do metabólito serotoninérgico, ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), causada por tratamento com fluvoxamina, um inibidor da captação de 5-HT, se correlaciona com melhoras no desempenho em teste de memória de

pacientes alcoolistas crônicas com diagnóstico de Síndrome de Korsakoff.

Os níveis de 5-HT estão alterados no envelhecimento e no alcoolismo, tanto em seres humanos como em animais de laboratório (Luine e Hearn, 1990; Steinbusch e cols. 1990; Davidoff e Lolova, 1991; Yoshimoto e cols. 1992; Van Luijtelaaar e cols. 1992; Grad e Rozencwaig, 1993; Richter-Levin e Segal, 1993; Venero e cols. 1993; Linnoila e cols. 1994). Em relação a 5-HT são muitas as evidências de que esse neurotransmissor possui um papel de destaque na modulação da ingestão e ou dependência do etanol (Daoust e cols. 1992; Gallant, 1993). Estudos morfológicos em alcoolistas crônicos, através da utilização de técnicas imuno-histoquímicas, demonstraram redução do número de neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico, especialmente na formação reticular pontina caudal e bulbar, onde foi observada perda neuronal de 80 a 90% (Halliday e cols. 1995; Halliday e cols. 1993). É possível que, como outras neurotoxinas, o etanol ou seus metabólitos possa causar degeneração de fibras serotoninérgicas causando morte celular, sobrepujando a capacidade de reparo dessas células, após consumo persistente e repetido de elevadas quantidades dessa droga.

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 GERAL

Avaliar os efeitos da idade, e os efeitos do consumo crônico de etanol e da restrição alimentar no envelhecimento, sobre aspectos cognitivos e neurobiológicos.

I.2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da idade (adulto e idosos) sobre:

- a) aspectos da aprendizagem e memória espacial e extinção de um comportamento adquirido em tarefa espacial;
- b) parâmetros funcionais serotoninérgicos (serotonina, ácido 5-hidroxi-indolacético e a taxa de renovação desse neurotransmissor) no núcleo dorsal da rafe, tálamo, neocórtex e hipocampo;

2. Estudar os efeitos do consumo crônico de etanol e da restrição alimentar, durante o envelhecimento, através das avaliações dos:

- a) aspectos da aprendizagem e memória espacial e extinção de um comportamento adquirido em tarefa espacial;
- b) parâmetros serotoninérgicos (serotonina, ácido 5-hidroxi-indolacético e a taxa de renovação desse neurotransmissor) no núcleo dorsal da rafe, tálamo, neocórtex e hipocampo.

3. Estudar a correlação entre os parâmetros biológicos e comportamentais.

I.3 MATERIAIS E MÉTODOS

MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados, inicialmente, 32 ratos Wistar, que chegaram ao biotério com 3 meses de idade e pesando em média 280 gramas. Esses animais foram mantidos no biotério, em gaiolas individuais, com ciclos de 12 horas de claro / escuro. Esses animais foram divididos em 4 grupos (n=8, cada) e submetidos, por 13 meses, aos tratamentos descritos abaixo, de forma que sua idade, na ocasião dos testes comportamentais e sacrifício para os estudos bioquímicos, era de 16 meses. Um mês antes dos testes comportamentais um outro grupo de animais, ratos Wistar (n=8) com três meses de idade (peso médio =280 gramas), foi introduzido ao experimento. Esse grupo serviu como um controle do efeito da idade e foi comparado somente ao grupo dos animais idosos que não receberam água e ração *ad libitum*. O experimento durou 13 meses de tal forma que na época do sacrifício os animais dos grupos dos idosos estavam com 16 meses e aqueles do grupo adulto estavam com 5 meses de idade.

Os grupos foram os seguintes:

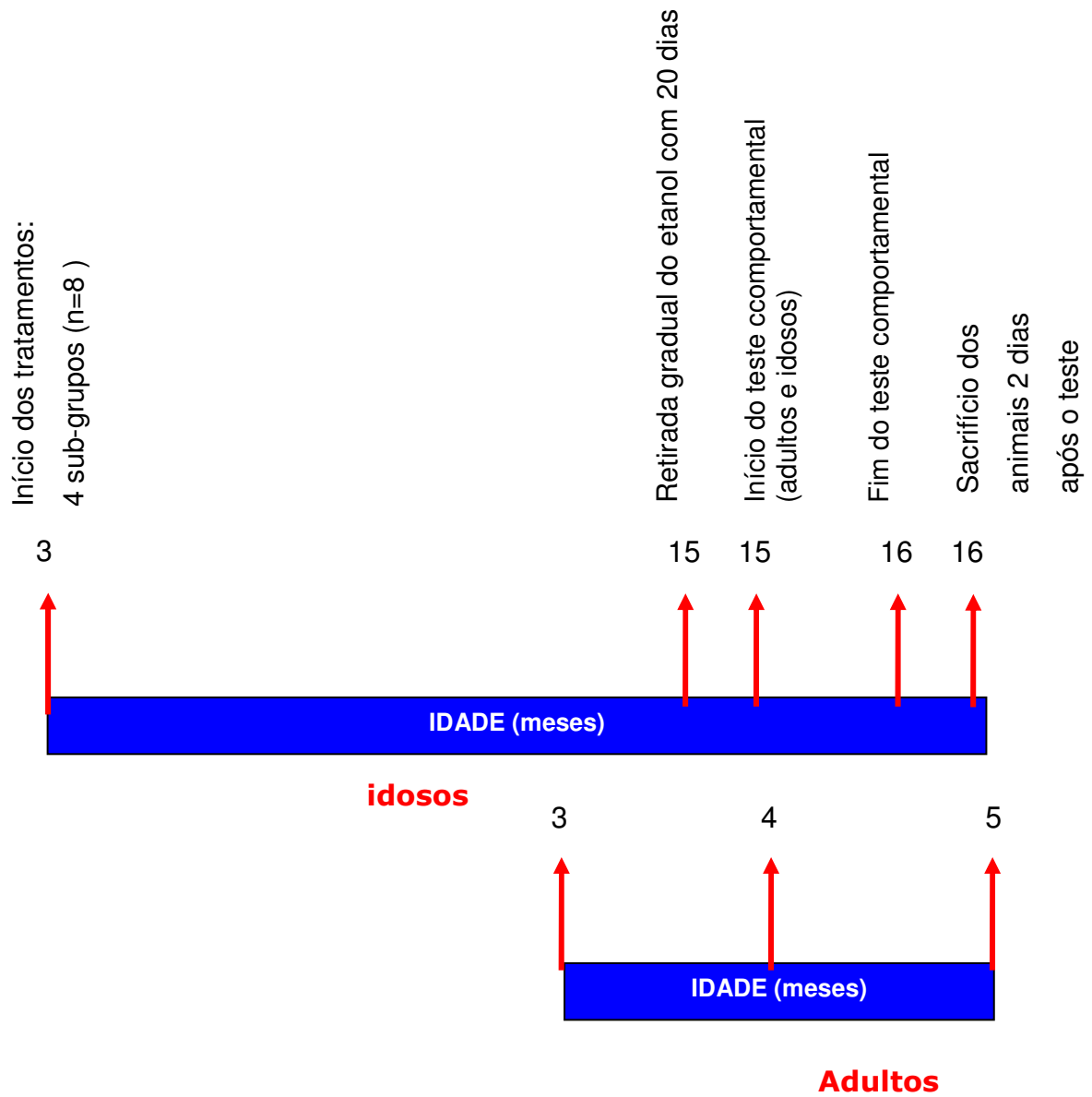
- Grupo CAI (**C**ontrole, **Á**gua, **I**doso, n=8): os animais desse grupo tiveram acesso livre a ração comercial (Nuvilab) e a água durante 13 meses;
- Grupo CEI (**C**ontrole, **E**tanol, **I**doso, n=8): estes animais tiveram tratamento igual ao anterior, mas sendo a água substituída por uma solução de etanol, com concentração inicial de 5% v/v e aumento gradativo na concentração (5% a cada dois dias) até atingir a concentração de 20% v/v. Esta concentração foi mantida por 13 meses; a seguir, a concentração foi gradativamente diminuída (5% a cada cinco dias), até chegar em 0%.

- Grupo RAI (**R**estrição calórica, **Á**gua, **I**dosos, n=8): os animais deste grupo tiveram livre acesso à água e a eles era oferecida ração comercial (Nuvilab) em quantidade que correspondia à metade da média de consumo individual de ração dos ratos dos grupos CAI e CEI registrada no dia anterior.
- Grupo REI (**R**estrição calórica, **E**tanol, **I**dosos, n=8): os animais desse grupo foram submetidos ao mesmo tratamento descrito para os animais do grupo RAI, com exceção da dieta líquida na qual a água foi substituída pela solução de etanol seguindo-se o mesmo tratamento descrito para o grupo CEI.
- Grupo CAA (**C**ontrole, **Á**gua, **A**dulto): estes animais foram tratados com água e ração (Nuvilab) à vontade e, após os testes comportamentais, foram sacrificados (na idade de 5 meses) juntamente com os ratos dos grupos idosos.

O consumo de líquido de todos os animais foi registrado diariamente. O peso corporal dos animais dos grupos CAI, CEI, RAI, REI e CAA e o consumo de ração dos animais dos grupos CAI, CEI e CAA foram também registrados semanalmente.

Após os tratamentos descritos acima, os animais dos cinco grupos foram submetidos a testes comportamentais (conforme descritos abaixo), cuja duração foi de 30 dias. Três dias após a última sessão dos testes comportamentais os animais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros separados para coleta de amostras a serem utilizadas nos estudos biológicos. Dois animais morreram durante o tratamento, um do grupo CAI e outro do grupo CEI.

Esquema do delineamento experimental



ESTUDO COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais iniciaram dois dias após completa retirada do etanol. Todos os animais foram submetidos aos testes descritos abaixo.

LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Desde sua introdução, em 1981, o procedimento descrito por Morris tem sido muito utilizado no estudo do desempenho de animais, adultos e idosos, em tarefa que envolve aprendizagem espacial (Clark e cols. 1992; Gage e cols. 1984; Gage e cols. 1989; Gallagher e Burwell, 1989; Rapp e cols. 1987).

A grande vantagem do labirinto aquático em relação a outras técnicas de estudo de aprendizagem é que não depende de privação alimentar nem de apresentação de choques elétricos. Já foi comprovado que estes dois procedimentos são mais traumáticos para ratos idosos do que para ratos adultos (Gage e cols. 1984), o que complica a comparação do desempenho das duas faixas etárias, devido a diferenças no nível motivacional.

Equipamento: os testes foram feitos em uma piscina circular de fibra de vidro, com 1,80 m de diâmetro, contendo água a $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ até o nível de 30 cm. Foi colocada uma plataforma circular (15 cm de diâmetro), em acrílico transparente, a 2 cm abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual da plataforma, a água foi turvada com a adição de aproximadamente 60g de leite em pó. A piscina estava colocada numa sala de 3 x 3 m, com painéis e outras pistas visuais na parede que servem de referência para que o animal localize a plataforma. Uma câmera de televisão com se encontrava fixada no teto,

bem acima da piscina, e era acionada no início de cada tentativa das sessões experimentais.

Procedimento: o treino (aquisição) foi feito a partir do terceiro dia de completa retirada do etanol e consistiu de 5 sessões (5 dias) consecutivas. A plataforma estava localizada em uma posição constante no centro de um dos quadrantes (quadrante alvo) e cada rato teve a oportunidade de fazer quatro tentativas por dia, com rodízio dos animais, durante cinco dias consecutivos. Cada tentativa consistia em colocar o animal dentro da piscina, junto á borda, e virado para esta, em um quadrante aleatoriamente escolhido. Foi registrado o tempo que o animal gastava para encontrar a plataforma (latência). Sempre que o animal não encontrava a plataforma em 60 segundos, ele era conduzido até ela. Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, o animal era deixado nela por 20 segundos. O comprimento da trajetória e o tempo gasto em cada um dos quadrantes da piscina foram também registrados.

Teste comprobatório: Um dia após a última sessão de treino, foi feita a avaliação da memória espacial. Nesse teste a plataforma foi retirada da piscina e o animal foi colocado na piscina e deixado lá por 2 minutos. E como mencionado acima, toda a trajetória do animal foi gravada em vídeo. Posteriormente, o desempenho foi avaliado exibindo-se a fita de vídeo, a qual era pausada a cada 2 segundos; media-se então, na tela da televisão, a distância entre a posição do animal naquele momento e o local onde a plataforma esteve colocada durante as sessões de aquisição (distância do alvo). A distância média foi calculada para cada minuto, primeiro e segundo, separadamente. A distância média do primeiro minuto foi utilizada como uma medida da memória espacial de referência. A flexibilidade comportamental dos animais também foi avaliada e expressa com "índice de extinção" (capacidade de extinguir um comportamento que não está mais sendo reforçado). Esse índice de extinção foi calculado dividindo-se, para cada animal, a distância média

do segundo (d2) minuto pela distância média do primeiro minuto (d1). Se o índice de extinção for maior que 1 significa que o rato estava mais distante do alvo (plataforma) no segundo minuto, ou seja, o animal extinguiu o comportamento que era a busca da plataforma. **A figura 02** representa o Labirinto Aquático de Morris.

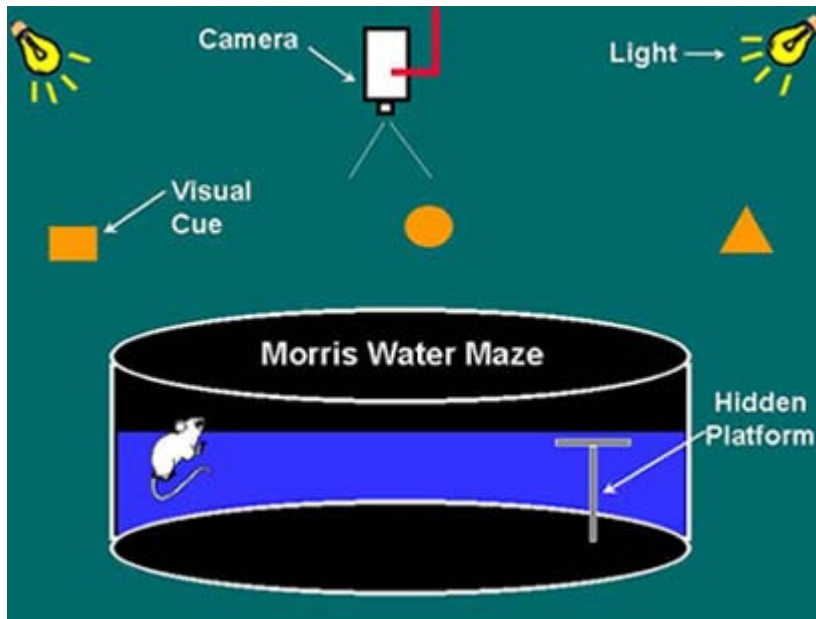


Figura 02: Esquema de uma sala com um labirinto aquático (*Morris Water Maze*) contendo uma plataforma invisível (*Hidden platform*). A sala possui dicas espaciais distais (*visual cue*). No teto da sala uma câmera está indicada.

TESTE NA BARRA GIRATÓRIA (ROTA-ROD):

Este teste foi feito como um controle experimental para avaliar possíveis déficits motores. Trata-se de um controle para se certificar de que alguma deficiência que eventualmente viesse a ser detectada nos animais idosos, no teste do labirinto aquático, se devia a dificuldades destes animais em formar o mapa espacial do ambiente e não a uma dificuldade motora.

Equipamento: o aparelho consiste de uma barra horizontal, com diâmetro de 2,0 cm por 30 cm de largura. A barra giratória estava suspensa 50 cm do chão, de acordo com (Bures e cols. 1983), e o aparelho foi ajustado em uma velocidade constante de 10 r.p.m. (rotações por minuto).

Procedimento: para verificar o seu equilíbrio, cada animal foi colocado na barra giratória com a cabeça na direção oposta à rotação. O tempo que cada animal conseguiu se manter na barra foi medido. Caso o animal não caísse em 300 segundos, o mesmo era retirado do aparelho. Antes do teste, cada animal foi colocado por 300 minutos no equipamento, sem ligar a barra giratória, com a finalidade do mesmo se familiarizar com o equipamento.

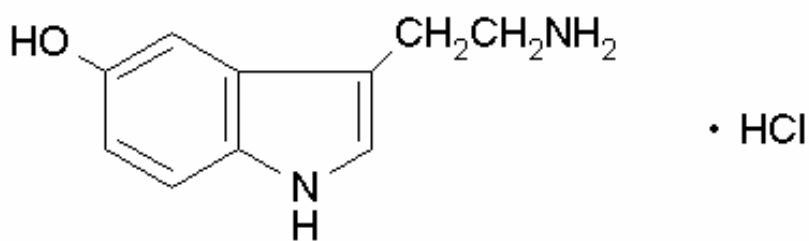
ESTUDO BIOQUÍMICO

Dois dias depois de finalizados os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e o encéfalo foi rapidamente separado. O núcleo dorsal da rafe foi primeiramente dissecado conforme detalhado abaixo. Posteriormente, as demais regiões (neocortex, hipocampo e tálamo) foram dissecadas do cérebro. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas internacionais (National Research Council, 1985). Os cérebros foram rapidamente removidos, as regiões separadas e amostras foram coletadas para os ensaios bioquímicos.

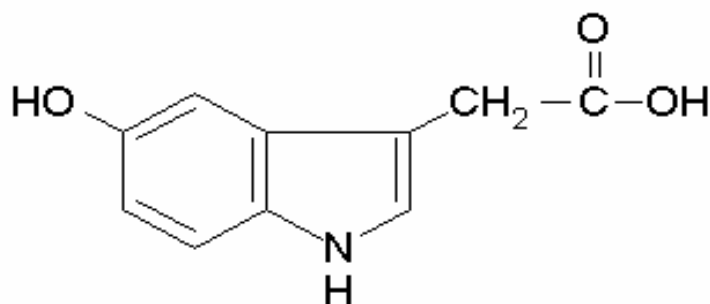
AValiação DE PARÂMETROS SEROTONINÉRGICOS

A serotonina (5-HT) e o ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), estruturas apresentadas na **figura 03** abaixo, podem ser separados e identificados por cromatografia, através de detecção eletroquímica em

um processo de cromatografia líquida de alta eficiência (Cheng e cols. 1994; Kempf e Mandel, 1981). A cromatografia é um termo geral aplicado a uma grande variedade de técnicas de separação, baseadas na distribuição de um soluto entre duas fases, uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa ou líquida). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, mais conhecida pela sigla HPLC do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*", é considerada atualmente como um eficiente método de separação e uma das técnicas analíticas mais importantes. A cromatografia visa a separação, com uma alta velocidade, de componentes de uma mistura, que são detectados em bandas ou picos distintos, dentro de um período relativamente curto.



SEROTONINA (5-HT)



ÁCIDO 5-HIDROXIINDOLACÉTICO (HIAA)

FIGURA 03: Estrutura química da serotonina e do ácido 5-hidroxiindolacético.

Processamento das amostras biológicas

Devido à constituição química complexa das amostras biológicas, antes da separação cromatográfica, estas foram submetidas a um processo de extração, sendo que, os compostos de interesse são separados a partir da fração do extrato, como descrito a seguir:

a) Amostras de tecido cerebral: o núcleo dorsal da rafe foi dissecado conforme detalhado abaixo, no item "Controle morfológico da obtenção do NDR". A dissecação das regiões cerebrais (neocórtex, hipocampo e tálamo) foi feita sobre uma placa de Petri mantida em gelo e as amostras foram rapidamente pesadas e armazenadas a -70°C por no máximo 30 dias. Depois das amostras serem processadas, (descrição abaixo) os extratos contendo 5-HT e 5-HIAA, têm no máximo cinco dias de validade no freezer a 0°C , portanto, todos os ensaios foram realizados no mesmo dia do processamento das amostras.

Processamento das amostras: consistiu em sonicar aproximadamente 20 mg do tecido cerebral (neocórtex, tálamo ou hipocampo) em solução contendo: 980 μl de ácido perclórico 0,1 M, 10 μl tiosulfato de sódio 0,4 mM ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e 10 μl EDTA 0,1 mM. As amostras do núcleo dorsal da rafe foram pesadas em balança analítica de alta precisão e transferidas para tubos contendo 500 μl dessa solução. Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo tipo "Potter" mantidos em gelo, e homogeneizados por três vezes e então centrifugados a 5292 g (*Sigma modelo 4k15, rotor 11156/13115*), a 4°C . O sobrenadante foi então separado e amostras de 200 μl foram aplicadas no HPLC, conforme descrito abaixo.

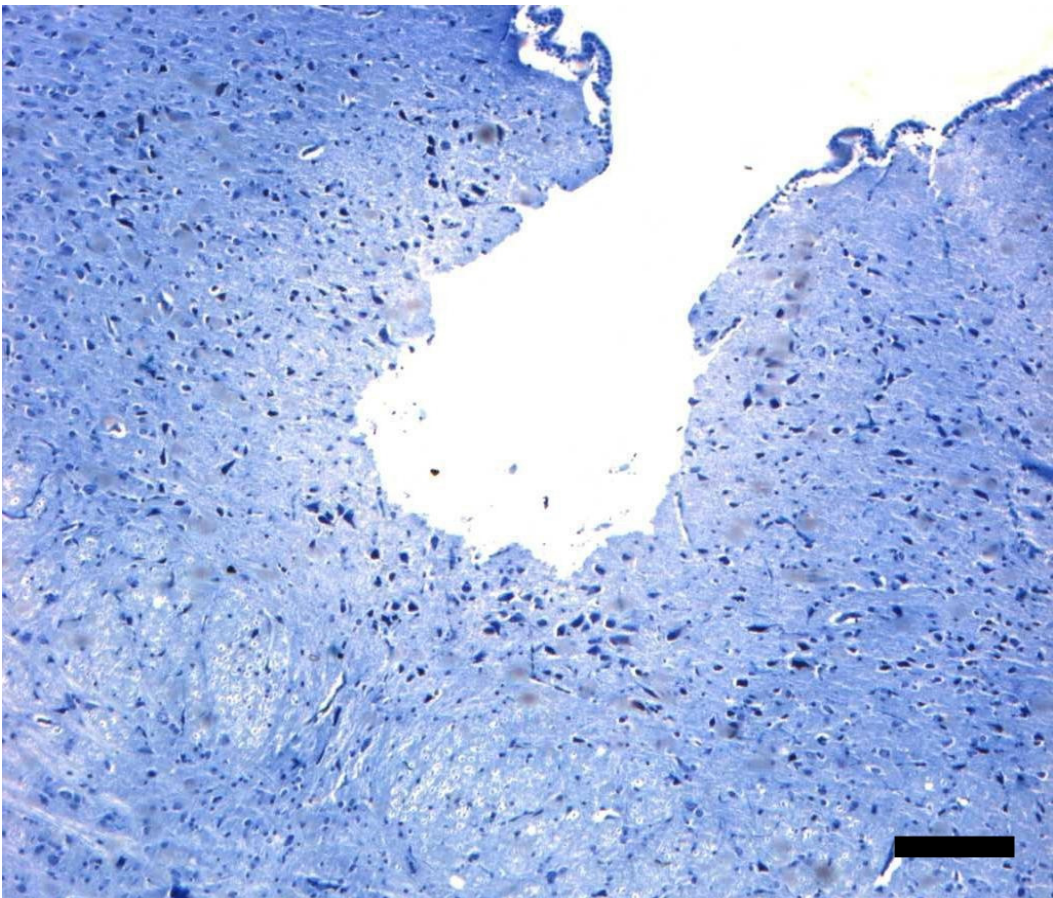
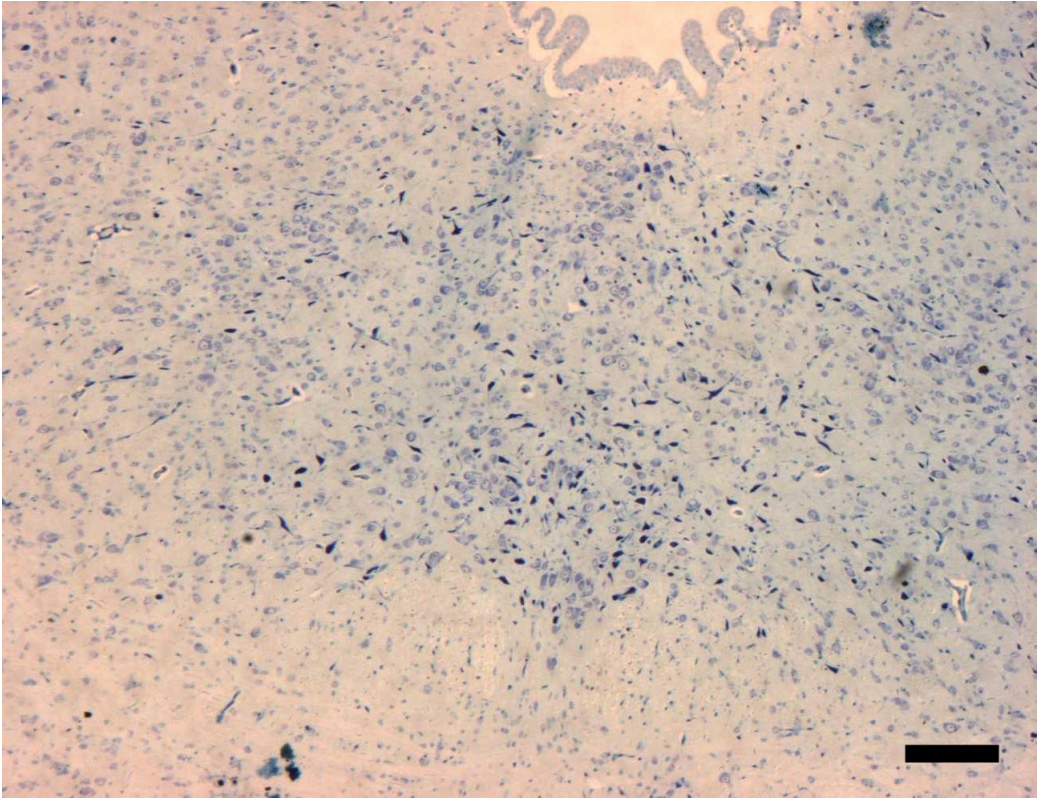
CONTROLE MORFOLÓGICO: OBTENÇÃO DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE

Processamento do material: obtenção dos cortes e dissecação do núcleo dorsal da rafe: Como mencionado acima, no item obtenção de amostras

de tecido cerebral, após sacrifício dos animais, o encéfalo foi imediatamente removido. Para obtenção do núcleo da rafe, o cérebro foi colocado em um suporte de acrílico (moldado a partir de um cérebro de rato fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4). Este suporte continha duas fissuras para que dois cortes coronais na altura do tronco cerebral pudessem ser feitos, com a finalidade de delimitar o núcleo dorsal da rafe (Abrams e cols. 2004). O primeiro corte coronal foi realizado seguindo a coordenada -7,30 mm e o segundo na coordenada -8,30 mm de Bregma (Paxinos e Watson, 1998). A espessura do tecido, contido entre os dois cortes, foi de 1 mm. A partir dessa fatia de tecido o núcleo dorsal da rafe foi dissecado utilizando uma cânula de 0,8 mm de diâmetro (Domínguez e cols. 2003). A cânula foi introduzida perpendicularmente à fatia de tecido, logo abaixo do aqueduto cerebral onde se localiza o núcleo dorsal da rafe. Essa amostra (núcleo da rafe) foi rapidamente pesada e armazenada a -70⁰C até o dia do ensaio para dosagem de 5-HT e 5-HIAA. A fatia do tronco cerebral sem o núcleo da rafe foi processada como descrito a seguir e o cérebro foi utilizado para obtenção das demais regiões (neocortex, hipocampo e tálamo).

Controle da retirada do núcleo dorsal da rafe: coloração e análise morfológica da região de localização do núcleo dorsal da rafe: A fatia cerebral de 1 mm de espessura, sem o núcleo da rafe, foi então transferida e armazenada em um recipiente contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, para posterior análise morfológica e confirmação se o núcleo dorsal da rafe foi realmente retirado. Esse material foi processado para inclusão em parafina e cortados da seguinte forma, em micrótomo rotatório (*Jung AG- Heidelberg- Germany*): no sentido coronal ou transversal de 5 μ m de espessura a intervalos de 25 μ m, desta forma foram obtidos cinco fragmentos de 5 μ m para cada animal. Esses cortes foram transferidos para lâminas e então corados pelo Giensa, conforme técnica de rotina estabelecida no Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina do Departamento de Anatomia

Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Depois de corado, os cortes foram analisados em microscópio (Carlzeisf-3200K, Axio-Cam-Color) com um aumento de 40x. Para os cortes nos quais foram confirmados que o núcleo dorsal da rafe foi corretamente retirado, os dados obtidos referentes às dosagens de 5-HT e 5-HIAA foram incluídos na análise estatística. De acordo com esse critério não foram incluídos na análise estatística: 01 amostra de cada um dos grupos CAI, RAI e REI, 02 amostras do grupo CEI, e 03 amostras do grupo CAA. A **figura 4** ilustra dois cortes histológicos: painel A, mostra corte do tronco encefálico, na altura do mesencéfalo ponte e bulbo, contendo o NDR, e no painel B, está representado outro corte no qual o NDR foi retirado do tronco encefálico.



b) amostras de urina de 24 horas: essas amostras foram coletadas em frascos âmbar e mantidas a 4°C. Posteriormente, foram acidificadas até pH=2 e acetato de etila foi adicionado para uma concentração de 1M. Acrescentou-se tampão citrato pH 7.0. A fase aquosa foi separada e, nela adicionado HClO₄ 1M. Essa solução aquosa foi então filtrada e um volume de 20µl de amostra aplicado no HPLC para dosagem do metabólito 5-HIAA. Os resultados foram expressos em nmol/ por volume de urina 24h.

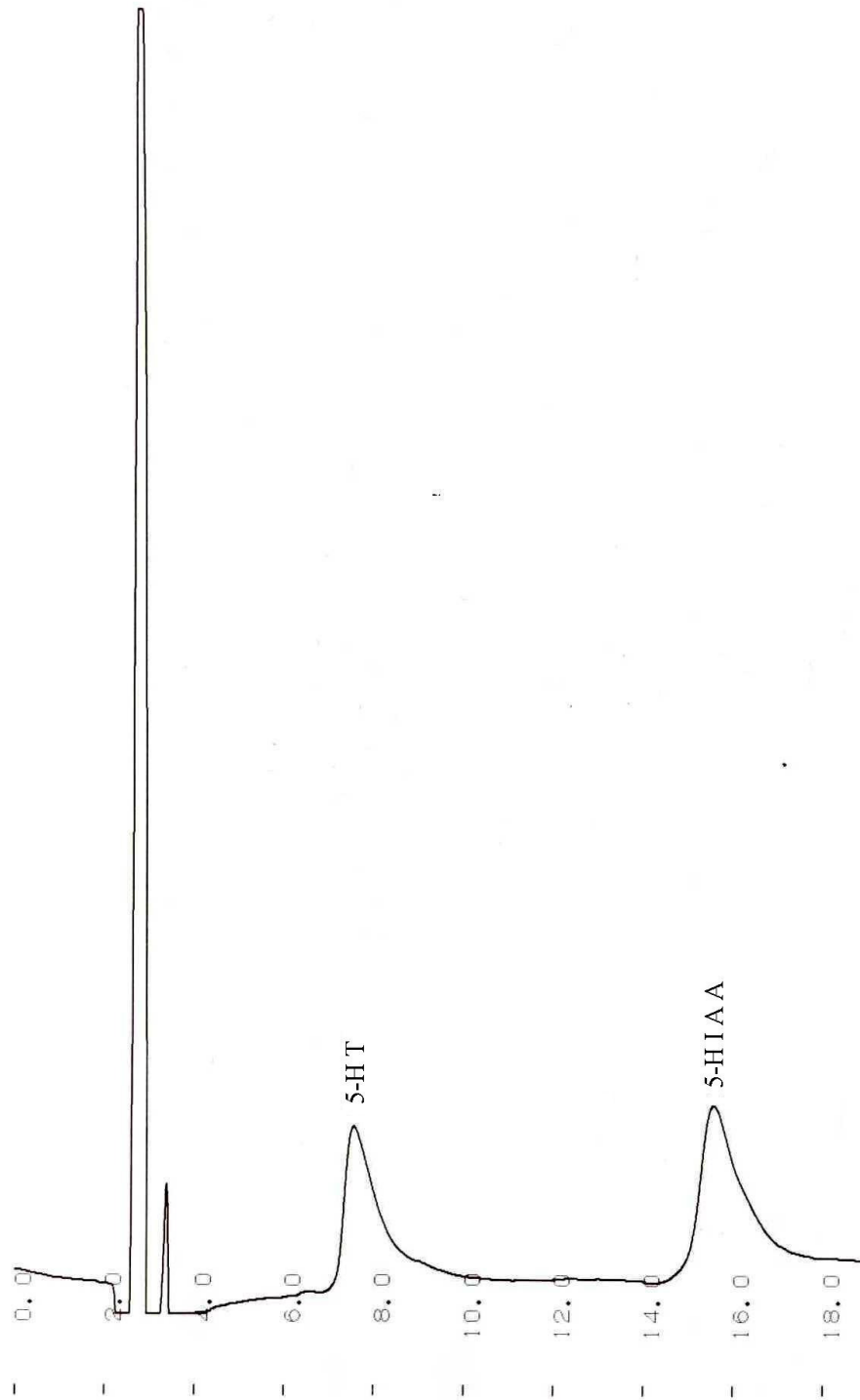
DOSAGEM DE SEROTONINA E DO ÁCIDO 5-HIDROXI-INDOL-ACÉTICO

No presente trabalho, foi utilizada uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (*Hibar-Futigsanle RT*) e uma pré-coluna (*RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R Germany*). A fase móvel consistiu de uma solução tampão de ácido cítrico 0.199 M, acetato de sódio 0.243 M, EDTA 2.95×10^{-4} M e metanol (91: 9, v/v). O pH foi ajustado para 4.0. A fase móvel foi sempre filtrada e degaseificada antes do uso. A taxa de fluxo foi de 1.0 ml/min e o volume de amostra aplicado foi de 200 µL do extrato de tecido cerebral ou 20 µL de extrato de amostra de urina 24h. Utilizou-se um detector eletroquímico de Ag/AgCl (*Shimadzu Electrochemical Detector L-ECD-6A-Tokyo, Japan*), e o potencial de detecção da célula eletroquímica, mais seletivo para a 5-HT e o 5-HIAA, foi de 0.85 V. A altura e a área dos picos do cromatograma foram medidas, através de um integrador (*Shimadzu C-R7A plus*) e as concentrações de 5-HT e do 5-HIAA foram calculadas de acordo com suas respectivas curvas padrões. Os padrões e substâncias usadas para interpolar as curvas foram todos de origem *Sigma, St. Louis*.

Curva padrão e cálculo da concentração de 5-HT ou 5-HIAA na amostra:

Foram utilizados cinco padrões para a obtenção da curva padrão, tanto para o 5-HT quanto para o 5-HIAA. As concentrações dos padrões foram as seguintes: P₁ = 4 pg/µl; P₂ = 8 pg/µl; P₃ = 12 pg/µl; P₄ = 16 pg/µl e P₅

= 20 pg/ μ l. O valor da inclinação da reta obtida para a 5-HT foi igual a 15244,32 e o valor da inclinação para o 5-HIAA foi igual 24456,02. Portanto: Área do pico (5-HT ou 5-HIAA) = a x [5-HT], sendo a = inclinação da reta. Considerando os devidos fatores de diluição das amostras, os resultados foram expressos por grama de tecido (para as regiões cerebrais) ou por volume de urina 24h. Portanto, a quantificação foi feita comparando-se as áreas ou alturas dos picos obtidas no cromatograma para cada amostra, com seu respectivo padrão de referência (curva padrão). Os resultados, para 5-HT e 5-HIAA, foram expressos em ng/g de tecido. De acordo com Shannon e cols, 1986, a partir desses dados foi calculada a taxa de renovação da serotonina = [5-HIAA]/[5-HT]. A **figura 05** apresentada a seguir, ilustra um perfil de cromatograma indicando que o pico da 5-HT foi detectado entre 7 a 8 minutos e o pico do 5-HIAA de 15 a 16 minutos.



** CALCULATION REPORT ** * WARNING * CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
								L.F. Oliveira-Silva
TOTAL							0	0

FIGURA 05: Perfil típico de um cromatograma indicando os picos de serotonina (5-HT) e ácido 5-Hidroxi-indol-acético (5-HIAA), com seus respectivos tempos de retenção.

ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURAL (nNOS)

A atividade da óxido nítrico sintase neural (nNOS) foi medida no neocórtex e cerebelo, como um experimento controle para avaliar um possível distúrbio metabólico relacionado com a produção dessa espécie reativa de oxigênio. A atividade da nNOS foi medida na fração solúvel neocortical e cerebelar de acordo com o método descrito por Bredt e cols. 1989, com algumas modificações. O NO produzido pela incubação da nNOS é uma molécula muito instável sendo oxidada a nitrito e nitrato. Em estudo prévio Nims e cols. (1996), verificaram que o nitrito é um produto estável formado a partir do NO, o qual pode ser dosado pelo método colorimétrico de Griess usando espectrofotometria. O método consiste, em uma primeira etapa, na obtenção do sobrenadante através de centrifugação do homogeneizado de tecido cerebral do neocórtex e do cerebelo. Alíquotas deste sobrenadante, contendo a nNOS, foram incubados por 30 minutos. O NO produzido pela nNOS é medido de forma indireta através da concentração de NO^{-2} que é detectado, a 554 nm, pela reação calorimétrica com o Reagente de Griess. A coloração foi comparada com padrões e o resultado foi expresso em mmol/mg de proteína.

DOSAGEM DE ALBUMINA

A concentração plasmática de albumina foi medida por ser um dos parâmetros indicadores do estado nutricional dos animais. Os níveis de albumina sanguínea foram dosados no soro, usando método espectrofotométrico e reagentes de um *kit* para dosagem de albumina (Bioclin®). As dosagens foram realizadas no espectrofotômetro (Cary 50) em comprimento de onda $\lambda = 630\text{nm}$. Os valores foram lançados em

curva padrão e os resultados foram expressos em concentração g/dl de soro.

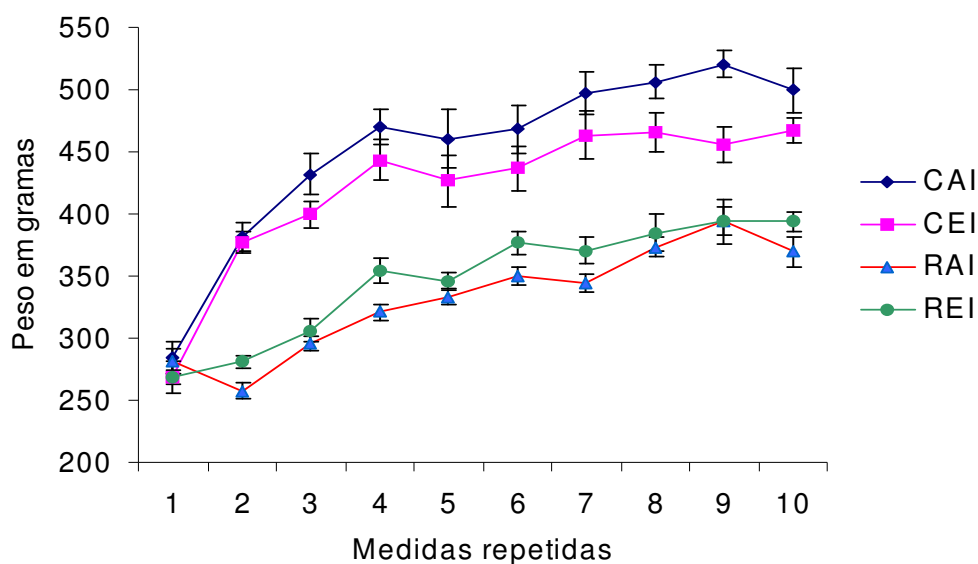
ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos testes comportamentais (Barra giratória e desempenho no teste comprobatório do labirinto aquático), e bioquímicos (concentração de serotonina e metabólitos, óxido nítrico e albumina) foram tratados por Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2 x 2, sendo os fatores: restrição calórica (dois níveis) e tratamento crônico com etanol (dois níveis). Para os dados referentes ao peso corporal e ingestão de líquido foi utilizado o teste ANOVA três fatores 2 x 2 x 10, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: restrição calórica (dois níveis), tratamento crônico com etanol (dois níveis) e mensuração repetida destas variáveis (feita 10 vezes). Para os dados referentes ao desempenho no treino do labirinto aquático foi utilizada Análise de Variância de três fatores 2 x 2 x 5, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: restrição calórica (dois níveis), tratamento crônico com etanol (dois níveis) e desempenho nas 5 sessões sucessivas de treino no labirinto aquático. Como já relatado, a quantidade de ração oferecida aos animais dos grupos submetidos à restrição calórica foi calculada a partir do consumo dos ratos dos grupos controle; portanto, o consumo de ração dos animais dos grupos RAI e REI não era uma variável dependente. Assim, os dados referentes ao consumo de ração não incluíram os grupos RAI e REI e foram tratados utilizando ANOVA 2 x 10 com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento com etanol (dois níveis) e 10 medidas repetidas. O efeito do envelhecimento foi avaliado utilizando-se o "teste t", comparando-se as medidas comportamentais e bioquímicas, dos grupos CAI (idosos) e CAA (adultos). As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

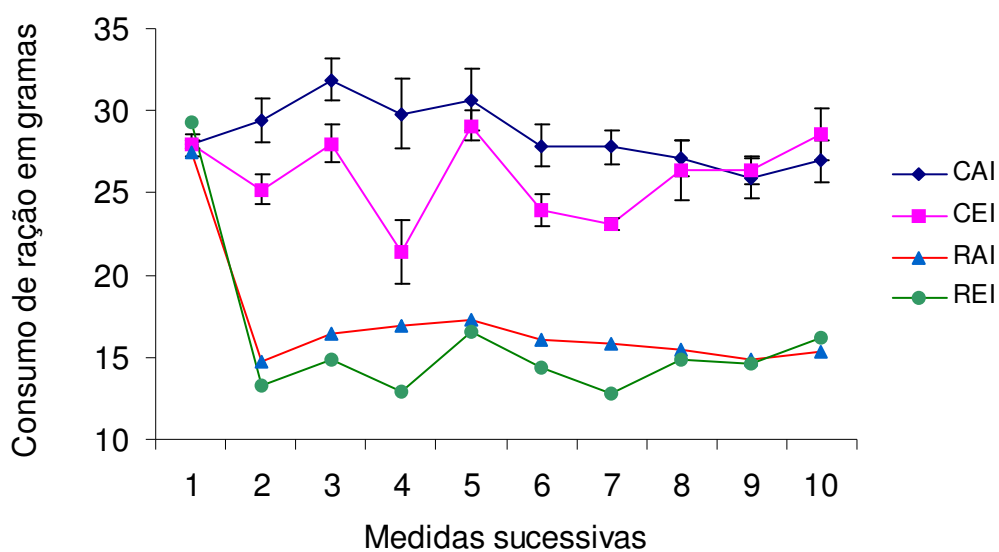
I.4 RESULTADOS

MODELO EXPERIMENTAL

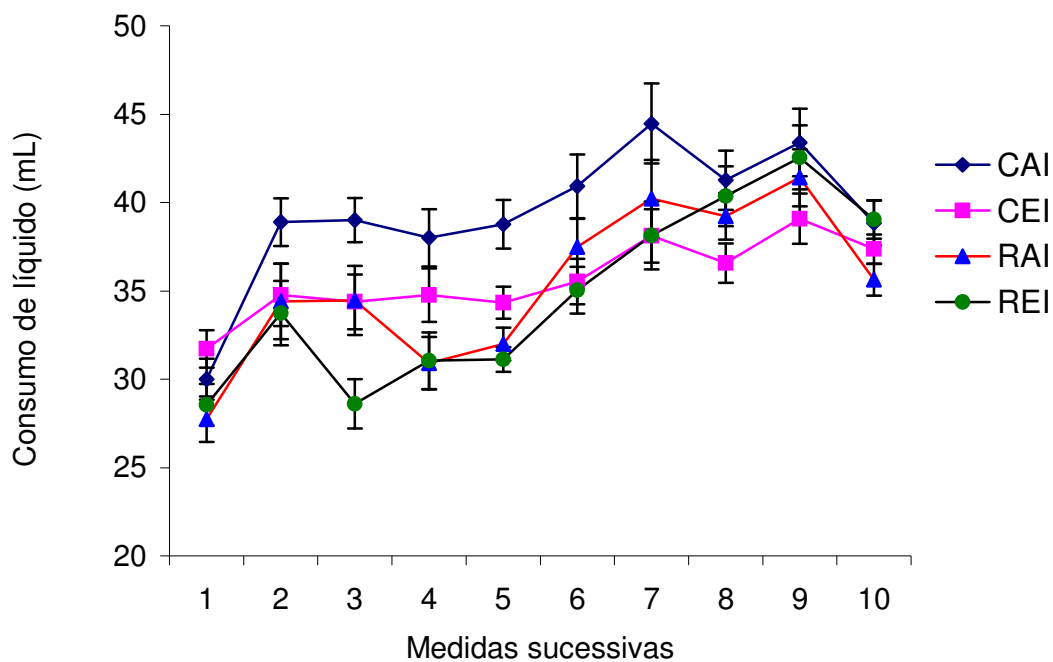
A **figura 6A** mostra os efeitos da restrição e do consumo crônico de etanol sobre o ganho de peso dos animais idosos. A análise de variância com medidas repetidas no último elemento 2x2x10 mostrou que a restrição tem efeito significativo sobre o ganho de peso ($F_{(1,24)} = 94,07$, $p < 0,01$). Observamos também interação significativa entre os efeitos da restrição e do consumo de etanol ($F_{(1,24)} = 5,60$, $p < 0,05$). O peso médio dos animais do grupo CEI (Controle, Etanol, Idoso) não foi significativamente diferente do peso dos animais do grupo CAI. O tempo teve efeito significativo ($F_{(9,216)} = 142,89$, $p < 0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos da restrição e do tempo ($F_{(9,216)} = 15,29$, $p < 0,01$). Isto significa que, a evolução do peso dos animais dos grupos com dieta restrita (RAI e REI) foi diferente da evolução do peso dos animais dos grupos com dieta controle (CAI e CEI).



Como relatado na secção *Material e Método*, os animais dos grupos com restrição alimentar consumiram 50% de ração em relação ao consumo de seus controles, como mostrado na **figura 6B**. ANOVA fatorial com medidas repetidas no último elemento (2 x 10) mostrou efeito significativo do tratamento com etanol ($F_{(1,24)} = 5,75, p < 0,05$). Os animais do grupo CEI consumiram menos ração quando comparados com os animais do grupo CAI.

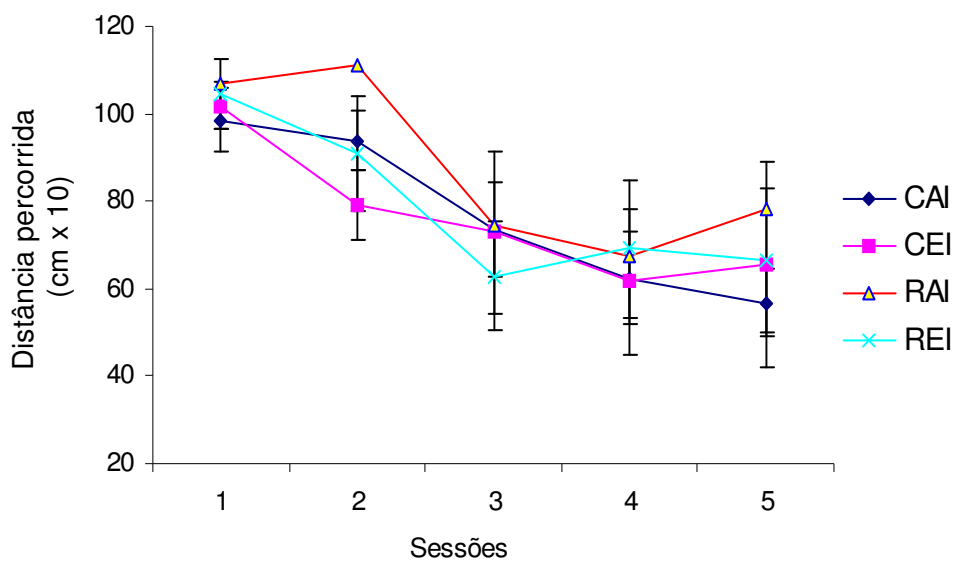


O consumo de líquido pelos animais dos quatro grupos, é mostrado na **figura 6C**. A análise de variância com medidas repetidas no último elemento (2x2x10) mostrou que a restrição tem efeito significativo sobre a ingestão de líquido. Os animais que estavam em restrição alimentar consumiram menos líquido ($F_{(1,24)} = 11,64, p < 0,01$). O tempo também teve efeito significativo no consumo de líquido ($F_{(9,216)} = 3,15, p < 0,01$). Houve interação entre os efeitos da restrição e do consumo de etanol ($F_{(9,216)} = 4,83, p < 0,01$), mostrando que os animais dos grupos submetidos à dieta restrita consumiram mais líquido que os dos grupos controles, e tripla interação entre o os efeitos do tempo, do consumo de etanol e da restrição calórica ($F_{(9,216)} = 9,216, p < 0,01$), significando que a evolução do consumo de líquidos foi diferente entre os quatro grupos.

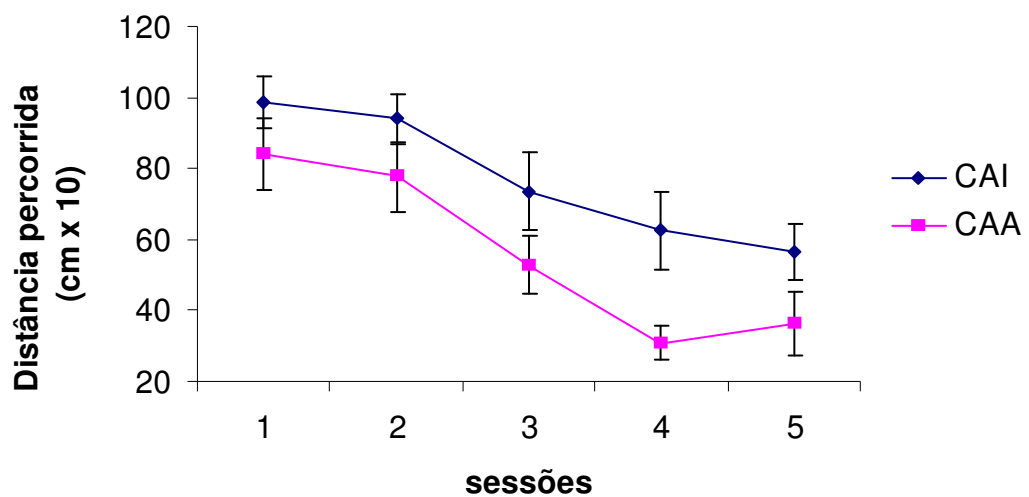


ESTUDO COMPORTAMENTAL

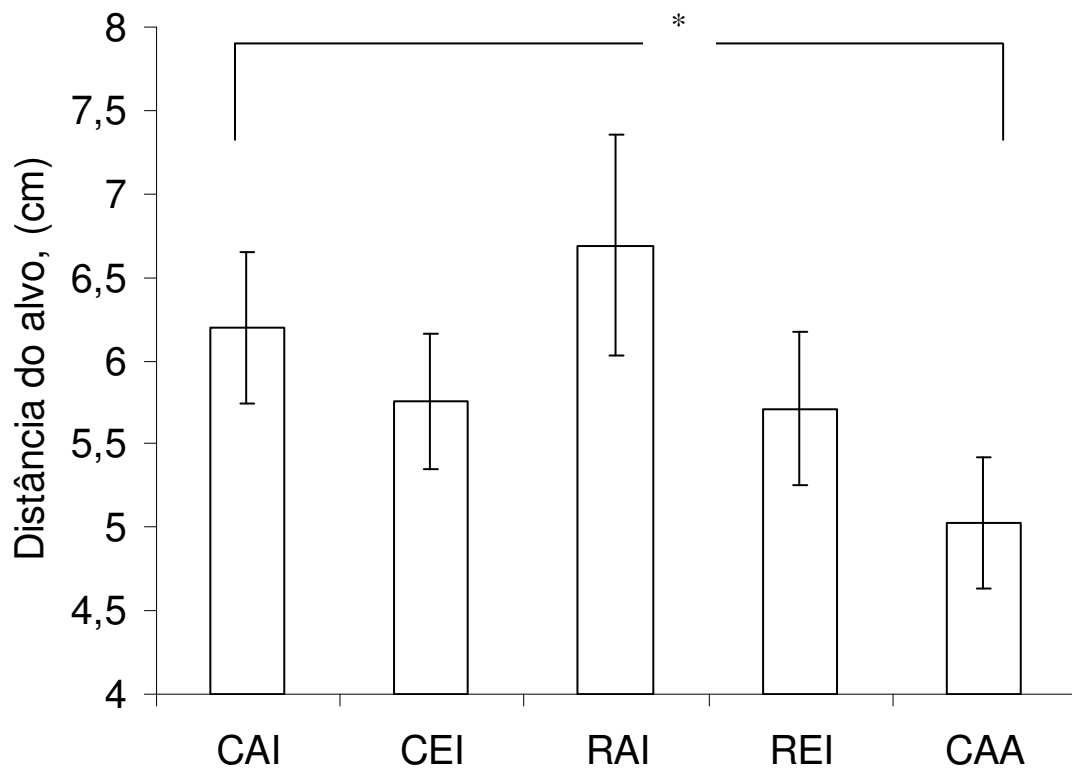
O desempenho dos animais idosos nas sessões de aquisição do labirinto aquático está apresentado na **figura 07**. A análise de variância 2x2x5 mostrou um efeito significativo do tempo (sessões) ($F_{(3,60)} = 8,85$, $p < 0,01$), indicando que a distância percorrida (variável dependente) diminuiu com o passar das sessões para todos os grupos (CAI, CEI, RAI e REI), o que mostra que os animais aprenderam a localizar a plataforma. Nem a restrição alimentar nem o consumo crônico de etanol tiveram efeito significativo, assim, os animais de todos os grupos aprenderam e não tiveram diferenças entre si.



Quando comparamos o desempenho dos animais do grupo adulto com o desempenho dos animais idosos, verificamos que os animais adultos têm um melhor desempenho comparado aos idosos. A análise de variância 2 x 5 mostrou um $F_{(1,12)} = 9,75$, $p < 0,01$ para o efeito da idade e $F_{(4,40)} = 13,26$, $p < 0,01$ para as sessões. Isso indica que, embora os animais dos dois grupos tenham sido capazes de aprender a tarefa, o desempenho dos animais idosos foi pior quando comparado com aquele dos animais adultos. Os dados estão apresentados na **Figura 08**, abaixo.



No teste comprobatório, no primeiro minuto, a ANOVA 2 x 2 mostrou que nem restrição calórica nem tratamento crônico com etanol tiveram efeito significativo sobre o desempenho dos animais dos 4 grupos de idosos. A análise estatística (*Teste t*) mostrou diferença significativa ($t=1,96$; $p=0,036$), entre as médias dos grupos CAI e CAA. Os animais do grupo adulto tiveram um melhor desempenho que os do grupo idoso, mostrando que a idade interfere na memória espacial. Esses dados estão apresentados na **Figura 09**.



A **figura 10** mostra o índice de extinção durante o teste comprobatório. A análise de variância 2x2 mostrou um efeito significativo do tratamento crônico com etanol no desempenho dos animais dos grupos idosos ($F_{(1,26)} = 7,45, p < 0,025$). Quando o grupo CAA foi comparado com o grupo CAI, o teste t mostrou que as médias são significativamente diferentes ($t = -2,39, p = 0,02$), os animais idosos controle água tiveram maior dificuldade para extinguir um comportamento aprendido do que os adultos.

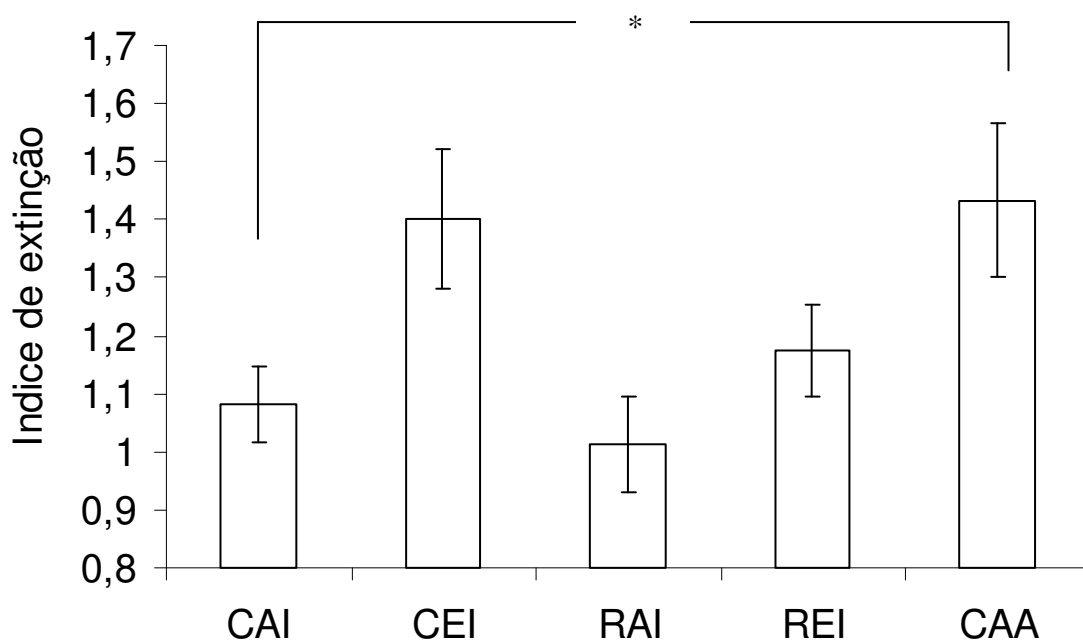


FIGURA 10

Média ± erro padrão do desempenho dos animais no teste comprobatório: extinção comportamental. Houve efeito significativo do etanol sobre a restrição e a idade $p < 0,025$, entre os quatro grupos experimentais de animais idosos: CAI= controle água idoso; CEI= controle etanol idoso; RAI= restrito água idoso e REI= restrito etanol idoso. Houve diferença significativa ($t = -2,39, *p = 0,019$) entre os animais do grupo CAA (controle água adulto) e CAI (controle água idoso). Os resultados foram expressos pelo índice de extinção (segundo minuto/primeiro minuto).

O experimento controle, referente ao teste da barra giratória revelou uma tendência dos animais adultos permanecerem mais tempo na barra giratória, no entanto, esta diferença não foi significativa. Esse resultado indica que a idade não interferiu no desempenho neste teste. O teste estatístico ANOVA 2 x 2 mostrou que, entre os animais idosos, nem a restrição calórica nem o tratamento crônico com etanol tiveram efeito significativo na atividade motora dos animais (dados não apresentados).

ESTUDO BIOQUÍMICO

As **figuras 11 (Painéis A e B) e 12**, apresentadas a seguir, mostram os resultados da determinação da concentração de 5-HT e 5-HIAA e da taxa ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$), respectivamente, nas quatro regiões do sistema nervoso central: neocortex, hipocampo, tálamo e núcleo dorsal da rafe. Com exceção dos dados obtidos para a concentração de 5-HT no tálamo e núcleo dorsal da rafe, todos os demais dados possuem distribuição normal e, portanto, foi utilizada uma ANOVA fatorial 2x2 para avaliar os efeitos dos fatores restrição alimentar e consumo crônico de etanol, assim como o efeito de sua interação. Comparações entre os quatro grupos de animais idosos não mostraram efeito significativo para nenhum dos dois tratamentos e nem interação entre eles, em nenhuma das regiões estudadas. Por outro lado, houve efeito significativo da idade na concentração de 5-HIAA em duas regiões: hipocampo ($p=0,02$) e núcleo dorsal da rafe ($p=0,035$). Além disso, foi também observado um efeito significativo da idade na taxa de $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ no núcleo dorsal da rafe ($p=0,037$).

Como os dados da concentração de 5-HT no tálamo e núcleo dorsal da rafe não possuem distribuição normal, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para testar se há diferença entre os grupos de animais idosos (CAI, CEI, RAI e REI), e desta forma avaliar os efeitos dos fatores restrição alimentar e consumo crônico de etanol, assim como o efeito de sua interação, nessas duas regiões. O valor encontrado de

$p=0,13$ (para os dados obtidos no tálamo) e $p=0,74$ (para os dados obtidos no núcleo dorsal da rafe) indicam que não há diferença entre os 4 grupos, ou seja, não há efeito de nenhum dos dois fatores em nenhuma das duas regiões.

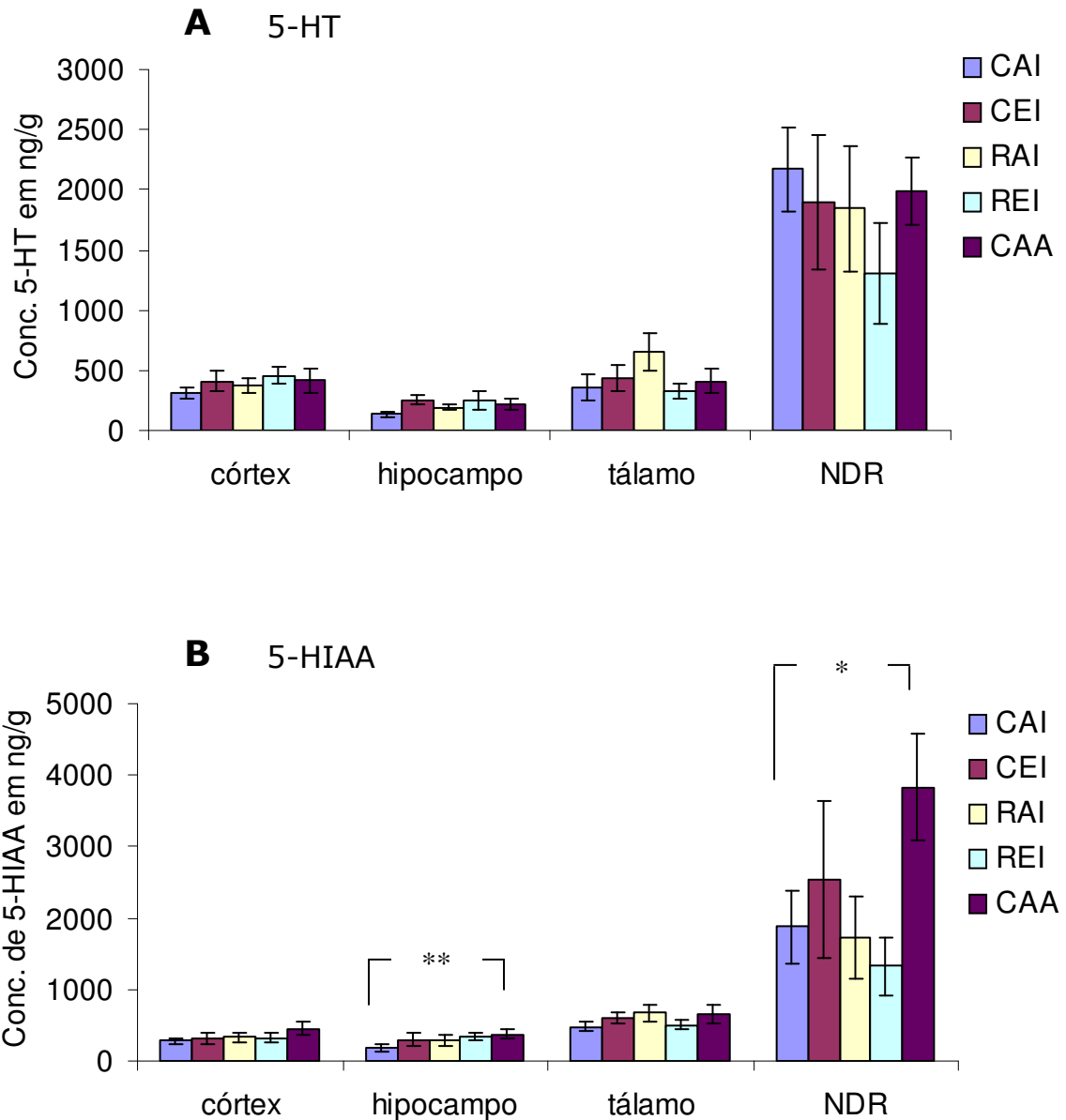


FIGURA 11

Média \pm erro padrão da concentração de serotonina (5-HT) (Painel A) e do ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) (Painel B), no neocórtex, hipocampo, tálamo e núcleo dorsal da rafe (NDR) dos animais dos cinco grupos experimentais: CAI= controle água idoso; CEI= controle etanol idoso; RAI= restrito água idoso e REI= restrito etanol idoso e CAA= controle água adulto. NDR = núcleo dorsal da rafe. Diferenças estatísticas significativas estão descritas no texto. * $p<0,05$ ** $p<0,025$.

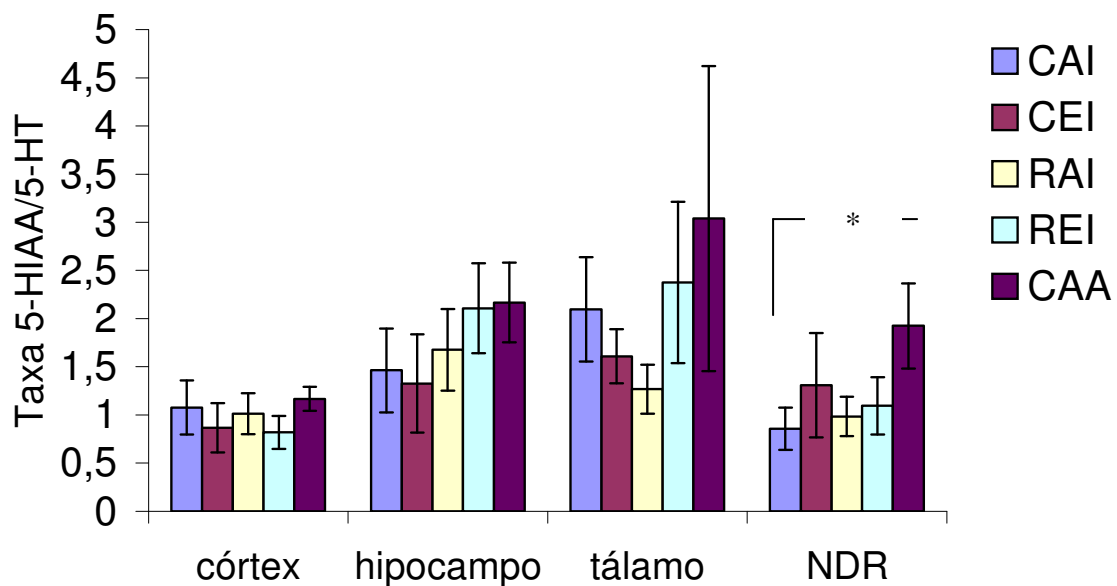


FIGURA 12

Média \pm erro padrão da taxa [5-HIAA]/[5-HT] no neocórtex, hipocampo, tálamo e núcleo dorsal da rafe (NDR) dos animais dos cinco grupos experimentais: CAI= controle água idoso; CEI= controle etanol idoso; RAI= restrito água idoso e REI= restrito etanol idoso e CAA= controle água adulto. As diferenças significativas entre os grupos estão descritas no texto. * $p < 0,05$.

A figura 13 mostra os resultados da concentração do metabólito ácido-5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) em amostras de urina 24 horas. Como os dados possuem distribuição normal, foi utilizada a análise de variância 2x2 para avaliar os efeitos dos fatores restrição alimentar e consumo crônico de etanol, assim como o efeito da interação entre esses dois tratamentos. O consumo crônico de etanol tem efeito significativo ($F=8,076$, $p=0,009$). Para comparar o grupo CAI com o grupo CAA foi utilizado o teste t, já que os dois grupos têm distribuição normal. O valor encontrado de $p=0,448$, indica que não há diferença entre as médias dos dois grupos.

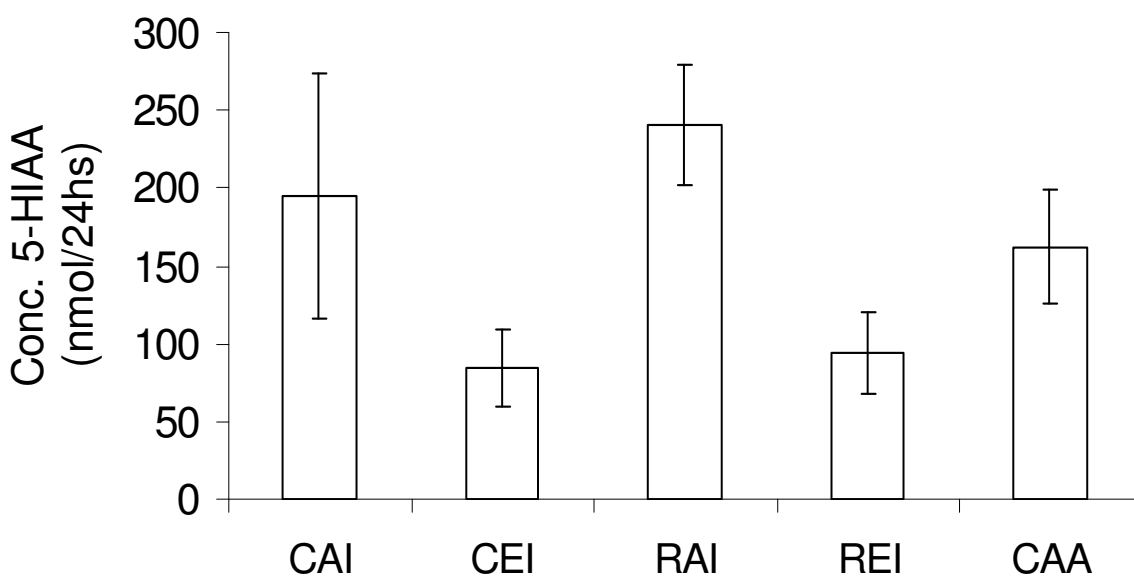


FIGURA 13

Média \pm erro padrão da concentração de 5-HIAA em amostras de urina 24 h dos animais dos 5 grupos experimentais: CAI= controle água idoso; CEI= controle etanol idoso; RAI= restrito água idoso e REI= restrito etanol idoso e CAA= controle água adulto. Os animais ingerindo etanol (CEI e REI) tiveram uma concentração menor do 5-HIAA na urina em comparação aos animais dos grupos que consumiram água (CAI e RAI). $p=0,009$.

EXPERIMENTOS CONTROLES

CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA:

Como os dados referentes à concentração de albumina no soro têm distribuição normal, foi realizada uma ANOVA de dois fatores (2x2). O teste mostrou que, nem a restrição alimentar ($F_{1,26} = 0,393$; $p > 0,05$) nem o etanol ($F_{1,26} = 4,158$; $p > 0,05$) tiveram efeito significativo sobre o nível de albumina, e não houve interação entre os dois tratamentos ($F_{1,26} = 0,121$; $p > 0,05$). Esses dados sugerem que os tratamentos (restrição alimentar e consumo crônico de etanol) não causaram um estado de desnutrição nos animais. Para comparar os grupos CAI e CAA foi utilizado o teste t de *Student*. O valor de $p = 0,212$ indica que não há diferença entre as médias dos dois grupos, idosos controle e adulto. A tabela abaixo apresenta a concentração da albumina (média e erro padrão) no soro em g/dl para os cinco grupos experimentais.

	CAI	CEI	RAI	REI	CAA
Média (g/dl)	8,134	7,48	8,14	6,81	7,38
SE	0,26	0,35	0,47	0,33	0,54

ATIVIDADE DA nNOS:

Com relação à atividade da nNOS, no cerebelo e no neocortex, para os animais idosos dos quatro grupos, ANOVA fatorial 2x2 não mostrou efeito significativo nem para a restrição ($F_{1,26} = 0,02$; $p > 0,05$) nem para o etanol ($F_{1,26} = 1,18$; $p > 0,05$) e também não houve interação entre o efeito dos dois tratamentos ($F_{1,26} = 0,19$; $p > 0,05$) sobre a atividade da nNOS no cerebelo (dados não apresentados). Nem a restrição alimentar ($F_{1,10} = 0,23$; $p > 0,05$) nem o etanol ($F_{1,10} = 0,79$; $p > 0,05$) alteraram de forma significativa a atividade da nNOS no neocortex; e também não houve interação entre os dois tratamentos ($F_{1,10} = 0,009$; $p > 0,05$).

Para comparar os grupos CAI e CAA foi utilizado o teste *t de Student*. Quando se compara os grupos CAI e CAA verifica-se que a idade também não afetou de forma significativa a atividade da nNOS em nenhum dos dois tecidos. Diferentemente do cerebelo, no neocórtex verificamos uma tendência a um aumento na concentração do NO. A **figura 14** mostra os resultados obtidos para o óxido nítrico em mmol/mg de proteína no neocortex. Valores em porcentagem são apresentados no interior das barras. A concentração de 0,139 mmol/mg de proteína, de nitrito produzido (equivalente ao óxido nítrico produzido) no neocortex para os animais do grupo CAA foi considerada como 100% em relação às concentrações em mmol/mg de proteína, encontradas no neocortex dos outros grupos de animais.

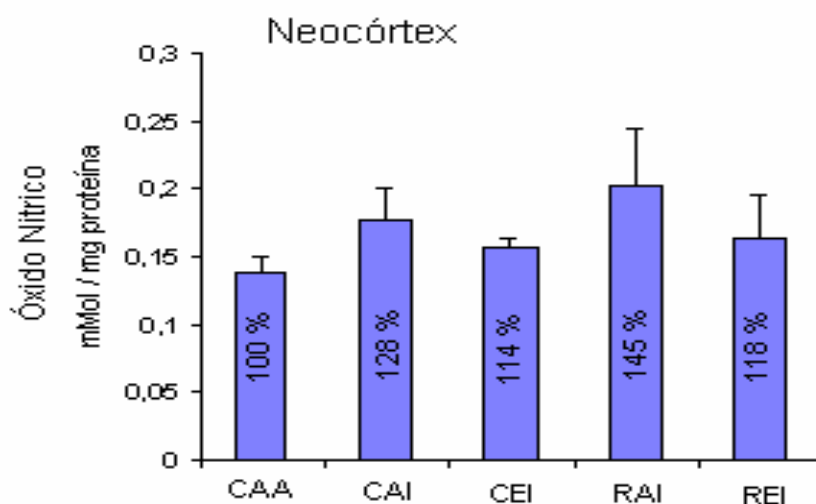


Figura 14 Média \pm erro padrão da concentração de óxido nítrico no neocortex em mmol/mg de proteína. Os valores em porcentagem estão apresentados no interior de cada barra para os animais dos 5 grupos experimentais: CAI= controle água idoso; CEI= controle etanol idoso; RAI= restrito água idoso, REI= restrito etanol idoso e CAA= controle água adulto.

Análises de correlação foram feitas entre os parâmetros comportamentais e os parâmetros serotoninérgicos avaliados no presente trabalho. As únicas correlações significativas encontradas foram: entre a taxa [5-HIAA]/5[HT], no núcleo dorsal da rafe, e o desempenho dos animais no 1º minuto do teste comprobatório ($r=-0.50$, $P=0.005$); e também, entre essa taxa e o índice de extinção ($r=0.64$, $P=0.0001$). Os gráficos de correlação estão apresentados abaixo, na **figura 15** (painéis **A** e **B**).

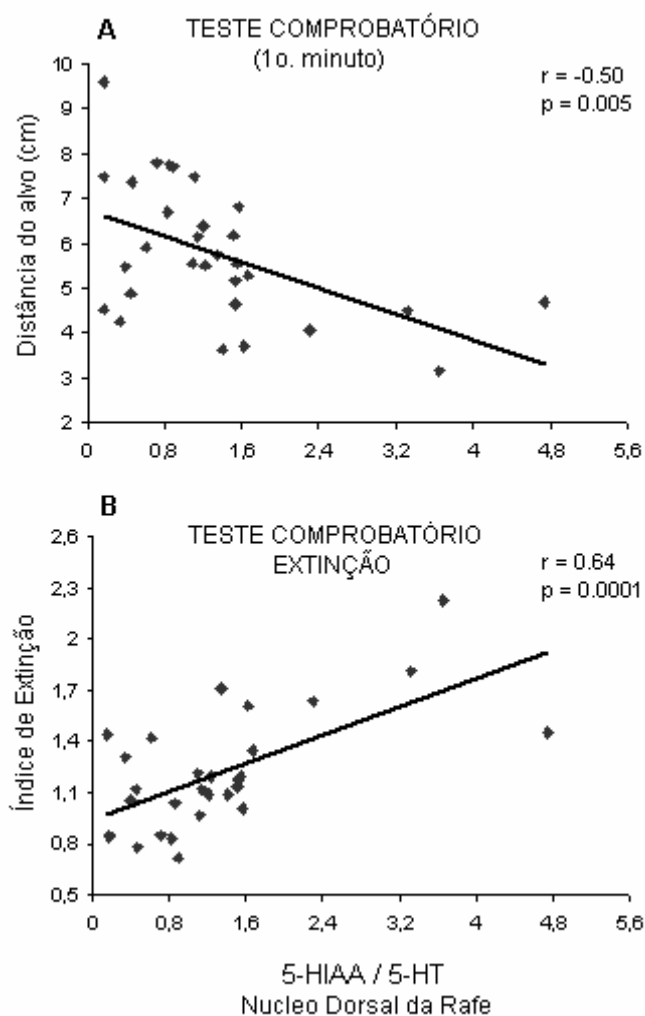


FIGURA 15

Correlação entre taxa de [5-HIAA]/[5-HT] e ambos, desempenho no 1º. Minuto do teste comprobatório (painel **A**) e índice de extinção (painel **B**)

1.5 DISCUSSÃO

O tratamento, consumo crônico com etanol, utilizado no presente trabalho com a finalidade de estudar seus efeitos quando administrado durante o processo de envelhecimento, está bem estabelecido no nosso laboratório (Fernandes e cols. 2002; Carvalho e cols. 2006; Pinto e cols. 2006; Pires e cols. 2005) e também por outros autores (Arendt e cols. 1989; Arendt, 1994; Cadete-Leite e cols. 1995; Casamenti e cols. 1993; Ciccia e Langlais, 2000). O modelo animal tratado com uma dieta restrita em caloria também foi utilizado estudo prévio por nosso grupo (Pinto e cols. 2006). Confirmando os dados obtidos nesses estudos, no presente trabalho, a restrição alimentar também provocou uma diminuição no ganho de peso. No entanto, é importante ressaltar que os animais restritos não estavam desnutridos uma vez que consumiram em média 15 g de ração por dia e esta é a quantidade mínima necessária para que um rato não entre em desnutrição (National Research Council (U.S.), 1995). Além disto, a concentração sanguínea de albumina não estava alterada de forma significativa nos grupos experimentais, confirmando que os animais não apresentavam características de um estado desnutrido. Verificou-se também uma diminuição no consumo de líquido pelos animais restritos em relação aos animais do grupo CAI (controle-água-idoso). Uma possível explicação é que os animais do grupo CAI, por ingerirem uma quantidade maior de ração, e esta sendo seca, consumiram mais água, em relação aos animais RAI (Pinto e cols. 2006). Houve também uma interação entre o consumo de etanol e a restrição alimentar, o que está de acordo com DiBattista e Joachim (1998), que descreveram aumento do consumo de etanol pelos animais em restrição em relação ao controle. Isto sugere que os ratos usavam o etanol para compensar a restrição calórica, à qual estavam sendo submetidos.

Os animais CEI consumiram menos líquido e ração em relação aos animais CAI, ao longo do tempo, mas não apresentaram diferença no ganho de peso, o que está de acordo com os estudos anteriores do nosso grupo (Carvalho e cols. 2006; Fernandes e cols. 2002; Pires e cols. 2001). Isto pode ser explicado pelo fato de que o etanol fornece calorias extras, produzindo com isto a saciedade (Strbak e cols. 1998). Este mecanismo, no entanto, não está bem estabelecido, não sendo explicado por alterações nos níveis hormonais (Strbak e cols. 1998).

Durante as sessões de aquisição no labirinto aquático de Morris, os animais de todos os grupos idosos aprenderam; no primeiro minuto do teste comprobatório, eles não apresentaram diferenças entre si, ou seja, nem o etanol e nem a restrição tiveram efeito significativo sobre o desempenho desses animais. Os animais que estavam consumindo etanol não tiveram déficits no aprendizado nem na memória de referência. Entretanto os animais idosos controles (CAI) apresentaram prejuízos nestes dois aspectos quando comparados aos animais do grupo adulto controle (CAA) o que está de acordo com resultados obtidos por outros autores (Topic e cols. 2005). Krazem e cols. (2003), verificaram que animais idosos consumindo etanol cronicamente não apresentaram déficits de memória e aprendizado no teste do labirinto radial, quando comparados aos seus controles adultos. Os dados da literatura a respeito do efeito do etanol sobre a aprendizagem e memória são controversos. Alguns autores mostraram que o consumo crônico de etanol leva a déficits na memória espacial de referência e de trabalho (Arendt e cols. 1989), enquanto outros descrevem prejuízos na memória espacial remota (Pereira e cols. 1998), mas não em memória recente (Pereira e cols. 1998; Pires e cols. 2005) e nem na memória de trabalho (Pereira e cols. 1998). Dados observados anteriormente pelo nosso grupo mostraram que nem a restrição calórica e nem o tratamento crônico com etanol, quando administrados por 21 dias a animais adultos, interferiram com o aprendizado ou com a memória

espacial de referência no teste do labirinto aquático (Pinto e cols. 2006). Wu e cols. (2002), descrevem uma melhora no aprendizado de animais com RA no labirinto de três braços, embora não tenha verificado diferenças de desempenho destes animais em testes de retenção quando comparados com os controles.

O desempenho dos animais idosos no teste comprobatório mostrou que todos os animais aprenderam através de dicas espaciais onde estava colocada a plataforma. Topic e cols. (2005), treinaram animais idosos no labirinto aquático e, posteriormente, dividiram os sujeitos em três grupos (inferior, intermediário e superior), tomando como base o desempenho nas sessões de aquisição. Verificaram que, no teste comprobatório, os animais do grupo superior tiveram um desempenho significativamente melhor do que os animais dos outros grupos e não apresentaram diferenças quando comparados aos animais adultos controle. Estes autores mostraram também que os animais idosos dos grupos inferior e intermediário tiveram mais dificuldade para extinguir o comportamento quando comparados aos animais dos grupos idosos superiores e adulto controle.

Extinguir um comportamento já aprendido e consolidado (uma memória) é natural e significa formar uma associação inibitória quando uma resposta aprendida não é mais recompensada ou reforçada (Bouton, 2002). Um organismo que extingue um comportamento está exibindo uma capacidade para mudar este comportamento numa situação em que as exigências ambientais mudaram (a isto chamamos flexibilidade). Desta forma, o animal persiste em um comportamento inicialmente aprendido, mas depois de certo número de tentativas fracassadas utilizando a estratégia já aprendida, deve ser capaz de ser flexível e adaptativo no planejamento de uma nova estratégia neste mesmo contexto. No caso do teste comprobatório no labirinto aquático, como o

animal não encontrou a plataforma onde esta costumava ficar, é de se esperar que ele, depois de certo tempo (no presente caso, durante o 2º min do teste comprobatório), se afaste do alvo e passe a procurá-la em outro local da piscina. A comparação dos índices de extinção dos grupos de animais idosos mostrou um efeito significativo do tratamento crônico com etanol. Isto significa que os animais idosos submetidos a esse tratamento apresentaram maior flexibilidade do que os animais tratados com água. Houve também um efeito significativo da idade: os animais do grupo adulto controle (CAA) apresentaram um índice médio de extinção significativamente superior ao apresentado pelos animais do grupo idoso controle (CAI). Topic e cols. (2005) também observaram que os animais adultos extinguem com mais facilidade do que os idosos. A simples inspeção da **figura 10** mostra que a ingestão crônica de etanol provocou uma reversão do efeito da idade sobre o índice de extinção: enquanto o grupo idoso controle (CAI) apresenta um índice médio significativamente menor que o do grupo adulto controle, a diferença desaparece quando a comparação é feita entre os grupos controle adulto (CAA) e controle idoso etanol (CEI). Não é a primeira vez que o etanol mostra um efeito benéfico em animais idosos. Krazem e cols. (2003), verificaram que animais idosos consumindo etanol cronicamente tiveram um desempenho significativamente melhor, em testes de recuperação de memória, do que animais idosos consumindo água. Esta melhora devida ao consumo de etanol não se verificou entre os animais adultos. Nosso grupo, em trabalhos anteriores, também não observou efeito do consumo crônico de etanol no desempenho de animais adultos em tarefas no labirinto aquático (Carvalho e cols. 2006; Pires e cols. 2005).

Os dados observados no teste da barra giratória mostraram que os animais idosos não apresentaram prejuízos motores. Também a velocidade média de nado durante as sessões de aquisição do labirinto aquático não foi significativamente diferente entre idosos e adultos

(dados não apresentados). Portanto, as diferenças observadas nos testes de memória e aprendizagem espaciais são devidas a déficits cognitivos apresentados pelos animais idosos e não devido a problemas motores.

É bem conhecido que as inervações serotoninérgica do córtex cerebral, incluindo o prosencéfalo límbico, têm origem nos núcleos da rafe (dorsal e mediano) e que estes sistemas estão envolvidos em vários aspectos comportamentais (Morgane e cols. 2005). No entanto, o papel desse sistema em aspectos do aprendizado e memória espacial não é conhecido. Nesse trabalho avaliamos parâmetros do sistema serotoninérgico com a finalidade de estudar seu envolvimento em aspectos específicos da função cognitiva.

A concentração de 5-HT em ng/g de tecido de neocórtex nos animais adultos, encontrada no presente trabalho, foi em torno de $412,0 \pm 99,96$; no tálamo $406,12 \pm 101,77$ e a taxa de $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ no NDR foi de $1,92 \pm 0,44$, sendo que, esses valores estão de acordo com a de outros autores (Kempf e Mandel, 1981; Mousseau e cols. 1996; Domínguez e cols. 2003). Da mesma forma, a concentração de 5-HIAA encontrada no neocórtex foi de $327 \pm 57,91$ e no tálamo $504,23 \pm 63,33$ o que também está de acordo com dados da literatura (Mousseau e cols. 1996). Esses dados indicam que o método utilizado, no presente estudo, para quantificar esses parâmetros foram adequados e sensíveis o suficiente para detectar eventuais alterações no nível de picogramas.

Observamos um efeito da idade na $[5\text{-HIAA}]$ no hipocampo e no NDR, sendo que a alteração no NDR refletiu no valor da taxa de renovação $[5\text{-HIAA}]/5\text{-[HT]}$, fato que não foi observado no hipocampo onde essa taxa permanece inalterada nos indivíduos idosos. Uma baixa na $[5\text{-HIAA}]$ pode ser devido aos seguintes fatores: a degradação e/ou a síntese de 5-HT podem estar alteradas. É interessante observar, que embora não seja uma alteração significativa a $[5\text{-HT}]$ no hipocampo diminui e essa

tendência não é observada no NDR. Essa diminuição tanto da [5-HT] quanto do [5-HIAA] no hipocampo, faz com que o valor da taxa de renovação não se altere, podendo representar uma baixa atividade do sistema serotoninérgico hipocampal e podendo também ser responsável pelo déficit cognitivo verificado nos animais idosos quando testados em tarefas espaciais que exigem a participação de sistemas neuroquímicos hipocampais. Nossos dados indicam uma tendência de aumento na concentração de 5-HT no NDR e, portanto, a diminuição observada na concentração do metabólito nessa região poderia: ou estar sendo compensada por um aumento na síntese de 5-HT ou pelo acúmulo de 5-HT devido a uma deficiência do sistema de degradação, o que faz com que o valor da taxa $[5-HIAA]/[5-HT]$ diminua de forma significativa. Steinbusch e cols. (1990), encontraram um padrão morfológico diferente entre o cérebro de animais idosos e jovens quando utilizaram técnicas de imunohistoquímica para serotonina. Herrera e cols. (1991), não encontraram diferença entre a taxa de síntese e renovação de serotonina no colículo superior de ratos idosos, enquanto Ponzio e cols. (1982) observaram diferença significativa na atividade da enzima responsável pela síntese de 5-HT, tirosina hidroxilase, no tronco encefálico de animais idosos. Outros dados da literatura também mostraram que a comparação da densidade e o padrão de distribuição das fibras serotoninérgicas de animais com 3 meses e idosos com 28 meses, apresentavam-se com padrão morfológico diferente no neocórtex e formação hipocampal dos animais em estudo (Davidoff e Lolova, 1991).

Observamos correlação significativa entre a taxa de renovação de serotonina no NDR e o desempenho dos animais no teste comprobatório (1º minuto e índice de extinção). A correlação negativa encontrada entre a distância percorrida pelos animais no primeiro minuto e a taxa, indica que os animais que tiveram um bom desempenho, ou seja, aprenderam onde estava inicialmente posicionada a plataforma tiveram uma distância percorrida menor e uma taxa de renovação de serotonina no

NDR maior. Ao passo que a correlação positiva, indica que os animais que tiveram o índice de extinção igual ou menor que 1, permaneceram mais tempo no quadrante alvo. Os animais com índice de extinção maior que 1, permaneceram próximo ao quadrante alvo no primeiro minuto e como não encontraram a plataforma foram flexíveis em procurar a plataforma em outro lugar. E como o índice de extinção é a razão do segundo minuto pelo primeiro, os animais que tiveram o índice de extinção maior que 1, obtiveram também um aumento proporcional na taxa de renovação da serotonina. Isto indica que a taxa de renovação da serotonina no NDR pode ter um papel importante na modulação de circuitos serotoninérgicos responsáveis pelo desempenho em tarefas que envolvem a utilização de estratégias espaciais. Sabe-se que o córtex e o hipocampo são afetados pelo envelhecimento e que essas estruturas têm um papel importante na memória (Arendt e cols. 1989; Pires e cols. 2005). Alguns autores já descreveram o efeito da idade, em roedores (Topic e cols. 2005) e humanos (De Luca e cols. 2003), com relação aos déficits no desempenho da memória e extinção de comportamento. Como, tanto a região cortical como o hipocampo são inervados por projeções que se originam no núcleo da rafe, podemos considerar a possibilidade de que uma modulação do sistema serotoninérgico seja parte importante dos componentes cognitivos responsáveis pelo aprendizado e memória espacial.

No entanto, deve-se destacar que o consumo crônico de etanol causou efeito significativo no índice de extinção e, no entanto, esse tratamento não alterou de forma significativa os parâmetros serotoninérgicos avaliados. Isso sugere um possível efeito do etanol em outros sistemas relacionados com a extinção de comportamento, como por exemplo, o sistema colinérgico. Em trabalhos anteriores (Carvalho e cols. 2006; Pires e cols. 2005) mostramos que o sistema colinérgico cortical e hipocampal têm papel importante nesse aspecto do comportamento, sendo que o sistema colinérgico hipocampal é afetado pelo consumo crônico de etanol.

As concentrações de 5-HT, 5-HIAA e a taxa de renovação de serotonina não foram significativamente alteradas pelo consumo crônico de etanol e nem pela restrição alimentar, nos ratos idosos, em nenhuma das regiões estudadas. No entanto, observamos um efeito do consumo crônico de etanol nos níveis de 5-HIAA em amostras de urina 24 h desses animais. Como esse tratamento não teve efeito nos sistemas serotoninérgicos das regiões centrais estudadas, essas alterações na urina podem estar refletindo efeito do consumo crônico de etanol em sistemas serotoninérgicos periféricos ou em outros sistemas centrais não estudados no presente trabalho. O valor médio da [5-HIAA] encontrado na urina de 162 ± 98 nmol/ 24horas, para os animais controles adultos, está de acordo com os verificados por Keung e cols. (2000). Essa diminuição nos níveis de 5-HIAA, causado pelo consumo crônico de etanol, está de acordo com os dados obtidos por outros autores (Davis e cols. 1967; Walsh, 1973; Walsh e Cummins, 1976).

Nem o envelhecimento, nem o consumo crônico de etanol e nem a restrição alimentar interferiram com a produção de óxido nítrico no cerebelo e no neocórtex. Siles e cols. (2002), também não encontraram diferença significativa nos níveis de NO (medido como nitrato e nitrito) no neocórtex e cerebelo de animais idosos. Como o NO tem um papel importante, como segundo mensageiro, em sistemas neuroquímicos centrais, pode ser que processos neurobiológicos de compensação evitaram que as condições acima pudessem afetar o sistema de produção desse neuromodulador. Como apresentado na **figura 14**, os animais idosos apresentaram uma tendência de um aumento na produção de NO no neocortex. Experimentos utilizando uma quantidade maior de amostras podem ser interessantes para confirmar se realmente os animais idosos são mais propensos ao aumento da produção de NO no cortex cerebral. Alguns autores sugerem que o etanol induz injúrias as quais são mediadas pela formação anormal de espécies de radicais livres (Muscoli e cols. 2002). Existem evidências de que o NO

desempenhe um papel no mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo etanol em diferentes áreas do SNC (Baraona e cols. 2002), incluindo o cerebelo (Xia e cols. 1999). Nós não encontramos diferença significativa na concentração de NO no cerebelo e nem no neocortex dos animais tratados com etanol o que está de acordo com outros autores (Ikeda e cols. 1999).

I.6 CONCLUINDO: os resultados da Parte I do presente trabalho indicam que, aspectos cognitivos relacionados com o aprendizado e a memória espacial são afetados pelo envelhecimento e que esses déficits não podem ser evitados por uma dieta restrita em 50% de calorias. Essas alterações comportamentais causadas pelo envelhecimento não foram exacerbadas pelo consumo crônico de etanol, pelo contrário, o etanol reverteu o efeito do envelhecimento sobre a extinção de um comportamento que envolve a utilização de componentes espaciais. Além disso, os dados apresentados indicam que o sistema serotoninérgico parece ter um importante papel como substrato biológico do aprendizado, extinção de um comportamento, e da memória espacial.

Anexo: copia do artigo publicado com parte dos dados obtidos na Parte I (anexo I).

II PARTE II:

NEUROTOXIDADE CAUSADA POR ESTRESSE OXIDATIVO E ALTA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMATO. EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURONIOS CORTICAIS.

II.1 INTRODUÇÃO

MECANISMOS DE MORTE CELULAR

NEURODEGENERAÇÃO: APOPTOSE E NECROSE

Os diversos fatores que produzem (fatores ambientais e/ou genéticos) e estão associados (p.ex. placas senis, degeneração grânulo-vacuolar e acúmulo de material intracelular fibrilar insolúvel) com a neurodegeneração provocam distúrbios na fisiologia celular, através de diferentes mecanismos, que culminam na morte celular (*para revisão*: Ribeiro (2006)).

A morte celular é um processo biológico fundamental que é relevante na histogênese normal, para a regulação de condições cinéticas em tecidos adultos normais, na patogênese de injúrias em tecidos e nas doenças (Kerr, 1971; Mergner e cols. 1990; Kerr e cols. 1995). O conceito de morte celular foi inicialmente relacionado às patologias (Virchow e Chance, 1860) mas, atualmente sabe-se que a morte das células tem importância fisiológica e ou patológica. A morte celular normal, fisiológica, ou morte celular programada, também chamada de apoptose ocorre continuamente em populações de células que sofrem pouca proliferação (células do fígado, glândula adrenal) ou rápida proliferação (epitélio das cristas intestinais), (Wyllie e cols. 1980; Bursch e cols. 1990). A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas como, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, vacúolos

citoplasmáticos, membranas com vacúolos e encolhimento ou contração celular e, também por uma alteração bioquímica característica que é a fragmentação do DNA (Tsukane e Yamauchi, 2006). A apoptose também é observada em condições de estresse como no caso de deficiência de fatores neurotróficos (Greene, 1978) ou exposição a neurotoxinas, incluindo alta concentração de glutamato (Kure e cols. 1991; Kajta e cols. 2007).

A apoptose também desempenha um importante papel no crescimento normal da diferenciação de órgãos e sistemas, em vertebrados e invertebrados. Por exemplo, durante o desenvolvimento do sistema nervoso um grande número de neurônios (em torno de 50%) sensoriais e motores da medula espinhal sofrem apoptose, (Hamburger e Levimontalcini, 1949; Hamburger, 1975). Esse fenômeno é também responsável por parear as populações de células neuronais pelo tamanho. Este processo é controlado pela limitação no fornecimento de fatores tróficos derivados de células alvos (Oppenheim, 1991) e também por estímulos aferentes (Clarke e Egloff, 1988; Linden, 1994).

Outras formas de morte celular como as patológicas e acidentais, podem resultar de insultos tóxicos, hipóxico-isquêmicos e térmicos (Wyllie e cols. 1980; Mergner e cols. 1990; Kerr e Harmon, 1991). A importância da morte celular em doenças humanas tem sido estudada sob a perspectiva do desenvolvimento biológico, imunológico, endocrinológico, patológico e neurobiológico. Cada grupo pode ter uma condição diferente na classificação da morte celular, nos seus mecanismos e na importância biológica. O processo de morte celular por necrose envolve ruptura da estrutura e integridade da membrana celular, rápido influxo de Ca^{+2} e água e, subsequentemente lise e dissolução da célula. No entanto, a necrose celular é induzida não por um estímulo intrínseco da própria célula (como na apoptose) mas sim por uma abrupta perturbação ambiental das condições fisiológicas da célula (Martin e cols. 1998).

Alterações celulares e fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento parecem ter efeitos pronunciados sobre doenças neurodegenerativas. O envelhecimento normal do cérebro é caracterizado macroscopicamente por mudanças incluindo uma diminuição no peso e no volume, e alterações microscópicas, tais como: as vasculares, permeabilidade da barreira hemato-encefálica, modificações no compartimento extracelular, e alterações em ambas as células gliais e neuronais (Shah e Mooradian, 1997; Scahill e cols. 2003). As células da glia mostram fenótipos ativados e reativos com alterações morfológicas e metabólicas e, em alguns casos também se verifica um aumento no número das células (Amenta e cols. 1998; Peinado, 1998; Unger, 1998). As células neuronais tipicamente acumulam no seu interior macromoléculas tais como a lipofuscina, as quais no envelhecimento, junto com o estresse oxidativo, induzem declínio na neurotransmissão e uma perda progressiva da função neuronal (Floyd e Hensley, 2002; Finch, 2003). Essas mudanças influenciam na susceptibilidade celular podendo explicar de alguma forma porque a idade é o principal fator de risco para as doenças neurodegenerativas (Wang e cols. 2003; Woo e cols. 1992; Nakayama e cols. 1994; Brown e cols. 2003; Bruns, Jr. e Hauser, 2003).

MORTE CELULAR INDUZIDA POR: EXCITOTOXIDADE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Morte Neuronal Induzida Por Altas Concentrações de Glutamato

A neurotransmissão glutamatérgica é altamente regulada devido à possível ação excitotóxica do glutamato. Uma baixa concentração extracelular deste neurotransmissor (1-3 μM) é mantida através de transportadores específicos acoplados ao gradiente eletroquímico gerado pelo sódio através da Na^+/K^+ ATPase (Danbolt, 2001; Huang e Bergles, 2004). Os níveis de glutamato em culturas celulares controles de cerebelo, determinados por HPLC, foram de 0,83 μM (Estrada-Sánchez e

cols. 2007) e de 0,147 μM em cultura primária de córtex de rato (Antonelli e cols. 2006).

Em experimentos utilizando neurônios cerebrais corticais de embrião de rato, os pesquisadores usaram duas condições: culturas com uma baixa densidade ou com uma alta densidade de astrócitos. As culturas então foram expostas a concentração de 4 μM de glutamato durante 30 minutos, seguidas de incubação em meio normal de cultura por 20-24 horas, sendo esta concentração o suficiente para matar 50% dos neurônios, dentro de 24 horas, nas culturas pobres em astrócitos. Enquanto uma concentração de 205 μM de glutamato foi requerida para matar a mesma percentagem de neurônios na cultura rica em astrócitos. Quando a captação de glutamato é bloqueada pela remoção de sódio, as culturas ricas em astrócitos se tornam mais sensíveis ao glutamato em relação às culturas pobres em astrócitos. O sistema de transporte envolvido no potencial neurotóxico do glutamato ainda não é bem entendido (Rosenberg e cols. 1992). Em um outro estudo, Frandsen e Schousboe (1990) mostraram que, quando a captação de glutamato é bloqueada com s-aspartato-hidromato, baixa concentração de glutamato, como 1 μM , é suficiente para matar 50% de neurônios corticais em cultura. Tanaka (1997), utilizando camundongos sem o transportador de glutamato (GLUT) observaram que, os camundongos desenvolveram epilepsia e neurodegeneração.

A falha no transporte de glutamato leva ao aumento da concentração de glutamato extracelular e a morte neuronal por excitotoxicidade e, tem-se sugerido que esse mecanismo desempenha um papel na neurodegeneração associada com isquemia cerebral, hipoglicemia e algumas doenças neurodegenerativas (Bittigau e Ikonomidou, 1997; Maragakis e Rothstein, 2004). No entanto, as etapas moleculares que levam à morte de neurônios ainda não está totalmente compreendida.

O uso de modelos animais de neurodegeneração e cultura primária de diferentes tipos celulares são importantes para esclarecer mecanismos de morte neuronal que acontece, no cérebro humano e na medula espinhal, em situações de processos agudos, como na isquemia focal, isquemia global e trauma. Esses modelos têm sido também importantes para a compreensão do processo de perda celular que acontece durante os processos crônicos, como nos processos neurodegenerativos progressivos, no caso do envelhecimento cerebral, da atrofia muscular espinhal, esclerose amiotrófica lateral e DA (Ito e cols. 1975; Pulsinelli e cols. 1982; Kirino, 1982; Martin e cols. 1997).

Um mecanismo comum que as células neuronais sofrem devido a injúrias agudas é desencadeado pela excitotoxicidade (Dirnagl e cols. 1999; Doble, 1999; Mattson, 2003; Inoue e Okada, 2007), um fenômeno que se desencadeia quando há um excesso na ativação de receptores de glutamato, os quais levam a uma série de processos intracelulares induzindo a morte neuronal (Olney, 1969; Mattson, 2003). De todos os tipos de receptores para o glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDA) é considerado o principal responsável por esses processos, devido ao aumento da permeabilidade ao cálcio, o que permite a mobilização desse íon para compartimentos intracelulares (Mody e MacDonald, 1995). Portanto, um aumento na ativação do receptor NMDA por aplicação de agonistas exógenos tem sido largamente usado como modelo de injúrias experimentais cerebrais em diferentes faixas etárias: fases pós-natal (Acarin e cols. 2001), adulta (Dietrich e cols. 1992; Kollegger e cols. 1993; Stewart e cols. 1986) e idosa (Suzuki e cols. 2003).

Morte Celular Induzida Por Espécies Reativas de Oxigênio

Evidências experimentais indicam que os metabólitos reativos do oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS= *reactive oxygen species*), como por exemplo, o superóxido (O_2^-), o radical

hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são importantes mediadores de danos em diversos tecidos e órgãos (Zhu e cols. 2005; Sohal e Weindruch, 1996). Essas espécies podem ser geradas no citoplasma, núcleo das células e nas mitocôndrias. A concentração intracelular de radicais livres pode ser aumentada pela maior geração desses radicais ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. Existem evidências de que no envelhecimento, além de ocorrer um aumento na produção de formas oxidantes, observa-se também uma diminuição significativa no poder redutor das células, o que leva a um desequilíbrio metabólico (Chaves e cols. 1998; Williams e Chung, 2006). Existem evidências de que os radicais livres parecem estar envolvidos com várias doenças cerebrais neurodegenerativas, incluindo Doença de Parkinson, doença do neurônio motor e Doença de Alzheimer (Beal, 1995; Williams, 1995; Liu e cols. 2007).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio, devido ao estresse oxidativo, é um fator essencial associado à morte celular uma vez que as ROSs podem facilmente reagir e oxidar componentes celulares vitais tais como, lipídios, proteínas e DNA (Gorman e cols. 1996; Sanz e cols. 2006). O cérebro é particularmente susceptível ao efeito das ROSs devido a seu alto consumo de oxigênio, abundante quantidade de lipídios e modestas defesas antioxidantes em relação a outros órgãos (Halliwell, 1992; Aschner e cols. 2007). Essas características são ainda somadas a presença de altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, os quais são facilmente oxidados e conhecidos gerar radicais de oxigênio que causam injúrias (Rice-Evans e Burdon, 1993).

Estudos têm mostrado ainda, como uma questão incerta, que entre outros mecanismos, a apoptose pode contribuir para a morte neuronal na DA. A DA está relacionada com o estresse oxidativo e com a peroxidação de lipídeos (Shimohama, 2000; Butterfield e cols. 2002). Evidências indicam que a peroxidação de lipídios é diretamente responsável pela geração de fenótipos apoptóticos (Kagan e cols.

2000). Muitos agentes induzem a apoptose, pois, são estimuladores do metabolismo oxidativo celular (Hockenbery e cols. 1993) e, muitos inibidores de apoptose tem atividades antioxidantes ou aumentam as defesas antioxidantes (Park e cols. 2000). A Acetil-L-carnitina está presente no cérebro em altas concentrações, sendo envolvida com a produção da acetilcolina (Dolezal e Tucek, 1981). Tem sido mostrado que a Acetil-L-carnitina aumenta a função mitocondrial e reverte o efeito da idade (Hagen e cols. 1998; Abdul e Butterfield, 2007). O ácido α -lipóico é um cofator essencial para as reações das desidrogenases mitocondrial, funcionando como um antioxidante e também reduzindo o estresse oxidativo em animais idosos (Poon e cols. 2005).

DEGRADAÇÃO E AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS

Muitas das características histológicas da Doença de Alzheimer e da Doença de Parkinson são também encontradas, em menor proporção, no envelhecimento "normal" e, o perfil das alterações de sistemas neurotransmissores nestas doenças parece representar um aumento daquele encontrado no envelhecimento (Hardy e Allsop, 1991; Sabbagh e cols. 2006).

Disfunções em processos celulares de agregação e degradação de proteínas podem resultar no acúmulo de depósitos insolúveis dessas moléculas, como acontece no envelhecimento e em várias doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento (Stoppini e cols. 2004). A agregação de proteínas parece desempenhar um papel importante na patogênese de doenças neurodegenerativas como DA, Encefalopatia espongiiforme, Doença de Parkinson, Demência Fronto temporal, Demência de Corpos de Lewy e Doença de Huntington (Gutekunst e cols. 1999).

Todas essas doenças possuem uma característica neuropatológica comum que é a presença, no sistema nervoso central, de complexos

fibrilares insolúveis intra e ou extracelulares. Esse grupo de doenças inclui várias patologias relacionadas com o envelhecimento, como as taupatias (DA e Doença Pick), as sinucleinopatias (Doença Parkinson, Demência de Corpos de Lewy) e doenças da poliglutamina (Doença Huntington e várias ataxias espinocerebelares), (de Pril e cols. 2006; Robert e Mathuranath, 2007). As placas senis constituídas essencialmente do peptídeo β -amilóide (β -A) estão relacionadas com alterações descritas em vários processos neurodegenerativos, como por exemplo: envelhecimento normal (Caccamo e cols. 2005; Cullen e cols. 2006), Doença de Alzheimer (Gotz e cols. 2004; Iwata e cols. 2005), Doença de Parkinson (Mann e Jones, 1990; Kurosinski e cols. 2002) e Demência dos Corpos de Lewy (Barrachina e cols. 2005).

De acordo com a "hipótese da cascata amilóide" (Hardy e Higgins, 1992; Hardy, 2006), o desenvolvimento das placas senis, que são complexos moleculares extracelulares, parece preceder e precipitar a formação de aglomerados protéicos fibrilares intracelulares, denominados emaranhados neurofibrilares. Esses emaranhados neurofibrilares intracelulares, contendo filamentos helicoidais pareados (*paired helical filaments*, PHFs) são constituídos de proteína *tau* anormal e hiperfosforilada (Kosik e Shimura, 2005). Esses componentes estão relacionados com alterações descritas, no envelhecimento "normal" e na DA. Todas as doenças com alterações na proteína *tau*, são denominadas taupatias, caracterizadas pela presença de inclusões neuropatológicas fibrilares constituídas de proteínas *tau* hiperfosforilada e com fosforilações alteradas (Guillozet-Bongaarts e cols. 2005). Essas evidências sobre alterações no nível de fosforilação da proteína *tau* levaram a uma hipótese sobre a existência de um desequilíbrio das proteínas cinases e fosfatases que regulam sítios de fosforilação da *tau*. Wang e cols. (2007), sugeriram que a ativação da proteína fosfatase-2A (PP-2A) ou a inibição de uma ou ambas GSK-3 β (*glycogen synthase kinase, 3*) e cdk5 (proteína cinase dependente de ciclina 5) ou destas duas cinases, incluindo também, PKA e CaMKII, podem ser requeridas para inibir a degeneração neurofibrilar (emaranhados neurofibrilares).

Uma consequência significativa da hiperfosforilação da proteína *tau* é a redução na sua habilidade para interagir com os microtúbulos, o que altera de forma significativa, componentes estruturais do citoesqueleto com conseqüente rompimento de importantes funções celulares, como por exemplo, o transporte axonal e o processo da neurotransmissão (Lee e cols. 2004).

Enquanto as placas senis consistem principalmente de peptídeos β -A, os enovelamentos neurofibrilares consistem basicamente de uma forma hiperfosforilada anormal, insolúvel, da proteína *tau* (Binder e cols. 2005). Dados da literatura indicam que ambas as lesões neuropatológicas, extra e intra celulares, respectivamente, exercem efeitos neurotóxicos diretos e indiretos e promovem a morte neuronal por estresse oxidativo (Praticò, 2002) e ou por inflamação (Hoozemans e cols. 2005). À medida que as pesquisas sobre os mecanismos do processo de neurodegeneração evoluem, torna-se cada vez mais aparente o envolvimento de uma rede intrínseca de vias de sinalização, uma variedade de mecanismos de morte celular e um crescente conhecimento nessa área de mecanismos proteolíticos mediando apoptose e ou necrose. No entanto, apesar de todos esses avanços, o conhecimento da seqüência de todas as etapas responsáveis pela morte neuronal, relacionadas ao envelhecimento cerebral, continuam obscuros.

COMPONENTES DO SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

Os aminoácidos neurotransmissores podem ser divididos em duas grandes categorias: inibitórios e excitatórios. O glutamato pertence à segunda categoria. Aproximadamente 90% das sinapses do SNC de mamíferos utilizam aa, sendo o glutamato o principal aa que medeia respostas sinápticas excitatórias rápidas no SNC de mamíferos, onde se apresenta distribuído de maneira ampla e uniforme (Salinska e Stafiej, 2003). O glutamato participa de vários processos fisiológicos no sistema

nervoso como, neurodesenvolvimento, migração celular e neurogênese (Zecevic, 2004; Mcgee e Bredt, 2003).

O glutamato está presente em dois reservatórios no terminal nervoso: citoplasmático e vesicular. Para armazenamento e posterior liberação é preciso que haja transferência do glutamato citoplasmático para as vesículas sinápticas. Os transportadores que captam o glutamato para dentro da vesícula sináptica são os transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3) que compartilham entre si 70% de homologia estrutural (Fremeau e cols. 2002). A atividade desses transportadores é dependente de um gradiente eletroquímico de prótons gerado por uma ATPase (adenosina trifosfatase) que está na membrana da vesícula, a H⁺ATPase vesicular, que torna ácido o interior da vesícula (Reimer e cols. 2001). Desta maneira, a captação de glutamato, que possui carga líquida negativa, ocorre em função do potencial de membrana. Os VGLUTs transportam glutamato com uma afinidade de 100 a 1000 vezes menor do que os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) (ver abaixo) possuindo um $K_m \sim 1$ mM para o glutamato e, diferentemente dos EAATs, os VGLUTs exibem uma especificidade ao glutamato e parecem não transportar aspartato (Shigeri e cols. 2004). Os subtipos de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) são expressos em diferentes tecidos cerebrais. O VGLUT1 (o mais abundante) e VGLUT2 estão presentes em sinapses glutamatérgicas no telencéfalo e diencéfalo/tronco encefálico, respectivamente. O VGLUT3 é expresso por neurônios que liberam outros neurotransmissores como acetilcolina, serotonina e ácido gama-aminobutírico (GABA) (Shigeri e cols. 2004).

Após a captação e armazenamento do neurotransmissor, a vesícula sináptica poderá, com a chegada de um potencial de ação, se fundir à membrana plasmática pré-sináptica liberando seu conteúdo na fenda sináptica. Essa liberação, chamada exocitose, é um mecanismo

dependente do aumento intracelular do íon cálcio (Ca^{2+}) gerado tanto pela abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem da membrana plasmática, quanto pela abertura de canais presentes na membrana de organelas intracelulares, com liberação de cálcio desses estoques intracelulares. Apesar da exocitose dependente de cálcio ser o principal mecanismo pelo qual o glutamato é liberado, já foi descritos outros tipos de mecanismos de liberação de glutamato. Tais mecanismos são não-vesiculares e independentes de cálcio, e correspondem a uma reversão dos transportadores de glutamato (Rossi e cols. 2000) e troca do glutamato por outros aminoácidos como aspartato e cistina (Erecinska e Silver, 1990).

Os receptores de glutamato são encontrados nas membranas de ambas as células, neuronais e gliais. Os receptores ionotrópicos de glutamato permitem diretamente o influxo de cátions para dentro das células pós-sinápticas, levando à despolarização de membranas. Por outro lado, os receptores metabotrópicos de glutamato agem através de segundos mensageiros (Walton e Dodd, 2006).

Os receptores ionotrópicos são tetrâmeros ou pentâmeros constituindo canais iônicos permeáveis a cátions. A permeabilidade relativa do receptor ao cátion varia em função do tipo de subunidade presente no receptor (Hollmann e cols. 1993). Existem três famílias de receptores ionotrópicos classificados com base em seus agonistas preferenciais: i) N-metil-D-aspartato (NMDARs): receptores compostos pelas subunidades NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D e NR3A. Esses receptores medeiam o influxo dos íons sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) e possuem cinética lenta, o que permite um grande influxo de Ca^{2+} para dentro da célula e ativação de vários componentes de vias de tradução de sinal (Lerea e cols. 1995). Os receptores NMDA possuem cinco domínios principais e são modulados por vários agentes como glicina, histamina, íon magnésio (Mg^{2+}), íon zinco (Zn^{2+}), além de drogas bloqueadoras como MK-801, ketamina e fenciclidina (Dodd e cols. 2000). Os receptores NMDA possuem uma

distribuição heterogênea por todo o SNC atingindo sua maior densidade na região CA3 do hipocampo (Petralia e cols. 1994); ii) α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA): composta pelos receptores GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4; iii) cainato (KARs) receptores GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. Os receptores AMPA/KA são permeáveis aos íons Ca^{2+} e Na^+ e possuem cinética rápida (Hollmann e Heinemann, 1994).

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são produtos de oito genes e foram classificados em três famílias com base na seqüência de aminoácidos. Os receptores da família I (mGluR1 e mGluR5) têm localização principalmente pós-sináptica, enquanto que os receptores das famílias II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR7 e mGluR8) estão localizados principalmente em terminais de axônios. O mGluR6 pertence à família III e é estritamente expresso na retina (Fagni e cols. 2004). Os receptores da família I estão acoplados à proteína do tipo Gq e estimulam a fosfolipase C, enquanto que os receptores das famílias II e III estão acoplados à proteínas G dos subtipos Gi e Go e inibem a adenilato ciclase (Salinska e Stafiej, 2003). Os mGluRs também podem controlar vários canais iônicos, como os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) dos subtipos L, N e P/Q (Perroy e cols. 2001).

A ligação do glutamato nos receptores e sua conseqüente ativação precisam ser em algum momento, encerrada. O estímulo precisa ser bloqueado para que o terminal sináptico se torne sensível a um próximo estímulo e para manter a concentração extracelular de glutamato abaixo dos níveis excitotóxicos. O término da atividade glutamatérgica depende de uma rápida remoção do glutamato da fenda sináptica pelo mecanismo de captação mediada pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Esse processo é de fundamental importância para a neurotransmissão glutamatérgica, pois o glutamato não é metabolizado por enzimas na fenda sináptica (O'Shea, 2002).

Em 1992, os genes que codificam três EAATs foram identificados em ratos e os transportadores designados como GLAST, GLT-1 e EAAC1 (Kanai e Hediger, 1992; Pines e cols. 1992). O GLAST e o GLT-1 são expressos em células gliais e o EAAC1 em neurônios. Em 1994, três transportadores de glutamato em humanos, EAAT1, EAAT2 e EAAT3 correspondendo respectivamente, aos transportadores GLAST, GLT-1 e EAAC1, foram identificados (Arriza e cols. 1994). Subseqüentemente, dois subtipos adicionais em mamíferos foram identificados: EAAT4, abundante nas células cerebelares de Purkinje e EAAT5, expresso na retina (Arriza e cols. 1997; Fairman e cols. 1995). Portanto, até o presente momento, cinco transportadores de glutamato de alta afinidade ($K_m \sim 4-40 \mu M$) foram clonados. Com relação à distribuição desses transportadores em neurônios e células gliais, entretanto, ainda existem controvérsias (Gadea e Lopez-Colome, 2001).

Os transportadores de glutamato são totalmente dependentes de Na^+ extracelular e íon potássio (K^+) intracelular. Eles efetuam uma translocação de 3 Na^+ , 1 H^+ e um glutamato (carregado negativamente) e, simultaneamente realizam um co-transporte de 1 K^+ para o exterior. Um mecanismo alternativo seria o co-transporte de 2 Na^+ e 1 glutamato e o efluxo de 1 K^+ e 1 OH^- (ou 1 ânion bicarbonato, HCO_3^-) (Gegelashvili e Schousboe, 1998).

A expressão dos EAATs na membrana plasmática tanto de neurônios quanto de células gliais é regulada por uma variedade de proteínas cinases, fatores de crescimento e segundos mensageiros. Desta forma, a concentração de EAATs na membrana pode aumentar ou diminuir dentro de minutos, independentemente de mecanismos de transcrição e tradução. Isso sugere que os EAATs estão sob um refinado controle de diferentes vias de tradução de sinal (Robinson, 2002).

O glutamato pode ser captado pelos EAATs presentes no terminal pré-sináptico ou nas células gliais. O glutamato captado pela glia poderá ser convertido em glutamina ou em α -cetoglutarato, enquanto que o glutamato captado pelos neurônios poderá ser convertido em α -cetoglutarato ou ser transportado para o interior de vesículas sinápticas como visto anteriormente (Martinez-Hernandez e cols. 1997). O α -cetoglutarato, gerado pela enzima glutamato desidrogenase ou por transaminases, será metabolizado pelo ciclo do ácido cítrico e utilizado como fonte de energia. A glutamina gerada pela ação da enzima glutamina sintetase (GS) nas células gliais é transportada para o meio extracelular pelos transportadores SN1 LAT2, ASCT2 (Deitmer e cols. 2003) e captada pelos neurônios pelos transportadores GLnT e SAT2 (Reimer e cols. 2001). A glutamina captada pelos neurônios poderá servir como fonte energética ou ser convertida novamente em glutamato para ser utilizada como neurotransmissor (Laake e cols. 1995) reiniciando mais uma vez o ciclo.

GLUTAMATO E ENOVELAMENTO NEUROFIBRILARES

No cérebro a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) é essencial para manter a homeostase do glutamato. Uma alteração na regulação do ciclo do glutamato-glutamina leva a distúrbios no padrão do sono, comportamento, humor bem como amnésia e confusão, sendo todos esses sintomas verificados na DA. A origem da expressão atípica da GS na DA não é bem conhecida. As placas neuríticas são constituídas de quantidades abundantes de peptídeo β -amilóide e ferro, e os dois ou cada um deles pode levar a inativação da GS. Uma diminuição na ação da GS originária de terminações vasculares pode contribuir para a toxicidade regional dos neurópilos, enquanto uma redução generalizada da proteína GS pode causar um acúmulo de glutamato devido a reversão de captação do glutamato. A redução e ou a alteração na distribuição da GS na DA pode levar a níveis anormais de glutamato, glutamina e amônio. Por outro lado, uma redução na captação de glutamato pode

levar a uma diminuição na regulação da GS. Alternativamente, um aumento na expressão da GS, via β -amilóide ou astrocitose, pode levar a falhas no mecanismo da neuroproteção. A expressão neuronal da GS pode ser um meio para neutralizar a baixa da GS de origem astrocitária, no entanto, os determinantes de sua localização e regulação sob condições patológicas são pobremente entendidos (Walton e Dodd, 2006).

Estudos, em pacientes com DA, usando técnicas auto-radiográficas com ligações no receptor $[3H]$ AMPA em áreas do hipocampo vulneráveis a formação dos NFTs e perda neuronal leva a resultados divergentes (Dewar e cols. 1991; Geddes e cols. 1992). Deste que a composição das subunidades do receptor é mediada pela permeabilidade a íons, são necessários estudos que diferenciem entre as subunidades do receptor AMPA. Técnicas bioquímicas, moleculares e imunológicas têm mostrado baixos níveis de GluR1 e do GLUR2 no hipocampo de pacientes com AD em relação a indivíduos controles (Armstrong e Ikonovic, 1996a; Aronica e cols. 1998). A exaustão de GluR2 ocorre em áreas vulneráveis à formação dos enovelados neurofibrilares, o qual antecede a presença severa de neuropatologias, sugerindo que a perda do GluR2 do complexo receptor AMPA pode influenciar na susceptibilidade para a neurotoxicidade mediada pelo Ca^{2+} . A densidade de subunidades do receptor AMPA correlaciona-se com a severidade da doença. Regiões suscetíveis do hipocampo mostram uma total redução na imunoreatividade do GluR2 em casos moderados de DA (estágios III-IV), sem alterações no GluR1 (Carter e cols., 2004). Dados imunocitoquímicos mostram que a redução nos níveis de receptores GluR correlaciona com perda neuronal, uma vez que neurônios remanescentes exibem um aumento na intensidade de coloração dos receptores GluR2 (Ikonovic e cols. 1995). Armstrong e Ikonovic (1996b), sugeriram que o papel do receptor GluR2 no hipocampo esteja relacionado com a plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal seguida por danos excitotóxicos. Tudo isto leva à hipótese de que reduções no

GluR2 estejam envolvidas na cascata de morte neuronal na DA no hipocampo, e que um aumento nos receptores GluR2 em resposta ao elevado nível de Ca^{2+} confere um efeito protetor favorável. A **figura 16** abaixo mostra um panorama geral da disfunção sináptica glutamatérgica proposta por Walton e Dood (2006), nem todos os mecanismos estão representados. O Glutamato é liberado das vesículas celulares na fenda pré-sináptica ativando assim os receptores pós-sinápticos NMDA, AMPA, mGluR. O Glutamato é removido da fenda sináptica pelos transportadores EAAT1 e EAAT2 situados em astrócitos peri-sinápticos. Dentro dos astrócitos, a enzima GS converte o glutamato em uma forma não reativa, que é a glutamina usando ATP. De acordo com os autores, as placas senis, constituídas pelo peptídeo βA , ativam transportadores glutamatérgicos presentes nos astrócitos. A glutamina produzida nos astrócitos retorna para a fenda sináptica e é captada pelos transportadores para dentro da célula pré-sináptica, onde pela ação da glutaminase é convertida em glutamato. Isso provoca um aumento da atividade glutamatérgica. O glutamato é empacotado nas vesículas sinápticas por transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs). A excitotoxicidade e a neurodegeneração podem ser uma consequência da alteração na regulação dos componentes do ciclo glutamato-glutamina. O aumento na concentração do cálcio (Ca^{2+}) pela ativação e abertura dos receptores NMDA os quais não contêm a subunidade GluR2, pode levar a célula à morte por necrose e/ou apoptose. A ativação dos receptores do grupo I do mGluR pode alterar a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, exacerbando desse modo a ativação pós-sináptica levando a morte celular. A ativação excessiva de NMDARs pode causar a dissociação da proteína fosfatase-2A (PP-2A), que resulta em uma alteração na fosforilação da *tau* levando à formação dos PHFs. A inativação do EAAT1, de EAAT2, ou da GS aumenta a concentração do glutamato na fenda, causando um aumento de excitabilidade.

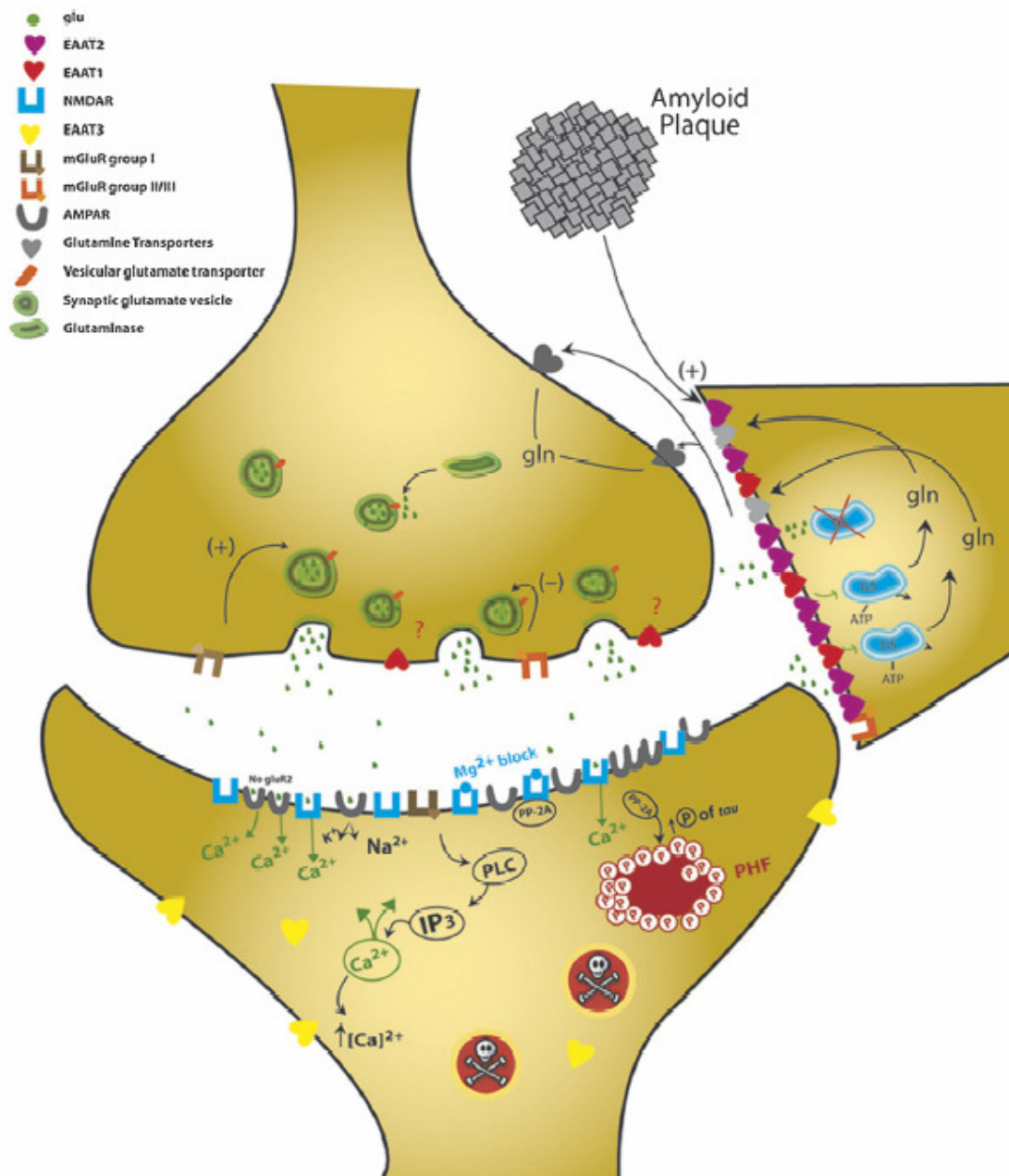


Figura 16 Esquema de um terminal glutamatérgico indicando alguns dos componentes envolvidos com a morte celular conforme proposto por Walton e Dodd (2006).

GLUTAMATO E SISTEMA DE TRADUÇÃO DE SINAIS

Os ciclos de fosforilação e defosforilação regulam virtualmente todos os aspectos de processos celulares em células eucariotas. As proteínas fosfatases foram consideradas como tendo um efeito no padrão de reversão das cinases. Mas o nível de fosforilação de uma determinada proteína pode ser modulado tanto por uma cinase quanto por uma fosfatase, fazendo com que os dois tipos de enzimas sejam igualmente importantes na regulação celular (Dombrádi, 2002).

Os NFTs que contêm os filamentos helicoidais pareados (PHFs), é o principal elemento que altera a forma dos microtúbulos associados a proteína *tau*. Alterações na fosforilação pela inativação da proteína fosfatase-2A (PP-2A) parece ser um contribuinte importante para a formação anormal da *tau* (Delacourte, 2005).

As MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) desempenham um importante papel nos sistemas de tradução de sinal de células eucariotas, uma vez que elas modulam muitos eventos celulares. A super família das MAPKs inclui as cinases ERKs (*extracellular signal-regulate protein kinase*) também conhecidas como p44/p42, MAPK3 e MAPK1, p38 (*stress-activated protein kinase*) e JNKs (*c-Jun N-terminal protein kinase*) as quais são encontradas em três interconexões na cascata de tradução de sinais. Essas cinases fosforiladas e assim ativadas, transcrevem fatores de transcrição em resposta a mitógenos, fatores de crescimento ou a varias formas de estresse. ERK, JNK e a p38, quando ativadas pela MAPKs, reconhecem as MEKs, sofrendo fosforilação nos resíduos de treonina e tirosina na seqüência pTXpY. Assim ambas treonina e tirosina são necessárias para máxima ativação da ERK, JNK e a p38. As vias destas cinases são ativadas por luz ultravioleta, citocinas, agentes de choque osmótico (sorbitol,

anisomicina), fatores de crescimento e estresse celular (Seger e Krebs, 1995; Cano e Mahadevan, 1995).

Bi e cols. (2000), demonstram que o estrógeno tem um efeito neuroprotetor para a neurotoxicidade relativa do glutamato ao receptor NMDA, efeito este mediado pela tirosina cinase via MAPK. Esses autores observaram que, ao mesmo tempo em que houve um aumento da função do receptor NMDA, estimulando a fosforilação via uma *src* tirosina cinase/MAPK, não houve aumento da neurotoxicidade mediada pelo receptor NMDA.

A expressão de atividade de cinases reguladoras de sinais extracelulares e mitogênicos dependentes de fosforilação (MAPK/ERKs), cinases ativadas por estresse, c-Jun N-terminal, também conhecida como SAPK/JNKs e p38, bem como seus substratos específicos para os fatores de transcrição CREB, Elk-1, ATF-2, c-Myc e c-Jun, foram examinados após injeções intracortical do ácido quinolônico, um análogo do glutamato. O aumento da imunoreatividade das cinases JNK e p38 fosforiladas foi verificado, no local da injeção, 1 h depois da injeção do ácido quinolônico, ao passo que a imunoreatividade aumentada da MAPK fosforilada ocorreu em neurônios e nas células gliais localizados em torno da lesão. O efeito foi acompanhado por uma forte fosforilação da Ser⁶³ da cinase c-Jun com imunoreatividade local após 3 h e, por forte fosforilação da CREB, Elk-1 e ATF-2 e imunoreatividade, principalmente nos neurônios em torno do local, 24 h após injeção. Os dados indicaram também que a ativação das cinases JNK, a p38 e a c-Jun fosforilada precedeu a morte das células. Em contraste, nem a MAPK, CREB, Elk-1 e a ATF-2 fosforiladas, se correlacionaram com a expressão de sobrevivência celular. Estes resultados demonstram uma ativação seletiva dos sinais específicos de MAPKs que estão envolvidos na morte ou na sobrevivência celular, provocadas pelo estresse glutamatérgico excitotóxico (Ferrer e cols. 2001)).

Alterações na composição do receptor AMPA e a ativação da via de sinalização da p38 parecem estar envolvidas diretamente na neurotoxicidade e nos danos neuronais causados por concentrações elevadas de glutamate em ratos neonatal. A **figura 17** abaixo ilustra a via de sinalização da p38, após ser ativada por fatores externos, tais como: fatores de crescimento, luz ultravioleta, fatores tróficos, estresse induzidos por choque osmótico, radiação γ , anisomicina, etc...).

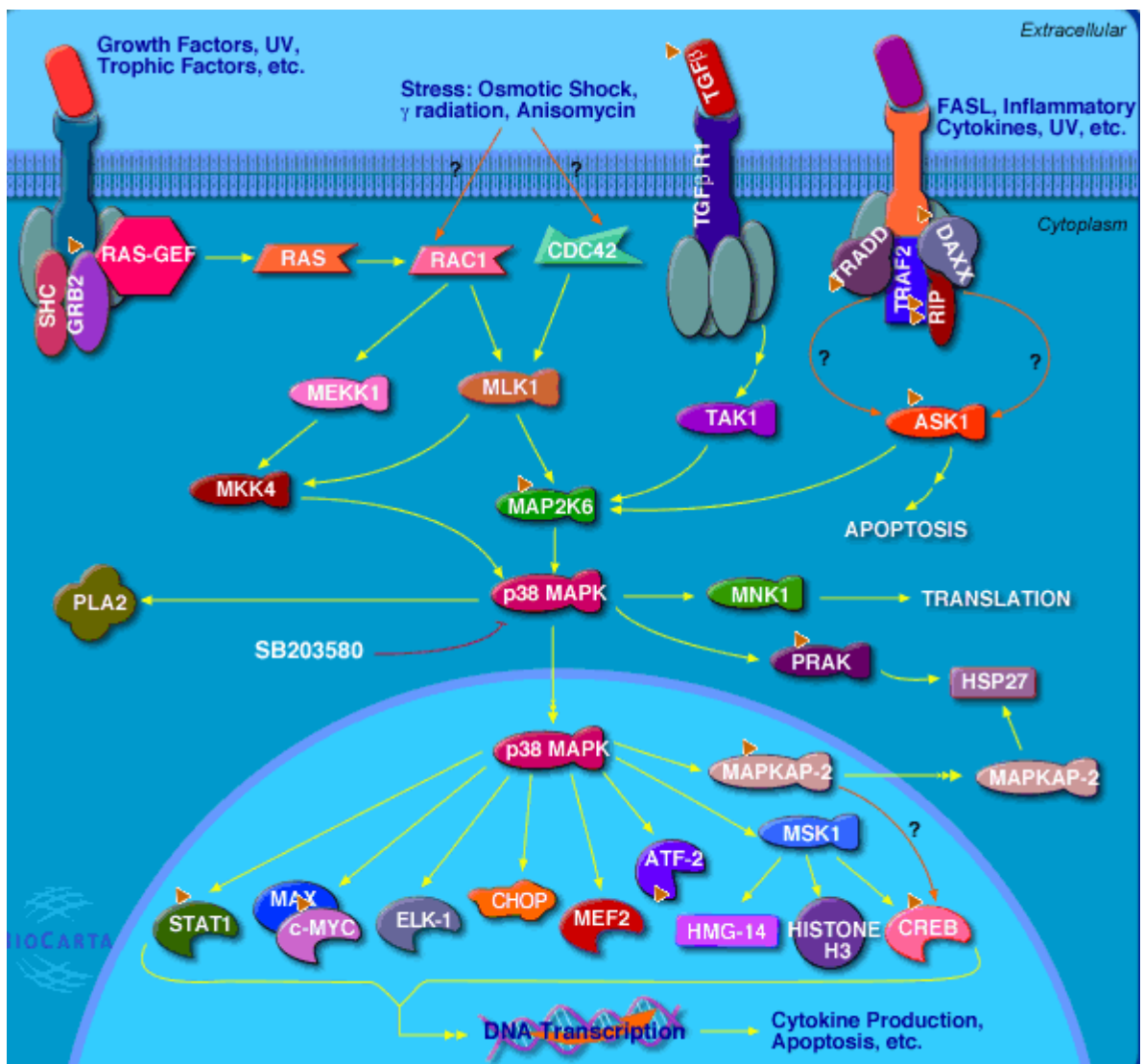


Figura 17 Esquema de uma célula indicando diferentes componentes de sistemas de tradução de sinais, com destaque para a MAPK p38 (<http://www.biocarta.com> em 11/04/2007).

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ENOVELAMENTO NEUROFIBRILARES

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) leva a danos nos tecidos por diferentes mecanismos, tais como, perturbação da homeostase intracelular de cálcio, diminuição intracelular de ATP agindo diretamente na inibição da glicólise e na fosforilação mitocondrial do ADP, perturbando os componentes do citoesqueleto e inibindo a adesão da célula neuronal à matriz extracelular. Um estudo feito por Hyslop e cols. 1995, mostrou que sob condições isquêmicas, a concentração de H_2O_2 no estriato de ratos pode chegar a níveis de $200\mu M$, enquanto que os controles dos isquêmicos tiveram como linha de base para o H_2O_2 igual a $27,64 \pm 33\mu M$, com pico máximo de $50\mu M$. Observaram também que $100\mu M$ H_2O_2 adicionado em culturas de neurônios corticais humanos por 30 min é o suficiente para matar mais do 50% das células 24h depois, e que metade do catabolismo do H_2O_2 era feito pelas células em 12 min. Uma característica marcante para a hipótese do estresse oxidativo, relacionado com doenças neurodegenerativas, é que o acúmulo dos danos oxidativos nas células com o passar do tempo, acomete a vida tardiamente, isto porque, o início dessas doenças normalmente é de natureza progressiva e lenta (Coyle e Puttfarcken, 1993).

Estudos recentes sugerem que a glicosilação de proteínas, agindo individualmente ou sinergisticamente com o aumento do estresse oxidativo, pode ser importante na DA (Yankner e cols., 1981). A glicosilação de proteínas, predominantemente das proteínas ricas em lisina, podem causar ligações inter e intramoleculares (Smith e cols. 1995). E o envelhecimento está associado com um aumento na glicosilação e modificações de proteínas (Sell e Monnier, 1989). O aumento também na glicosilação de proteínas e de seus metabólitos é acelerado pela oxigenação e proteínas glicosoladas contêm modificações oxidativas (Hunt e Wolff, 1991). A modificação de proteínas pela

oxidação pode resultar na glico-oxidação (Smith e cols. 1995). Diversos estudos têm sugerido o papel do aumento da glicosilação de proteínas e de seus metabólitos na DA. Os epitopos destas proteínas glicosiladas têm sido descritos nas placas difusas e neuríticas (Vitek e cols. 1994; Smith e cols. 1995). Modificações na glicosilação de proteínas β A e de seus metabólitos aceleram a agregação de peptídeos β A solúveis não fibrilares *in vitro* (Vitek e cols. 1994).

A proteína *tau-1* e os antígenos da glicosilação de proteínas e metabólitos estão co-localizados nos NFTs, e as espécies reativas de aldeídos também estão presentes nos NFTs. A *tau* glicosilada incubada junto com células de neuroblastoma induz a peroxidação de lipídios (Yan e cols. 1994). Assim, parece que o aumento na glicosilação de proteínas e metabólitos pode ter um papel na patogênese da DA, verificados através de modificações oxidativas em duas principais moléculas envolvidas nesta doença, a *tau* e o peptídeo β A. Estudos morfométricos mostraram que microglias ativadas estão aumentadas no neocórtex de pacientes com DA. Nesses estudos os autores demonstraram também que essas microglias estão associadas com as placas neuríticas e geraram óxido nítrico e radicais $O_2^{\cdot-}$ (Dickson e cols. 1988; Carpenter e cols. 1993; Colton e cols. 1994). Todos esses estudos indicam que os radicais livres estão possivelmente envolvidos na morte neuronal e, portanto, no mecanismo de processos neurodegenerativos.

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SISTEMAS DE TRADUÇÃO DE SINAIS

O peróxido de hidrogênio, a principal forma do ROS, pode mediar a morte imediata das células através da oxidação direta de lipídeos, proteínas e DNA ou agindo como um sinalizador molecular desencadeando a via de morte celular por apoptose (Huang e cols. 2004; Lin e cols. 2004).

Zhu e cols. (2005), verificaram através de análises de *Western blot* que o peróxido de hidrogênio causa fosforilação da p38 MAPK e que, um inibidor específico da p38 MAPK suprime mudanças nas propriedades da membrana plasmática e no citoesqueleto, resultantes do tratamento com H₂O₂. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que o H₂O₂ altera a membrana e o citoesqueleto de astrócitos através da via de ativação da p38 MAPK.

Numakawa e cols. (2007), demonstraram que a exposição de neurônios corticais ao H₂O₂ desencadeia uma série de eventos, incluindo um aumento da expressão da p44/42 MAPK e acúmulo intracelular de Ca²⁺ via canais de cálcio dependentes de voltagem e receptores de glutamato ionotrópico, resultando em morte neuronal por apoptose. A via da MAPK pode estar envolvida como sinalizador ou sistema de morte celular, pois, um inibidor da via MAPK, bloqueou o efeito do H₂O₂ na ativação da MAPK, o aumento da liberação de Ca²⁺ e a morte celular. Esses mesmos autores observaram também um efeito inibitório similar ao do H₂O₂ em desencadear a via de ativação da MAPK, acúmulo de Ca²⁺ e morte, em cultura de células incubadas com o hormônio, 17beta-E2 por 24 h, antes da exposição ao H₂O₂, sugerindo que o efeito protetor deste hormônio é induzido via atenuação da super-expressão da via das MAPKs.

Existe evidência de que a inibição da GSK3β pelo lítio protege os neurônios do estresse oxidativo e da morte celular (Mora e cols. 2001). Outros estudos sugerem que a inibição da GSK3β não somente induz a expressão da ciclo-oxigenase-2 (enzima responsável pela produção de prostaglandinas), como também protege células da medula renal de morte celular por estresse hipertônico. Esses autores sugerem que a indução da expressão da ciclo oxigenase-2 pela inibição da GSK3β indica a existência de uma ligação da ciclo oxigenase-2 com um processo de citoproteção (Rao e cols. 2004). Os mecanismos pelos quais a GSK3β

estaria envolvida com a promoção da morte celular ainda precisam ser melhores estudados (Goedert e cols. 1989b).

ESTRUTURA E PAPEL DA PROTEÍNA *tau*

No cérebro, a proteína *tau* consiste de uma família de seis isoformas as quais variam de 352 a 441 aminoácidos (aa), com peso molecular de 45 a 65 KD. As isoformas da *tau* diferem-se uma da outra pela presença de três ou quatro regiões repetidas carboxi-terminal (C-terminal) em uma parte da molécula e ausência ou presença de uma ou duas inserções (29 ou 58 aa) na parte amino-terminal (N-terminal) (Goedert e cols. 1989a; Goedert e cols. 1989b). As seis isoformas da *tau* podem ou não ser igualmente expressas nos neurônios. Por exemplo, o mRNA da *tau* que contém o *exon* 10 não é encontrada nas células granulares do giro denteado (Goedert e cols. 1989b). Assim, as isoformas da *tau* são diferentemente distribuídas nas subpopulações de neurônios. As proteínas *tau* pertencem à família das proteínas associadas aos microtúbulos MAPs (*microtubule-associated proteins*), (Weingarten e cols. 1975; Robert e Mathuranath, 2007) . As MAPs são fatores chave na regulação do dinamismo dos microtúbulos e na estrutura do citoesqueleto celular. Os microtúbulos estão envolvidos em diferentes eventos celulares, como por exemplo, no transporte axonal (Hyoung-gon e cols, 2005) e nos processos que dirigem o crescimento dos neuritos responsáveis para uma correta agregação cromossômica durante o período mitótico (Hyman e Karsenti, 1996; Yu e Rasenick, 2006; Ikegami e cols. 2006).

A *tau* se liga a espectrina e a filamentos de actina (Carlier e cols. 1984; Correas e cols. 1990; Blard e cols. 2007). Através destas interações, a *tau* permite aos microtúbulos interconectar-se com outros componentes do citoesqueleto, tais como, os neurofilamentos (Leterrier e cols. 1982; Blard e cols. 2007; Aamodt e Williams Jr., 1984a; Aamodt e Williams Jr., 1984b) , podendo restringir ou não a

flexibilidade dos microtúbulos (Matus, 1994). Existem também evidências de que a *tau* interage com organelas citoplasmáticas. Tais interações podem permitir ligações entre os microtúbulos e as mitocôndrias (Rendon e cols. 1990). A projeção do domínio N-terminal da proteína *tau* também permite interações com a membrana plasmática neural (Brandt e cols. 1995). Assim a *tau* pode agir como um mediador entre microtúbulos e membrana plasmática. A *tau* se liga aos microtúbulos através de repetidas regiões na sua parte C-terminal. Existem também evidências do papel da *tau* como promotora da polimerização da tubulina (Bohm e cols. 1990; Brandt e Lee, 1993; Jancsik e cols. 1996). Drechsel e cols. (1992), observaram um aumento na taxa de polimerização dos microtúbulos e uma inibição na taxa de despolimerização causados pela proteína *tau*.

Existem setenta e nove possíveis sítios Ser ou Thr de fosforilação ao longo da isoforma cerebral da *tau* (441 aa). Usando-se anticorpo monoclonal contra *tau* fosforilada, espectrometria de massa e técnica de sequenciamento de aminoácidos da proteína, pelo menos trinta sítios de fosforilação já foram descritos. A maioria destes sítios de fosforilação são nos aminoácidos Ser e Thr em seqüências do tipo, Ser-Pro e Thr-Pro (Morishima-Kawashima e cols. 1995; Buée e cols. 2000).

A regulação do citoesqueleto neuronal por fosforilação tem sido reconhecida como um sítio potencial de alterações relacionadas com neuropatologias causadas por ambos os fatores, intrínsecos e extrínsecos. As tubulinas, os neurofilamentos, as MAPs, as quinesinas, actinas, e actinas ligadas às proteínas formam a estrutura dos axônios e do citoesqueleto dendrítico (Hirokawa, 1994). A descoberta de que o aumento na fosforilação da *tau*, com produção da forma hiperfosforilada que é o principal componente dos PHFs, tem despertado a atenção para a natureza dos eventos pós traducionais envolvidos com a modificação desta MAP (Selkoe, 1991; Iqbal e

Novak, 2006). Os PHFs foram caracterizados pela sua insolubilidade e pela sua habilidade de se corar com anticorpos monoclonais tal como AZ-50 (Wolozin e Davies, 1987; Tsolaki e cols. 2001) . A mobilidade da PHF-*tau* consiste de três bandas de peptídeos por volta de 60, 64 e 68 KD denominada proteína A68 (Wolozin e Davies, 1987).

A caracterização da *tau*, via "sítios de fosforilação", utilizando anti-anticorpo tem sido utilizada como instrumento na determinação dos sítios de fosforilação da *tau*. A isoforma da *tau* humana apresenta sítios os quais são reconhecidos por anticorpos específicos para "sítios de fosforilação"; bem como sítios de ação para possíveis proteínas fosfatases. O anticorpo monoclonal *tau-1*, por exemplo, reconhece os sítios de defosforilação entre os resíduos 189 e 207. Condições que favorecem a defosforilação aumentam a intensidade de coloração deste epitopo na membrana de transferência, de nitrocelulose e nas células. O anticorpo monoclonal 5E2 reconhece o sítio independente de fosforilação em resíduos 156-175. Estudos de mapeamento de epitopos identificaram sítios das séries AT de fosforilação dependente de anticorpos monoclonais: Ser-202 para AT8; N-terminal para AT10; Thr-231 para AT80; Thr-181 para AT270. O anticorpo monoclonal PHF-1 dependente de fosforilação, reconhece os resíduos Ser-396-404, enquanto o anticorpo Alz-50 reconhece a região N-terminal (Goedert e cols. 1994; Kosik e cols. 1988; Iqbal e cols. 1998) .

CINASES E FOSFATASES ENVOLVIDAS COM A REGULAÇÃO DA PROTEÍNA tau

As reações de fosforilação e subsequente defosforilação são catalisadas por proteínas cinases e fosfatases, respectivamente. Elas desempenham um importante papel na tradução de sinais, responsáveis por uma série de eventos celulares, tais como, proliferação e morte celular. Alterações nas proteínas cinases e fosfatases estão intimamente relacionadas a várias disfunções celulares. As proteínas cinases não somente fosforilam seus substratos

protéicos, como também são fosforiladas por elas mesmas, assim como por outras proteínas cinases (Ishida e cols. 2003; Ishida e cols. 2005).

Um estado diferente de fosforilação da *tau* resulta de alterações na atividade de cinases e fosfatases específicas para tais sítios. Assim, a tradução de sinal intracelular é feita com base em um balanço entre fosforilação e defosforilação. Segundo Billingsley e Kincaid, (1997) as proteínas cinases direcionadas para *tau* são arbitrariamente divididas em três categorias: (a) cinases dependentes de segundo mensageiro: proteína cinase C (PKC), cinase dependente de AMP-C (PKA) e cinase dependente de Ca^{2+} /calmoldulina (CaMK II); (b) cinases direcionadas para Pro-Ser: família das MAPKs; GSK3; cinases dependentes de ciclinas (cdk2 e cdk5) e (c) outras cinases (cinase Ser-262): cinases da caseína; proteínas cinases dependente de DNA. A **tabela I**, apresentada abaixo, os sítios da *tau* para fosforilação.

M. L. Billingsley and R. L. Kincaid

Table 1 Tau-directed protein kinase sites

Abbreviations: TKR, tyrosine kinase receptor; ds, double-stranded.

	Signal	Sites on human tau-(1-441)	Microtubule-associated?
(a) Second-messenger kinases			
PKA	cAMP	Ser-214, Ser-262, Ser-324, Ser-356, Ser-409, Ser-416	No
PKC	Ca^{2+} /lipid	Ser-324	No
CaM kinase II	Ca^{2+} /CaM	Ser-409, Ser-416	Yes
(b) Proline-directed kinases			
MAPK (p42, p44, p40, p49)	TKRs	Ser-46, Ser-199, Ser-202, Ser-235, Ser-396, Ser-404, Ser-422	Yes
cdk5 (tau kinase II)	?	Ser-195, Ser-202, Thr-205, Thr-231, Ser-235, Ser-396, Ser-404	Yes
CDC2	?	Ser-195, Ser-202, Thr-205, Thr-231, Ser-235, Ser-396, Ser-404	No
GSK3 α	?	Ser-199, Ser-202, Thr-212, Thr-231, Ser-235, Ser-262, Ser-324, Ser-356, Ser-396, Ser-404	Yes
GSK3 β (tau kinase I)	?	Ser-199, Thr-231, Ser-396, Ser-413	Yes
(c) Other kinases			
p110 ^{PI3K}	?	Ser-262	Yes
Casein kinase I	?	Ser-396, Ser-404, Alz-50, SMI-34	Yes
Casein kinase II	?	Ser-396, Ser-404, SMI-34	?
DNA-dependent kinase	ds DNA	Not determined	?

Conforme mencionado, a maioria das cinases envolvidas na fosforilação da *tau* são proteínas cinases direcionadas para prolina-serina, as quais incluem: MAPKs (Drewes e cols. 1992; Goedert e cols. 1997; Yoshida e cols. 2004), GSK3 cinase, (Hanger e cols. 1992; Leroy e cols. 2007), *tau*-tubulina cinase (Takahashi e cols. 1995; Paudel, 1997) e cinases dependentes de ciclinas, incluindo cdc2 e cdk5 (Baumann e cols. 1993; Liu e cols. 1995; Pei e cols. 2002).

Sítios não serina/treonina-prolina podem ser fosforilados por muitas outras cinases, incluindo MARK (*microtubule-affinity regulating kinase*) (Drewes e cols. 1997; Trinczek e cols. 2004), CaMPK II (*Ca²⁺ - calmodulin-dependent protein kinase II*) (Johnson, 1992), PKA (*cyclic-AMP-dependent kinase*) (Jicha e cols. 1999) e caseína cinase II (Greenwood e cols. 1994). Numerosas cinases, prolina direcionadas e prolina não direcionadas, têm sido usadas para observar a completa fosforilação de diferentes isoformas da *tau* (Singh e cols. 1996).

A proteína *tau* do tecido cerebral ou das células do neuroblasto é rapidamente defosforilada pelas fosfatases endógenas (Buée-Scherrer e cols. 1996; Matsuo e cols. 1994). Os resíduos de Ser/Thr das proteínas fosfatases 1, 2A, 2B e 2C, presentes no cérebro (Ingebritsen e Cohen, 1983; Cohen e Cohen, 1989; Terol e cols. 2002), são rapidamente reguladas (Dudek e Johnson, 1995; Pope e cols. 1993). Assim como as cinases, as fosfatases têm muitos efeitos fisiológicos diretos ou indiretos, e contrabalançam os efeitos das cinases. Elas estão associadas direta ou indiretamente com os microtúbulos (Sontag e cols. 1995; Dudek e Johnson, 1995; Sontag e cols. 1999). Por exemplo, tem-se demonstrado que a proteína *tau* age como um elo entre a proteína fosfatase 1 (PP-1) e a tubulina (Liao e cols. 1998), ao passo que a PP-2A está diretamente ligada aos microtúbulos por interações iônicas (Sontag e cols. 1999).

Vários membros da família MAPK fosforilam a *tau*, tais como as ERKs, p44 ou ERK1, (Lu e cols. 1993), p42 ou ERK2, (Arendt e cols. 1995) e

a PK40 ou ERK (Pei e cols. 1999). As ERKs participam de uma cascata de respostas celulares ampliando os estímulos extracelulares e regulando a proliferação e a sobrevivência de muitos tipos celulares. Essa classe de cinases está também envolvida em processos anabólicos, tais como crescimento, divisão e diferenciação celular (Obara e cols. 2007; Yoshizumi e cols. 2000). Muitos dos anticorpos relacionados ao *PHF* reconhecem os resíduos Ser/Thr-Pro e, portanto, modificações da *tau* pelas MAPKs levam a um aumento na intensidade de cor que representa alterações detectadas com o uso destes anticorpos. As MAPKs têm sido co-localizadas em neurônios *PHF* positivos. As MAPKs podem também fosforilar a *tau* em culturas de neurônios e em fatias de tecidos cerebral, primeiro pela ativação dos receptores tirosina cinase e depois através da cascata de ativação via proteínas cinases. Em fatias de tecido cerebral a ativação da p42MAPK via NGF (fator de crescimento do nervo), ou o bloqueio da PP-2A, leva a um aumento na fosforilação da *tau* (Garver e cols. 1995). Lu e cols (1993) demonstraram que microinjeções de p44 em cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos, resultou em hiperfosforilação da *PHF-tau* associada com o comprometimento na associação dos microtúbulos.

O grupo das proteínas cinases p38 compreende as seguintes isoformas: p38 α , p38 β , SAPK3/p38 γ (*stress-activated protein kinases*, SAPK, JNK, e p38) e a SAPK4/p38 δ (Cohen, 1997). Formas ativadas anômalas das p38s e JNK têm sido encontradas associadas às células que contêm filamentos *tau* em algumas doenças neurodegenerativas (Atzori e cols. 2001; Ferrer e cols. 2001) , essas cinases podem contribuir para a hiperfosforilação da proteína *tau*. As isoformas da p38 são membros da família das MAPK e são ativadas por estresse celular, lipolissacárides bacterianos, citocinas e na resposta primária celular por agentes citotóxicos (Yoshizumi e cols. 2000); Cohen, 1997). Segura Torres e cols. (2006) verificaram que a excitotoxicidade e morte neuronal ocorrida pela ativação de receptores NMDA e não NMDA de glutamato no SNC, é devida a uma forte ativação da p38 pelo glutamato. E que a morte

neuronal pode ser prevenida pelos inibidores da via da p38. A atividade de cinases Ser/Thr, direcionada por prolina, está associada com a regulação da proteína *tau* em preparações cerebrais (Ishiguro e cols. 1992; Morishima-Kawashima e Kosik, 1996). A GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) compreende duas formas, "α" e "β" (Woodgett, 1990; Ikeda e cols. 1998) , sendo que, ambas estão associadas com os microtúbulos e com a fosforilação da *tau* (Singh e cols. 1995; Sengupta e cols. 1997). A GSK3 é uma cinase serina/treonina e esta envolvida na regulação de diversos processos, incluindo síntese de glicogênio e adesão celular das seis isoformas da proteína *tau* identificadas, todas são fosforiladas pela GSK3 (Sanchez e cols. 2003).

A GSK3α fosforila a *tau* nos resíduos de Ser199, Ser202, Ser235, Ser396 e Ser404 e uma estimulação pela heparina leva a ativação da GSK3α a qual fosforila a *tau* nos resíduos Thr-212, Thr231 e Ser262, Ser324, Ser356. As Ser235, Ser262, Ser324, Ser356, e Ser404 (particularmente nos sítios Ser262) têm sido identificados como os cinco sítios mais potentes para reduzir a ligação da *tau* com os microtúbulos e que, portanto, possivelmente estejam envolvidos em degeneração neuronal. A Thr231, Ser235, Ser262, e Ser404 são os quatro sítios mais bem documentados envolvido na fosforilação da *tau* na DA (Yang e cols. 1994; Zheng-Fischhofer e cols. 1998).

II.2 OBJETIVOS

II.1 GERAL: Investigar o envolvimento de componentes moleculares do citoesqueleto e do sistema de tradução de sinais no mecanismo de ação de fatores neurotóxicos.

II.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos neurotóxicos do glutamato, em alta concentração e, do peróxido de hidrogênio (estresse oxidativo) sobre:

- a) a morte celular em culturas primárias de neurônios corticais de rato;
- b) os níveis de fosforilação das proteínas *tau* e de cinases específicas para a *tau*.

II.3 MATERIAL E MÉTODOS

CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS

Neurônios corticais de embriões de ratas de 17 dias de gestação foram assepticamente dissecados e dissociados por tripsinização e trituração, conforme detalhado a seguir. Durante e após a dissecação o tecido cortical foi mantido em solução estéril e iso-osmótica de HBSS, (*Hank's balanced salts solution, Gibco, Invitrogen*) contendo CaCl_2 e MgCl_2 . Para cada 5 a 10 neocórtex dissecados, 4,5 ml de solução HBSS e 0,5 ml de tripsina (0,05% p/v) foram adicionados e transferidos para um tubo de ensaio, que foram mantidos em Banho-Maria 37°C por 30 minutos. A paralisação da reação (tripsinização) foi feita lavando as células por 3 vezes com 14 ml da seguinte "solução de uso": 45 ml de solução neurobasal para meio de cultura (*neurobasal*™ cat. N° 21103 *Gibco, Invitrogen*), na qual foram adicionados: 1ml de solução NB-27, (suplementos NB27, cat. N° 17504 *Gibco, Invitrogen*), 0,5 ml de penicilina, 0,5 ml de estreptomicina, 0,5 ml L-Glutamina, 5ml de soro fetal de bezerro (10% v/v) e 50 µl de DNase. Em seguida as células foram trituradas em 2,5 ml da mesma "solução de uso", com uma pipeta de vidro *Pasteur* de ponta fina, através de sucessivas aspirações, até que se obtivesse uma suspensão fina de células. A suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon e então centrifugada a 1000 g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspensas em 6 ml da mesma solução acima, exceto o soro fetal e a DNase. Posteriormente, 46 ml da mesma solução neurobasal para meio de cultura foi adicionada à suspensão obtendo-se uma densidade celular de 10^5 células/ml. Em seguida, 2 ml do meio foram transferidos para placas de cultura estéreis, com 6 poços, revestidas

previamente com Poli-L-lisina (10 µg/ml). A natureza química desta molécula permite interações com sítios aniônicos das células resultando em uma forte adesão das células com a parede do fundo da placa. As células do meio de cultura foram então incubadas em estufa estéril a 37°C por 12 dias, com temperatura e quantidade de CO₂ controlados.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Logo após o término do período de incubação de 12 dias, as células em cultura foram utilizadas para a realização de diferentes experimentos, na ausência (condições controles) ou na presença de glutamato (Sigma) ou peróxido de hidrogênio (Sigma). Foram executados experimentos, com pelo menos duas réplicas para cada, com a finalidade de se estudar os efeitos dos dois tratamentos (alta concentração de glutamato ou peróxido de hidrogênio), em diferentes tempos de incubação (1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) sobre: a) a viabilidade de células de neurônios corticais em cultura; b) o nível de fosforilação da proteína *tau* e c) o nível de fosforilação de proteínas cinases (GSK-3αβ e MAPKs) que atuam sobre a proteína *tau*.

AValiação DA VIABILIDADE CELULAR

Para se verificar os efeitos de uma alta concentração de glutamato e do peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular utilizamos o método espectrofotométrico do MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol], através do qual a viabilidade celular foi monitorada. O composto MTS tetrazol, de cor amarela, é reduzido pelas células a um composto formazol, de cor marrom, o qual é solúvel no meio de cultura celular. Os principais sítios de ação para a redução do MTS acontecem em dois estágios da cadeia transportadora de elétrons, citocromo oxidase e a ubiquinona. Portanto, a redução do MTS indica um funcionamento celular adequado (função mitocondrial normal) que pode ser avaliado quantitativamente por uma

medida da variação da absorbância das células viáveis na cultura celular, quando se incide um feixe de luz em um comprimento de onda (λ) de 490nm. A absorbância foi medida usando o equipamento *Bio-Tek microplate* (modelo *Wallac 1420 instruments-Perkin Elmer*). Os resultados obtidos em absorbância foram expressos em porcentagem de células vivas com relação ao controle (considerado como tendo uma viabilidade celular correspondente a 100%). Os valores médios de absorbância \pm SE dos controles para os experimentos realizados com glutamato e peróxido de hidrogênio foram $1,0 \pm 0,08$ e $1,209 \pm 0,046$, respectivamente.

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMATO OU PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR:

20 μ l da solução MTS (*celltiter 96tm Aqueous*, Promega) foi adicionada a 100 μ l do meio de cultura celular de cada poço da placa de Elisa. A seguir, diferentes concentrações de glutamato (1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) ou de peróxido de hidrogênio (10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M), mantidas por 24 ou 48 horas, foram utilizadas para se verificar o efeito da concentração desses compostos sobre a viabilidade celular.

EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA PRESENÇA DE GLUTAMATO OU PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR:

Estabelecida as concentrações que provocaram morte celular significativa, um segundo experimento foi realizado para verificar o efeito do tempo de incubação na presença desses compostos sobre a viabilidade celular. Para isso, 100 μ M de glutamato ou 1 mM de peróxido de hidrogênio foram adicionados às culturas celulares de córtex que foram então mantidas em incubação por diferentes tempos (1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min).

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GLUTAMATO (100 μ M) E DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (1000 μ M) SOBRE OS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA *tau* E DE PROTEÍNAS CINASES:

Imediatamente após a incubação, em diferentes tempos, das células neuronais, com glutamato ou peróxido de hidrogênio, o meio de cultura foi removido por aspiração e as células foram lavadas por 3 vezes com 1 ml de tampão Tris salino gelado (Tris 25 mM, NaCl 140 mM e KCl 5 mM, pH 8). Logo em seguida foi adicionado, diretamente sobre as células para a desnaturação protéica, 200 μ l de tampão SDS-Gel [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2% (p/v) na presença de dodecil sulfato de sódio- SDS], contendo: 5% v/v de mercapto etanol, 10% (v/v) de glicerol, e 0.001% (p/v) de azul de bromofenol, aquecido a 100^oC. As células foram então homogeneizadas, com o auxílio de uma espátula, e logo após, o lisado celular foi armazenado em tubo Ependorf e estocado a - 20^oC, para posterior análise das fosfoproteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, com posterior ensaio por *Western Blot*.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Um sistema para eletroforese da *Bio-Rad* foi utilizado. Foram aplicados sobre o gel de concentração, 5 μ l da amostra de suspensão de células corticais (conforme preparação descrita acima) para a condição controle, referente à avaliação dos efeitos do glutamato e do peróxido de hidrogênio sobre a actina e, 15 μ l da amostra para o estudo dos efeitos desses tratamentos sobre as demais proteínas (*tau* e diferentes proteínas cinases). A composição do "gel de concentração" 4% utilizado foi: 2,44 ml de água deionizada, 1 ml de tampão do gel de concentração, 500 μ l de acrilamida (4%), 60 μ l de persulfato de amônio (10%p/v) e 6 μ l de N,N',N',N'-Tetrametil etilenodiamina (Temed). A mistura de proteínas contida nas amostras foi separada em "gel de corrida" SDS-poliacrilamida 10% [3,97 ml de água deionizada, 2,6 ml de

tampão do gel de corrida, 3,33 ml de acrilamida, e 100 µl de persulfato de amônio (10%p/v) e 10 µl de Temed]. A separação foi, portanto, de acordo com o peso molecular de cada proteína, com um tempo de corrida de 1h a 150 volts, usando-se um sistema com tampão de corrida pH 8,3, Tris 250 mM, Glicina 192 M, 1% (p/v) de SDS, acrescidos de metanol e água.

WESTERN BLOT

Logo após a separação por eletroforese foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (*Schleicher & Schell*), utilizando um sistema de "sanduíche" de papel semi-seco para transferência (*transblotter, SD, Bio-Rad*). No tanque que estava o "sanduíche" foi adicionado o tampão de transferência pH 8,3 Tris 250 mM, Glicina 192 M, acrescidos de metanol e água. O período utilizado para a transferência das proteínas foi de 1h em uma diferença de potencial ajustada para 30 volts. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, a mesma foi colocada em 10 ml de "solução de bloqueio" contendo: 3 g de leite em pó ou 0,5 g de albumina de soro bovina 5% (dependendo do anticorpo utilizado), acrescidos de tampão Tris 250 mM, NaCl 1,4 M, KCl 50mM e pH 8,0. Essa solução foi utilizada para lavar a membrana por 3X consecutivas durante 10 min cada. Ao término destas etapas a membrana de nitrocelulose foi transferida para 10 ml da mesma "solução de bloqueio", acrescida do anticorpo primário e mantidas por 24 h. Após incubação da membrana com o anticorpo primário, essa foi lavada por 4X durante 10 min com tampão Tris-NaCl-KCl pH 8,0 e colocada no agitador. Depois de lavada a membrana foi novamente transferida para 10 ml da mesma "solução de bloqueio" e o anticorpo secundário foi adicionado permanecendo nesta solução por mais 1 h. A membrana foi então lavada da mesma maneira da primeira etapa. As proteínas específicas foram quantificadas por

densitometria no equipamento, *Odyssey v1.2, Infrared Imager* (LiCoR Biosciences, Lincoln, NB), nos seguintes comprimentos de onda (λ) de 700 ou 800 nm, dependendo do anticorpo secundário utilizado. Os resultados foram expressos em densidade óptica (média \pm erro padrão) de dados obtidos de pelo menos três experimentos realizados para cada fosfoproteína. Os cálculos foram feitos dividindo-se os dados obtidos para cada proteína nas condições estudadas (presença de glutamato ou de peróxido de hidrogênio) pelos seus respectivos controles (ausência dos tratamentos) e posterior correção usando como padrão a actina.

ANTICORPOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DAS FOSFOPROTEÍNAS:

Anti actina: anticorpo monoclonal (mAb) de camundongo (Ac-15), anti actina, direcionado para β actina (*Abcam*), detecta a β actina em uma variedade de tecidos e espécies.

Anti-fosfotirosina: clone 4G'10, anticorpo monoclonal (mAb) de camundongo, isotipo IgG2bk (*Cell Signaling Technology*).

Anti tau-1: anticorpo monoclonal de camundongo, que reconhece a forma defosforilada do epitopo normal da tau (Ser¹⁹⁹, Ser²⁰²) (*Chemicon international*), isotipo IgG28.

Anti-PHF-1: anticorpo monoclonal PHF-1 (*Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY*) reconhece resíduos de Ser³⁹⁶ e Ser⁴⁰⁴ fosforilados, que estão envolvidos na estabilização da proteína tau.

P-GSK-3 $\alpha\beta$: anticorpo monoclonal de camundongo P-GSK-3 $\alpha\beta$ (mAb), reconhece Ser²¹ e Ser⁹ da forma ativa (fosforilada) da GSK-3. (*Cell Signaling Technology*).

GSK-3 $\alpha\beta$: detecta GSK-3 β e GSK-3 α , anticorpo monoclonal de camundongo (*Stressgen Biotechnologies*).

Anti- P-p38 e anti-p38 total: anticorpos policlonais (pAb) de coelho (pTGpY) que reconhecem resíduos fosforilados de tirosina e treonina (Tyr¹⁸², Thr¹⁸⁰) (*Promega*) da proteína cinase p38. O anticorpo que reconhece as formas ativas e inativas (total) foi produzido contra peptídeos sintéticos derivados de seqüências de aminoácidos de ambas as formas (*Promega*).

Anti-p42/p44 e anti-p42/p44 total: anticorpo policlonal (pAb) de coelho Erk1/2, reconhece resíduos ativos de tirosina e treonina (Tyr²⁰⁴, Thr²⁰²), (*Cell Signaling Technology*), as duas tirosinas e treoninas fosforiladas representam as formas ativas de ambas cinases p42 (=Erk1) e p44 (=Erk 2). O anticorpo que reconhece as duas formas (total) também é policlonal contra coelho e produzido contra uma seqüência de peptídeo da p42 (*Cell Signaling Technology*).

Anticorpos secundários: anticorpo monoclonal de camundongo IgG (H+L) com alta absorção (*Eugene, Oregon EUA*) para todos os anticorpos primários de camundongos. Anticorpo policlonal anti coelho IgG (H+L), (*Promega*) para todos os anticorpos primários de coelho (*Qualified Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) secondary anti-bodies (both HRP- and AP-conjugated)*).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para a viabilidade celular foram tratados por Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2x4, sendo os fatores: tempo (dois níveis) e concentração (quatro níveis), e fatorial 2x12 com medidas repetidas no último elemento sendo os fatores: tratamento (dois níveis, com e sem tratamento) e tempo de incubação (12 vezes). Para os dados referentes

a cada fosfoproteína específica (forma fosforilada e total) foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2x10 com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento (dois níveis, com e sem tratamento) e tempo de incubação (10 vezes). Quando algum efeito significativo foi detectado na ANOVA, o teste "t" de Student foi utilizado para comparar diferenças entre dois pontos específicos, como, forma fosforilada e fração total (fosforilada e defosforilada). As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

II.4 RESULTADOS

VIABILIDADE CELULAR

Na figura 18 os painéis **A** e **B** apresentam as culturas tratadas, respectivamente, com glutamato e peróxido de hidrogênio. ANOVA 2x4 (tempo de incubação x concentração do composto) para os dados obtidos em culturas tratadas com glutamato mostrou efeito significativo da concentração deste composto ($F_{3,112}=21,67$; $p < 0,01$); o tempo de incubação não teve efeito significativo ($F_{1,112}=0,86$; $p > 0,05$); também não houve interação significativa ($F_{3,112}=1,91$ $p > 0,05$). Da mesma forma, em culturas tratadas com peróxido de hidrogênio, houve efeito significativo da concentração ($F_{3,112}=400,24$; $p < 0,01$), mas não do tempo de incubação ($F_{1,112}=1,81$; $p > 0,05$); também não houve interação significativa ($F_{3,112}=0,55$; $p > 0,05$). As culturas tratadas com glutamato o teste *t* de Student, mostrou que as concentrações de 10 e 100 μM provocaram uma diminuição significativa na percentagem de células vivas ($p < 0,01$) em relação ao controle. O tempo de incubação provocou diferença significativa na percentagem de células vivas ($p < 0,05$) na presença de 100 μM de glutamato, sendo o tempo de 48h mais efetivo com relação ao efeito na morte celular. No caso das outras concentrações não houve diferença significativa provocada pelo tempo de incubação. Esses dados indicam que, quanto maior a excitabilidade,

provocada por altas concentrações de glutamato, menor a viabilidade celular. Um dado interessante é que não observamos diferença entre as concentrações de 10 μM e 100 μM , indicando uma possível saturação dos receptores em concentrações acima de 10 μM .

No caso das culturas tratadas com peróxido de hidrogênio, a concentração de 10 μM provocou uma diminuição significativa ao nível de 0,05 na percentagem de células vivas, comparada ao controle (ausência de peróxido de hidrogênio). As concentrações de 100 e 1000 μM provocaram diminuições significativas ao nível de 0,01. Da mesma forma que a excitabilidade provocada pelas diferentes concentrações de glutamato, quanto maior o estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio, maior o efeito sobre a morte celular.

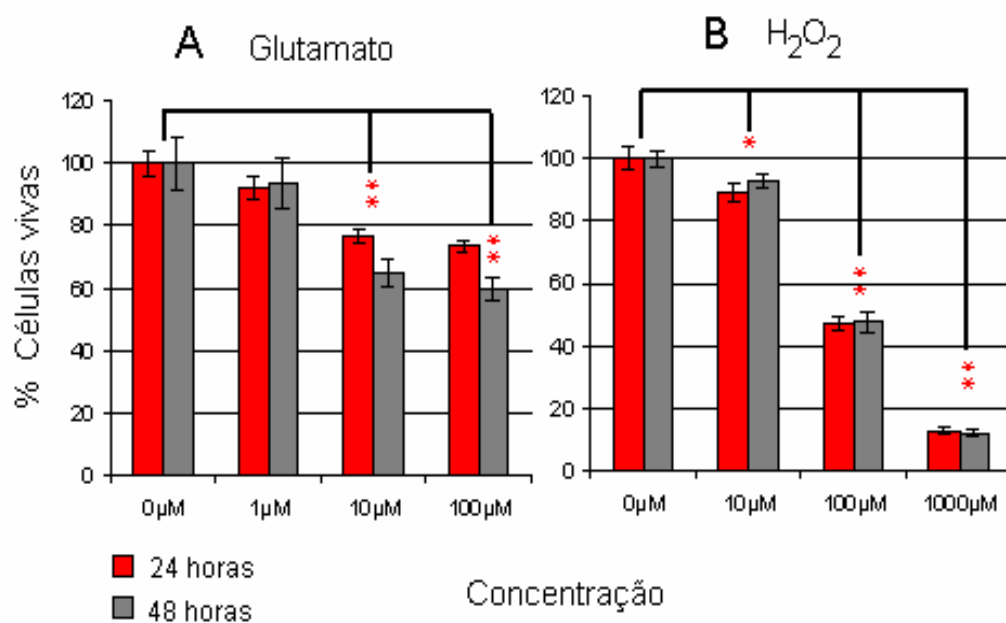


Figura 18 Efeito da concentração de glutamato (painel **A**) e da concentração de peróxido de hidrogênio (painel **B**) sobre a viabilidade celular expressa em percentagem de células vivas, com os tempos de 24h (barras vermelhas) e 48 h (barras cinzas) de incubação. O valor da concentração para qualquer um dos tratamentos teve efeito significativo sob a percentagem de células vivas (exceto, para o glutamato na concentração de 1 μM). O tempo de incubação não teve efeito significativo, exceto para o glutamato na concentração de 100 μM . * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$.

A **figura 19** apresenta o efeito do tempo de incubação sobre a viabilidade celular. A ANOVA fatorial 2x12 (tratamento utilizado e tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento mostrou um efeito significativo ($F_{1,144} = 32,81$; $p < 0,01$) do glutamato em relação ao controle. O efeito do tempo de incubação também foi significativo ($F_{8,128} = 3,67$; $p < 0,01$), indicando que o tempo de incubação interfere com a sobrevivência celular, quando as células estão expostas a uma mesma concentração de glutamato. ANOVA fatorial 2x12 com medidas repetidas mostrou um efeito significativo ($F_{1,144} = 669,18$; $p < 0,01$) do tratamento com o peróxido de hidrogênio em relação ao controle; o efeito do tempo de incubação também foi significativo ($F_{8,128} = 2,70$; $p < 0,01$), mostrando que o tempo de incubação também interfere com a sobrevivência celular.

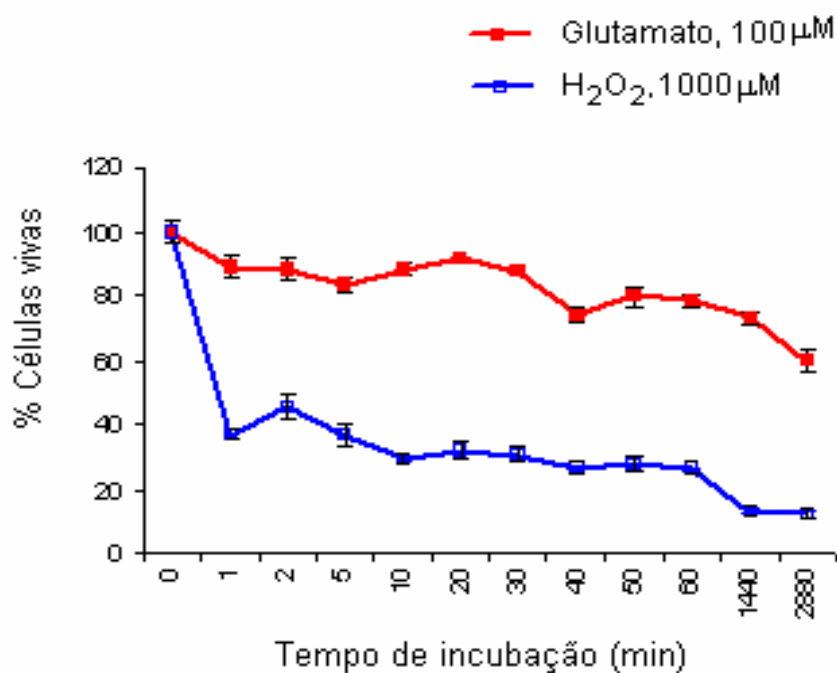


Figura 19 Efeito do tempo de incubação sobre a porcentagem de células vivas, considerando a condição controle como 100%. Os tratamentos foram com glutamato na concentração de 100 µM (linha vermelha) e H₂O₂ na concentração de 1000 µM (linha azul).

As **figuras 20 e 21 (painéis A, B e C)**, ilustram análises qualitativas por *Western blot*, para uma das classes de cinases estudadas (p42 e p44), painéis **B** e **C** da **figura 20**, e para a proteína *tau*, painel **B** da **figura 21**. Nos painéis **A**, das duas figuras, estão representados resultados qualitativos de ensaios controles usando anticorpo para actina. Nos dois casos (**figuras 20 e 21**) estão sendo apresentados, para efeito de ilustração das análises qualitativas, os experimentos realizados na ausência (controles) e na presença de glutamato 100 μ M, nos tempos de incubação de 20 a 60 min. No painel **B** da **figura 20**, apresentamos uma imagem de identificação por fluorescência, das proteínas cinases p44 e p42. Nos painéis **C**, das duas figuras, são as mesmas imagens apresentadas nos painéis **B**, reproduzidas por mapeamento das áreas correspondentes a serem analisadas por método quantitativo. Todos os dados referentes às análises quantitativas estão apresentados nas próximas figuras, para todas as fosfoproteínas estudadas.

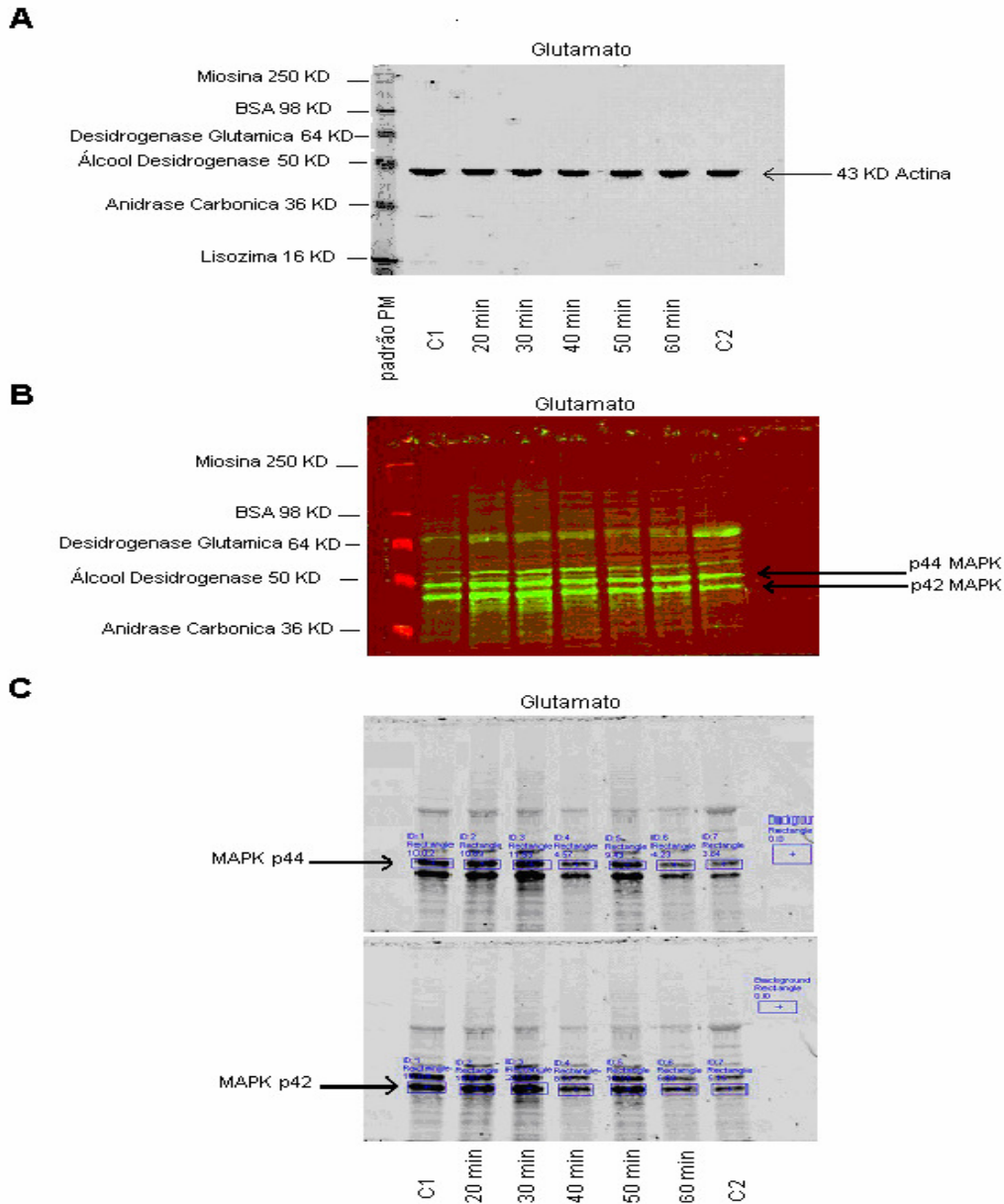


Figura 20 Painel A: ilustra uma imagem de *Western blot* controle, realizado com anticorpo para a actina; C1 e C2 significam amostras controles (culturas incubadas sem glutamato e sem peróxido de hidrogênio). As demais canaletas, indicadas por 20, 30, 40, 50, e 60min, são em condições de diferentes tempos de incubação, em presença de glutamato 100 μ M. Painéis B e C: revelação por imunofluorescência de *Western blot* para detectar as proteínas cinases p44 e p42 total, com anticorpos anti-p44/p42. Ver detalhes no texto.

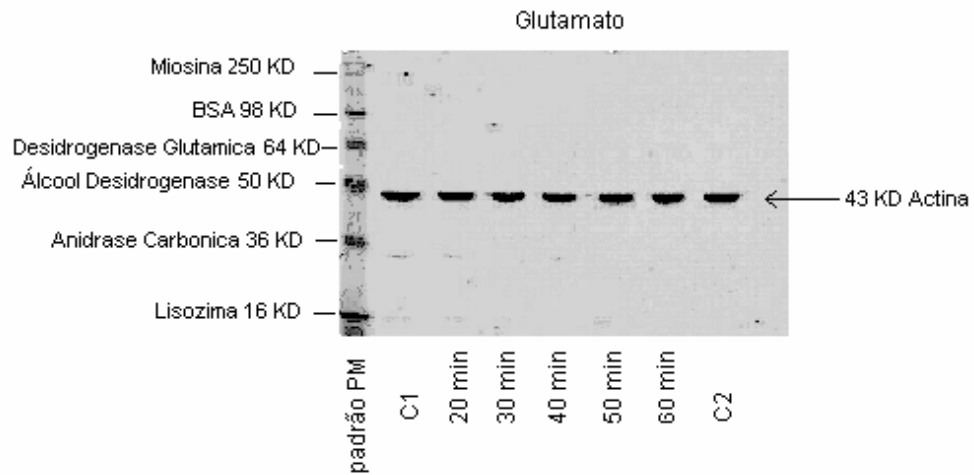
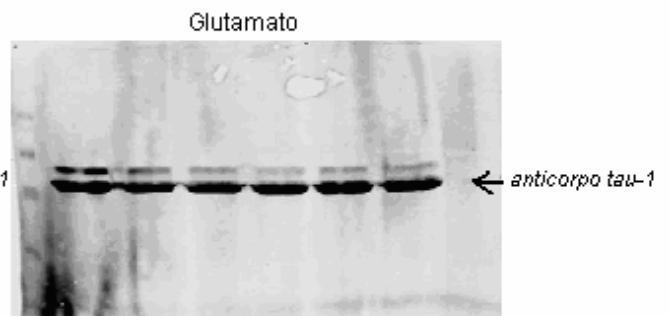
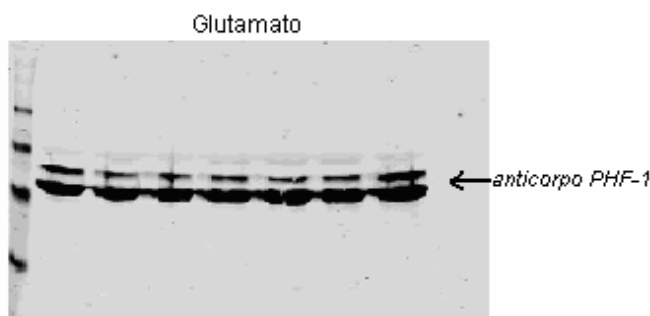
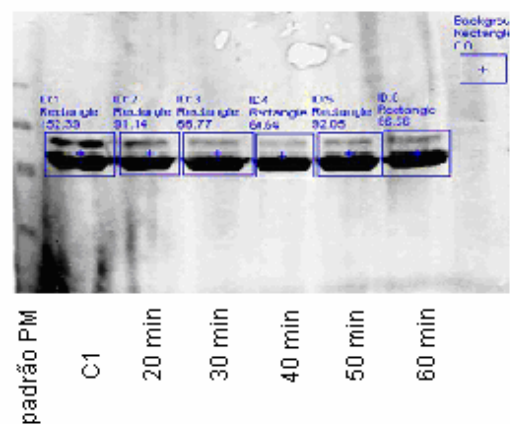
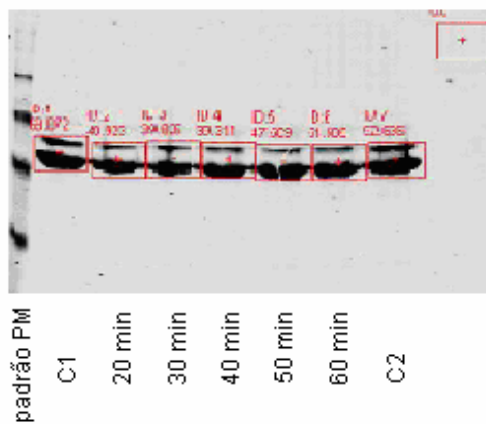
A**B****C**

Figura 21 painéis **A**, **B** e **C** ilustram imagens de *Western blot*. Painel A: controle, realizado com anticorpo para a actina. C1 e C2 significam amostras controles (culturas incubadas sem glutamato e sem peróxido de hidrogênio). As demais canaletas, indicadas por 20, 30, 40, 50, e 60min, são em condições de diferentes tempos de incubação em presença de glutamato 100 μ M. Painéis B e C: são imagens de *Western blot* obtidos da proteína *tau*, detectada com os anticorpos *tau-1* (direita) e PHF-1 (esquerda). Ver detalhes no texto.

Na **Figura 22** painel **A** apresentamos duas imagens ilustrando aspectos qualitativos da análise por *Western blot* para as proteínas fosfotirosinas, detectadas utilizando anticorpo monoclonal 4G'10. Na imagem da esquerda ilustramos os experimentos realizados na ausência (controles, C1 e C2) e na presença de glutamato 100 μ M incubados por 20, 30, 40, 50 e 60 mins. Na imagem da direita, apresentamos resultado de um experimento similar na presença de peróxido de hidrogênio 1000 μ M. O painel **B** da figura **22** mostra o gráfico com os dados quantitativos, para os dois tratamentos, nos tempos de incubação de 1 a 60 min. Nesse gráfico a letra "C" indicada na abscissa, representa um valor médio para as condições (controles) na ausência de tratamento.

ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento não mostrou efeito significativo ($F_{1,4} = 0,75$; $p > 0,05$) do tratamento com glutamato em relação ao controle; o efeito do tempo de incubação foi significativo ($F_{8,32} = 2,64$; $p < 0,05$), indicando que o tempo de incubação tem influencia sobre a fosforilação destas proteínas em presença de glutamato 100 μ M.

ANOVA fatorial 2x10 com medidas repetidas, mostrou um efeito significativo ($F_{1,4} = 427,94$; $p < 0,01$) do peróxido de hidrogênio em relação ao controle, sendo o efeito do tempo de incubação também significativo ($F_{8,32} = 24,16$; $p < 0,01$), evidenciando com isto, que as células corticais de cultura primária de neurônios são sensíveis tanto ao H_2O_2 quanto ao tempo de incubação, com relação ao efeito desse tratamento sobre o nível de fosforilação dos resíduos tirosina das proteínas totais detectadas nas condições estudadas. Os resíduos de tirosinas da fração total das fosfoproteínas são rapidamente fosforilados na presença de H_2O_2 podendo ser observado, na **figura 22**, que este efeito atinge o seu valor máximo em 20 minutos.

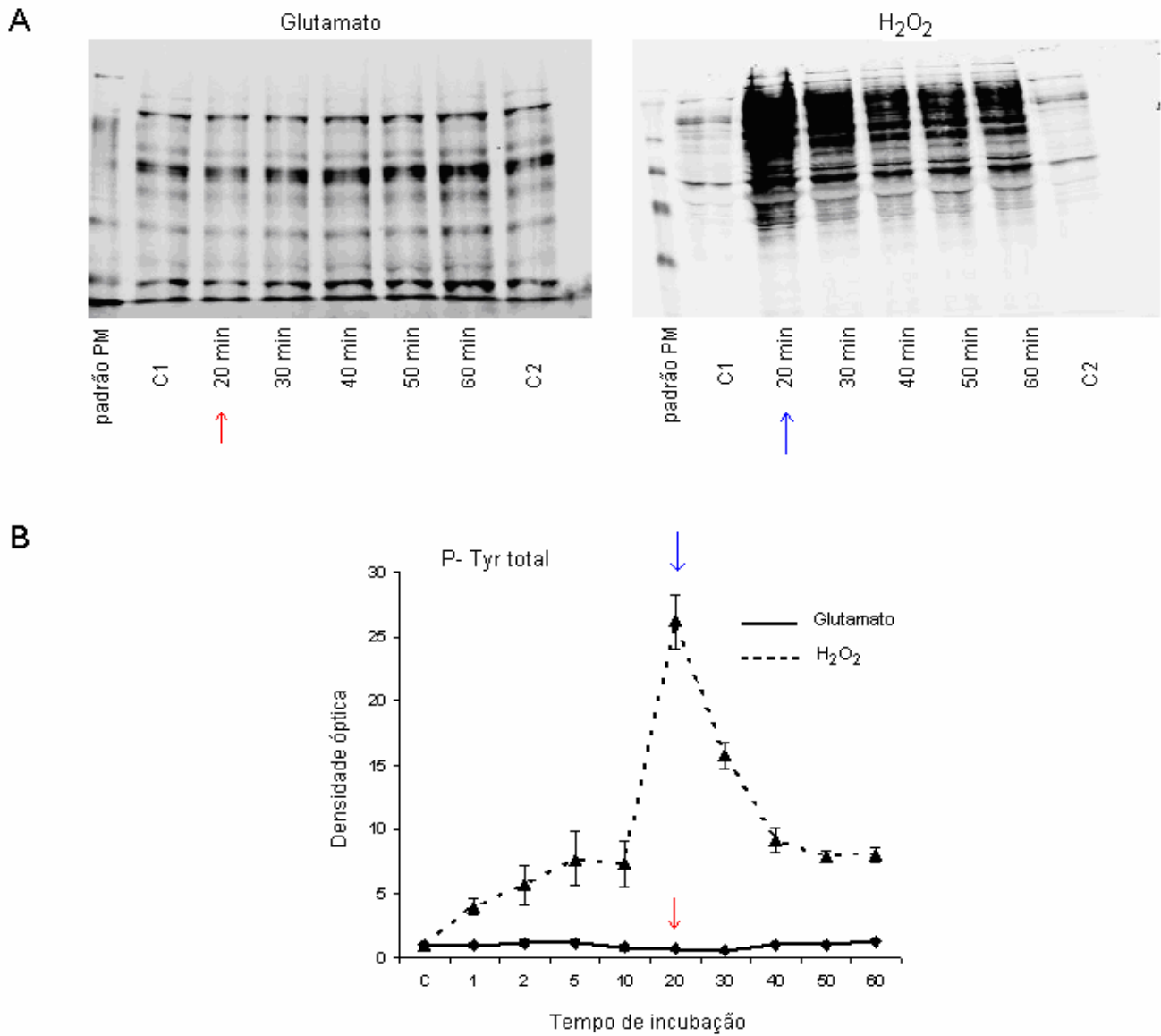


Figura 22, painel **A**: exemplo de uma imagem de *Western blot* para a fração de fosfoproteínas totais detectada a partir dos resíduos de fosfotirosina. C1 e C2 indicam condições controles, ausência de glutamato e peróxido de hidrogênio. Nas canaletas identificadas de 20min até 60 min estão ilustrados os aspectos qualitativos da fração de proteínas fosforiladas nos resíduos de tiroxina em presença de glutamato 100 μ M (imagem da esquerda) ou peróxido de hidrogênio 1000 μ M (imagem da direita). O gráfico apresentado no painel **B** mostra os dados da análise quantitativa dos efeitos do glutamato (linha contínua) e do peróxido de hidrogênio (linha pontilhada) sobre a fosforilação de resíduos de tirosina da fração protéica total. As setas vermelhas e azuis indicam a correspondência entre os aspectos qualitativos e quantitativos dos efeitos do glutamato e do peróxido de hidrogênio, respectivamente, aos 20 minutos de incubação. Maiores detalhes estão descritos no texto.

A **Figura 23** apresenta os gráficos referentes aos efeitos do glutamato 100 μM (painel **A**) e peróxido de hidrogênio 1000 μM (painel **B**) sobre a concentração de isoformas defosforilada e fosforilada da proteína *tau*, quantificadas através dos valores da densidade óptica obtidos com o uso dos anticorpos *tau-1* e PHF-1. A ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito significativo ($F_{1,4}=15,69$; $p < 0,05$), sobre a concentração das isoformas detectadas com *tau-1*, durante tratamento com glutamato (100 μM) em relação ao controle; o efeito do tempo de incubação foi significativo ($F_{8,32}= 3,8$; $p < 0,01$), indicando que o tempo de incubação com o glutamato tem efeito sobre a *tau*. Por outro lado, ANOVA 2x10 mostrou que nem o glutamato ($F_{1,32}=3,94$; $p > 0,05$) nem o tempo de incubação ($F_{8,32}=1,66$; $p > 0,05$) tiveram efeitos significativos sobre as isoformas detectadas com o anticorpo PHF-1. Observa-se que o efeito do glutamato aumenta a partir de 2 minutos para a forma defosforilada da *tau* enquanto a forma fosforilada permanece sem grandes alterações. O teste "t" mostrou que o glutamato teve um efeito significativamente maior sobre a *tau-1* nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação ($p < 0,05$).

A ANOVA 2x10 mostrou um efeito significativo do peróxido de hidrogênio (painel **B**) sobre a concentração das isoformas detectadas com o anticorpo *tau-1* ($F_{1,4}= 10,35$; $p < 0,05$), o tempo de incubação também teve efeito significativo ($F_{8,32}= 7,89$; $p < 0,01$). O peróxido de hidrogênio teve efeito significativo ($F_{1,4}= 274,45$; $p < 0,01$) sobre a concentração das isoformas detectadas com o anticorpo PHF-1; o tempo de incubação não teve efeito significativo ($F_{8,32}= 1,74$; $p > 0,05$). O peróxido de hidrogênio tem um efeito maior a partir de 20 min, sobre isoformas da *tau* detectadas com anticorpo *tau-1*, enquanto isoformas da *tau* detectadas com anticorpo PHF-1 permanece sem grandes alterações. O teste "t" mostrou que o peróxido de hidrogênio teve um efeito significativamente maior sobre a *tau-1* nos tempos 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação ($p < 0,05$).

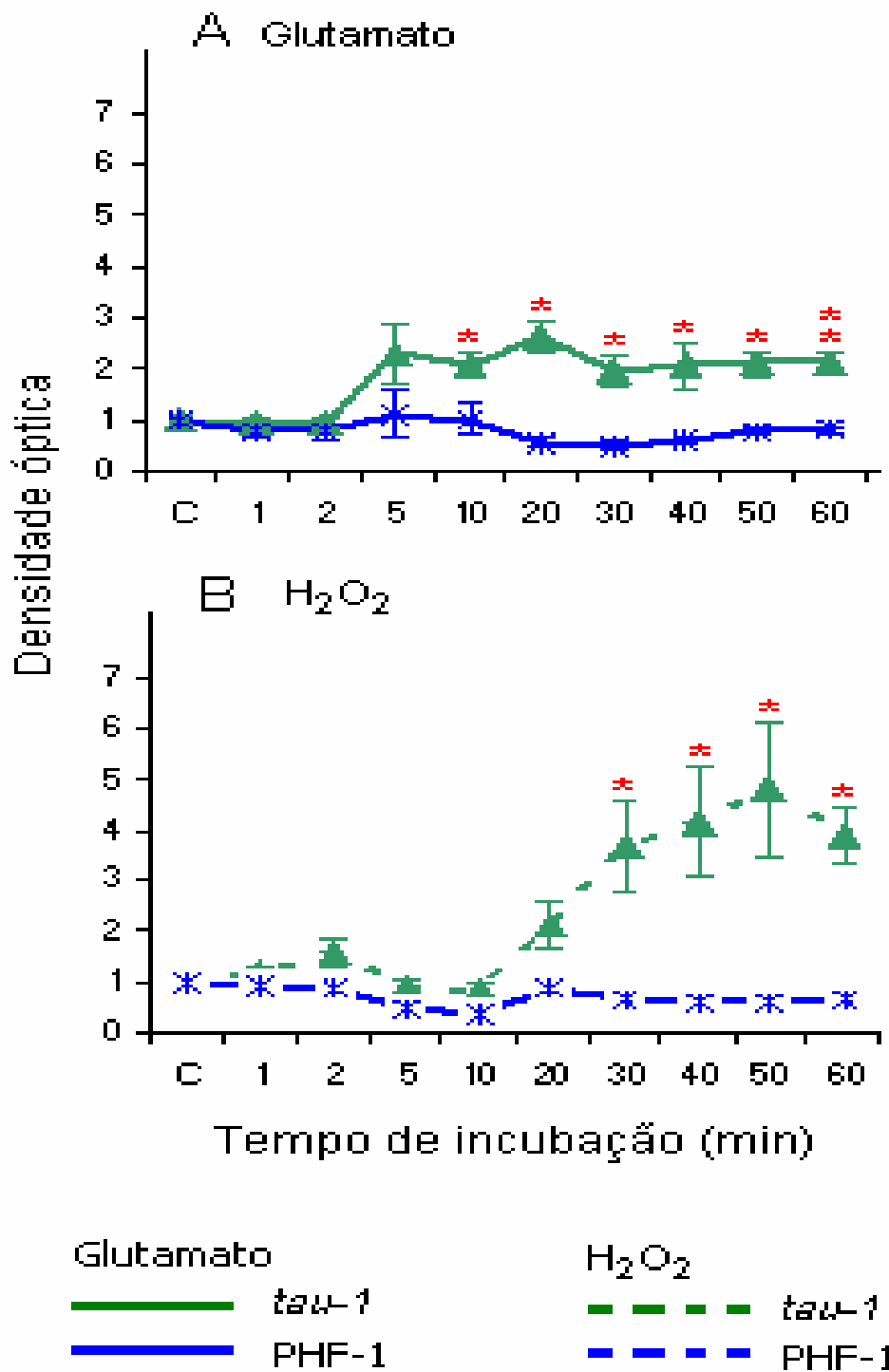


Figura 23 painéis **A e B**: Gráficos mostrando os efeitos do glutamato 100 μ M (linhas contínuas) e do peróxido de hidrogênio 1000 μ M (linhas pontilhadas), respectivamente, sobre a concentração das isoformas da proteína *tau* detectadas com os anticorpos *tau-1* (linha verde) e PHF-1 (linha azul). * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$.

A **figura 24** painel **A** apresenta o efeito do glutamato 100 μ M sobre a concentração da classe de cinases detectadas com o anticorpo GSK-3 $\alpha\beta$, conformação fosforilada e total (defosforilada e fosforilada). A ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito significativo ($F_{1,4}=11,15$; $p<0,05$) do tratamento com glutamato sobre a concentração da P-GSK-3 $\alpha\beta$ na sua forma ativa (conformação fosforilada), em relação ao controle; o efeito do tempo de incubação sobre a P-GSK-3 $\alpha\beta$ foi significativo ($F_{8,32}=24,42$; $p <0,01$). ANOVA 2x10 mostrou que o glutamato também tem efeito significativo ($F_{1,4}=9,87$; $p <0,05$) sobre a concentração da forma total (GSK-3 $\alpha\beta$ = fosforilada + defosforilada). O tempo de incubação também teve efeito significativo ($F_{8,32}=6,65$; $p <0,01$) sobre GSK-3 $\alpha\beta$ total. A comparação, entre P-GSK3 e GSK3 total, com relação aos efeitos do glutamato, mostrou que não houve diferença significativa. ($F_{1,4}=0,07$; $p >0,05$). Entretanto o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{9,36}=18,74$; $p <0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do glutamato e do tempo de incubação ($F_{6,36}=9,22$; $p <0,01$). Com tempos de incubação até 10 minutos o glutamato teve uma tendência a apresentar um efeito maior sobre a GSK-3 $\alpha\beta$ total, e a partir de 40 minutos a tendência de seu efeito foi maior sobre a forma fosforilada. O teste t , mostrou que aos 10 minutos de incubação o efeito do glutamato sobre a GSK-3 $\alpha\beta$ total foi significativamente maior que seu efeito sobre a P-GSK-3 $\alpha\beta$ ($p <0,05$). A partir dos 40 minutos o efeito do glutamato sobre a P-GSK-3 $\alpha\beta$ (conformação fosforilada) foi significativamente maior que seu efeito sobre a GSK-3 $\alpha\beta$ total ($P <0,05$). O painel **B** apresenta os efeitos do peróxido de hidrogênio 1000 μ M em relação ao controle, sobre a P-GSK-3 $\alpha\beta$ e GSK-3 $\alpha\beta$ total. A ANOVA 2x10 mostrou um efeito significativo do peróxido de hidrogênio sobre a concentração da P-GSK-3 $\alpha\beta$ ($F_{1,4}=29,08$; $p <0,05$), o tempo de incubação também teve efeito significativo ($F_{8,32}=25,25$; $p <0,01$). Em relação à GSK-3 $\alpha\beta$ total o peróxido de hidrogênio não teve efeito significativo ($F_{1,4}=5,4$; $p >0,05$) mas, o tempo de incubação teve efeito

significativo ($F_{8,32} = 6,95$; $p < 0,01$). O gráfico apresentado mostra que houve um pico no efeito do peróxido de hidrogênio sobre a P-GSK-3 $\alpha\beta$. A comparação, entre P-GSK3 e GSK3 total, com relação aos efeitos do peróxido de hidrogênio, mostrou que não houve diferença significativa ($F_{1,4} = 1,85$; $p > 0,05$). Entretanto o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{9,36} = 21,07$; $p < 0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do peróxido de hidrogênio e do tempo de incubação ($F_{9,36} = 24,95$; $p < 0,01$) O teste *t*, mostrou que aos 10 minutos o efeito do peróxido de hidrogênio sobre P-GSK-3 $\alpha\beta$ foi significativamente maior que seu efeito sobre a GSK-3 $\alpha\beta$ total ($p < 0,01$), sendo que, aos 30 min esse efeito sobre a P-GSK-3 se reverte de tal forma que, nesse tempo de incubação a diferença entre a P-GSK-3 e a GSK-3 total é significativa mas, por um efeito inverso, ou seja, ocorrência de uma queda na concentração da forma fosforilada.

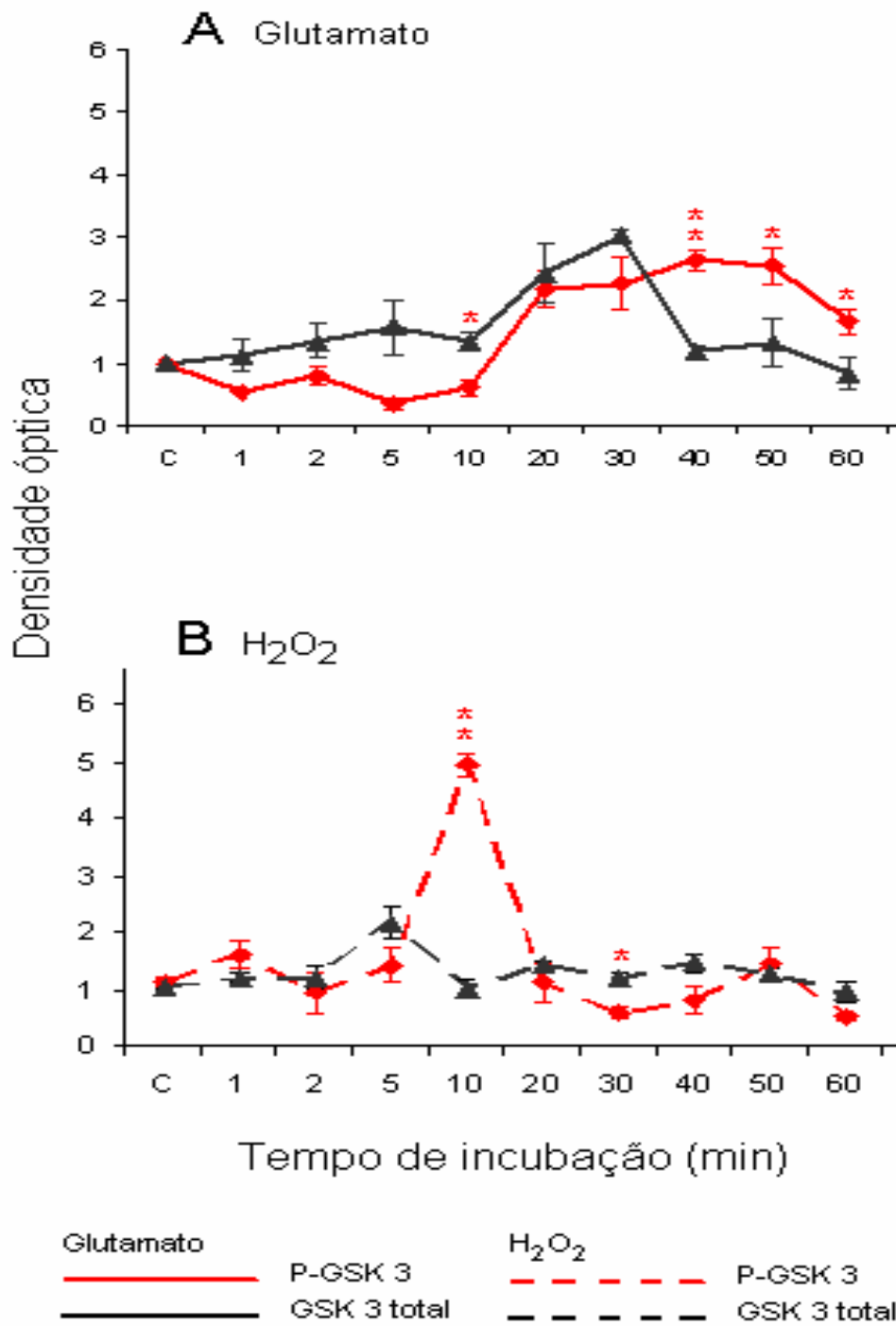


Figura 24 painéis **A e B**: efeitos do glutamato 100 μ M (linhas contínuas) e do peróxido de hidrogênio 1000 μ M (linhas pontilhadas), respectivamente, sobre a concentração da GSK-3 $\alpha\beta$ em suas formas fosforilada (linha vermelha) e total (linha preta). * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$.

A **figura 25** painel **A** apresenta o efeito do glutamato (100 μ M) sobre a concentração da p38 na forma fosforilada e p38 total. A ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento não mostrou efeito significativo ($F_{1,4}=3,15$; $p >0,05$) do tratamento com glutamato sobre a concentração da p38 na sua forma ativa, em relação ao controle; o efeito do tempo de incubação sobre a P-p38 foi significativo ($F_{8,32}=7,11$; $p <0,01$). ANOVA 2x10 mostrou que o glutamato não tem efeito significativo ($F_{1,4}=0,07$; $p >0,05$) sobre a concentração da p38 total. O tempo de incubação também não teve efeito significativo ($F_{8,32}=1,21$; $p >0,05$) sobre p38 total. A comparação entre P-p38 e p38 total, com relação aos efeitos do glutamato, mostrou que este efeito não foi significativamente diferente ($F_{1,4}= 0,97$; $p >0,05$). Entretanto, o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{8,32}=6,99$; $p <0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do glutamato e do tempo de incubação ($F_{8,32}=4,84$; $p <0,01$). O teste *t*, não mostrou diferença ao nível de 0,05. O painel **B** apresenta o efeito do peróxido de hidrogênio (1000 μ M) em relação ao controle, sobre a P-p38 e a p38 total. A ANOVA 2x10 mostrou um efeito significativo do peróxido de hidrogênio sobre a concentração da forma P-p38 ($F_{1,4}= 28,17$; $p <0,01$) em relação ao controle; o tempo de incubação também teve efeito significativo ($F_{8,32}=8,79$; $p <0,01$). Em relação a p38 total, o peróxido de hidrogênio não teve efeito significativo ($F_{1,4}=0,74$; $p >0,05$) mas o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{8,32}= 2,66$; $p <0,05$). A comparação, entre P-p38 e p38 total, com relação aos efeitos do peróxido de hidrogênio, mostrou diferença significativa ($F_{1,4}= 8,87$; $p <0,05$). O tempo de incubação também teve efeito significativo ($F_{8,32}=15,47$; $p <0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do peróxido de hidrogênio e do tempo de incubação ($F_{8,32}= 13,6$; $p <0,01$). O gráfico apresentado mostra que houve um pico no efeito do peróxido de hidrogênio sobre a P-p38 (aos 5 minutos), e um pico no efeito sobre a p38 total (aos 50 minutos). O teste *t*, mostrou que aos 2, 5 e 10 minutos o efeito do peróxido de hidrogênio sobre P- p38 foi significativamente maior que seu efeito sobre a p38 total ($p <0,05$). Aos

50 minutos o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a p38 total foi significativamente maior que o da P-p38 ($p < 0,01$).

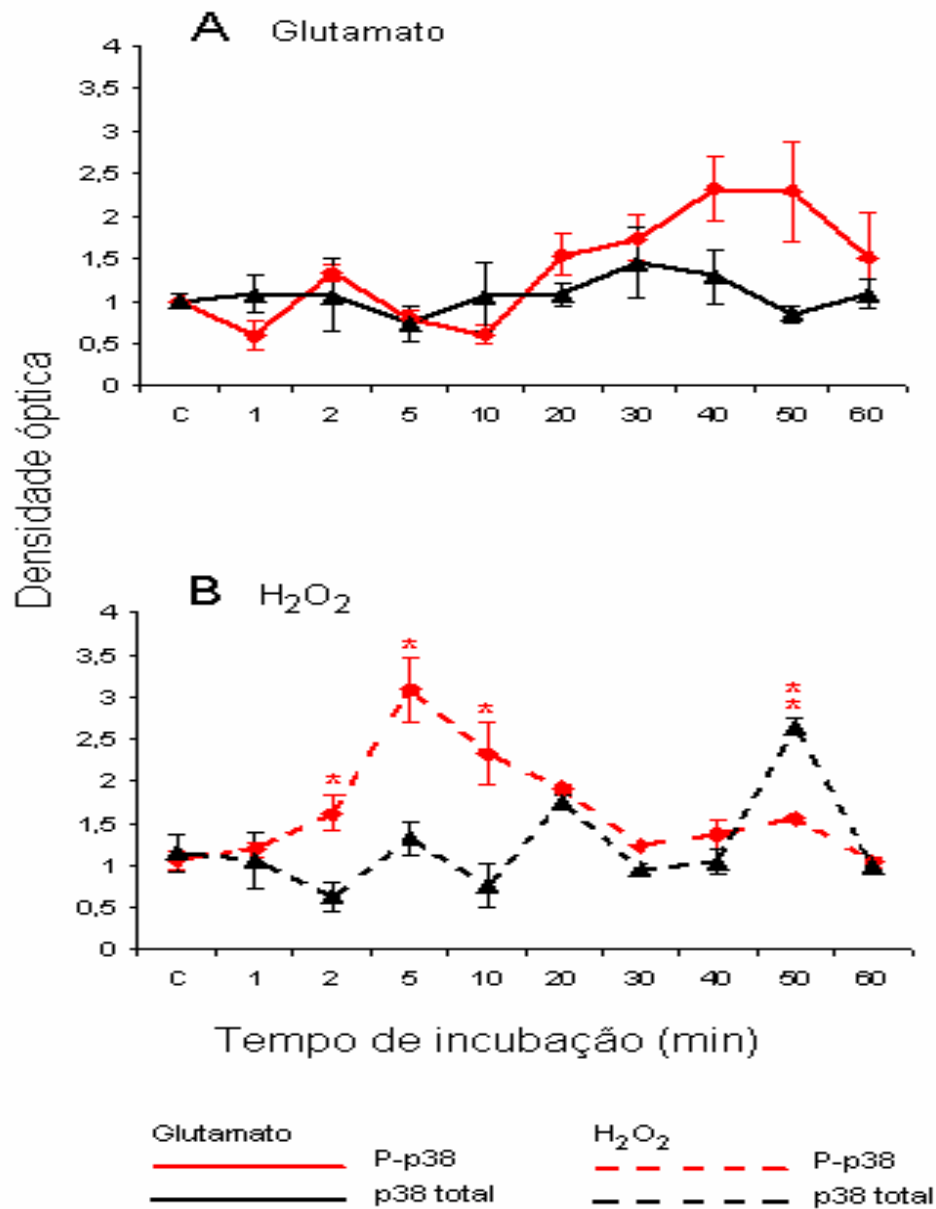


Figura 25 painéis **A e B**: efeitos do glutamato 100 μ M e do peróxido de hidrogênio 1000 μ M, respectivamente, sobre a concentração da P-p38 (forma ativa) e p38 total. * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$.

A **figura 26** painel **A** apresenta o efeito do glutamato (100 μ M) sobre a concentração da p44 na forma fosforilada (P-P44) e nas formas P-p44 e OH-p44 (p44 total). A ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento mostrou efeitos significativos do tratamento com glutamato sobre a concentração da P-p44 ($F_{1,4}=10,45$; $p < 0,05$) e p44 total ($F_{8,32}=11,94$; $p < 0,05$), em relação ao controle; os efeitos do tempo de incubação sobre a P-p44 e p44 total foram significativos ($F_{8,32}= 28,84$; $p < 0,01$ e $F_{8,32}=18,13$; $p < 0,01$, respectivamente). A comparação, entre P-p44 e p44 total, com relação aos efeitos do glutamato, não mostrou diferença significativa ($F_{1,4}= 0,077$; $p > 0,05$). Entretanto, o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{9,36}=48,80$; $p < 0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do glutamato e do tempo de incubação ($F_{9,36}= 4,45$; $p < 0,01$). Com tempos de incubação até 5 minutos o glutamato teve um efeito maior sobre a p44 total, e a partir de 20 minutos o seu efeito foi maior (tendência, $p=0,056$) sobre a forma fosforilada. O teste *t*, mostrou que nos tempos de 1 min e 5 min de incubação o efeito do glutamato sobre a p44 total foi significativamente maior que seu efeito sobre a P-p44 ($p < 0,05$). O painel **B** apresenta o efeito do peróxido de hidrogênio (1000 μ M) em relação ao controle, sobre a P-p44 e p44 total. A ANOVA 2x10 não mostrou efeitos significativos do peróxido de hidrogênio sobre a concentração da P-p44 ($F_{1,4}=4,01$; $p > 0,05$) e da p44 total ($F_{1,4}=3,26$; $p > 0,05$), o tempo de incubação também não teve efeito significativo nem para a P-p44 ($F_{8,32} = 1,42$; $p > 0,05$) e nem para a p44 total. A comparação, entre a P-p44 e a p44 total, com relação aos efeitos do peróxido de hidrogênio mostrou que não houve diferença significativa ($F_{1,4}= 2,74$; $p > 0,05$). O tempo de incubação não teve efeito significativo ($F_{9,36}=1,91$; $p > 0,05$) e também não houve interação significativa entre os efeitos do peróxido de hidrogênio e do tempo de incubação ($F_{9,36}= 1,13$; $p > 0,05$).

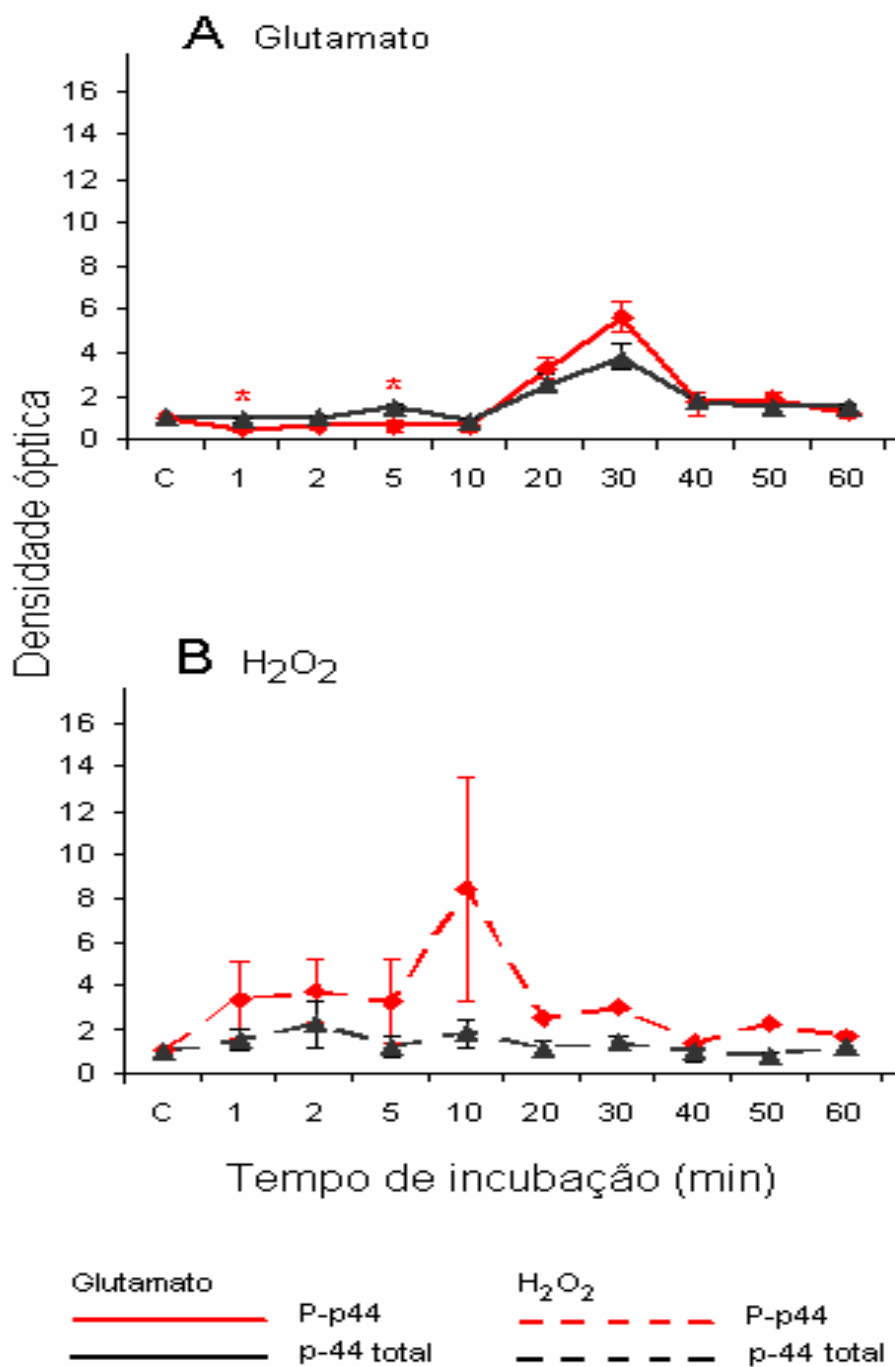


Figura 26 painéis **A e B**: efeitos do glutamato 100 μ M e do peróxido de hidrogênio 1000 μ M, respectivamente, sobre a concentração da p44 na forma fosforilada e p44 total (formas fosforilada e defosforilada). * $p < 0,05$.

A **figura 27** painel **A** apresenta o efeito do glutamato (100 μ M) sobre a concentração da P-p42 (forma ativa) e p42 total (forma fosforilada e defosforilada). A ANOVA fatorial 2x10 (tratamento X tempo de incubação) com medidas repetidas no último elemento não mostrou efeito significativo ($F_{1,4}=7,15$; $p >0,05$), do tratamento com glutamato sobre a concentração da P-p42 na sua forma ativa mas mostrou efeito significativo ($F_{1,4}=8,72$; $p <0,05$) sobre a concentração da p42 total, em relação ao controle; os efeitos do tempo de incubação foram significativos tanto para a P-p42 ($F_{8,32}= 3,43$; $p <0,01$) quanto para p42 total ($F_{8,32}=36,21$; $p <0,01$). A comparação, entre a P-p42 e p42 total, com relação aos efeitos do glutamato, não mostrou diferença significativa ($F_{1,4}= 0,09$; $p >0,05$). Entretanto, o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{9,36}=15,40$; $p <0,01$) e houve interação significativa entre os efeitos do glutamato e do tempo de incubação ($F_{9,36}= 2,04$; $p <0,05$). Com tempos de incubação a partir de 10 minutos o glutamato aumentou seu efeito sobre a p42 total e sobre a forma fosforilada. O teste t , mostrou que aos 5 e 50 minutos de incubação o efeito do glutamato sobre a p42 total foi significativamente maior que seu efeito sobre a P-p42 ($p <0,05$). O painel **B** apresenta o efeito do peróxido de hidrogênio (1000 μ M) em relação ao controle, sobre a P-p42 (ativa) e p42 total. A ANOVA 2x10 não mostrou efeito significativo do peróxido de hidrogênio sobre a concentração da P-p42 ($F_{1,4}= 4,24$; $p >0,05$) e nem da p42 total ($F_{1,4}=2,01$; $p >0,05$), com relação ao controle; o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{8,32} = 2,28$; $p <0,05$) para a P-p42 mas não para a p42 total ($F_{8,32}= 1,78$; $p >0,05$). A comparação, entre P-42p e p42 total, com relação aos efeitos do peróxido de hidrogênio, mostrou que não houve diferença significativa ($F_{1,4}= 2,53$; $p >0,05$). Entretanto, o tempo de incubação teve efeito significativo ($F_{9,36}=2,84$; $p <0,05$) e não houve interação significativa entre os efeitos do peróxido de hidrogênio e do tempo de incubação ($F_{9,36}= 1,47$; $p >0,05$). O teste t , mostrou que aos 20, 30 e 50 minutos o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a P-p42 foi significativamente

maior que seu efeito sobre a p42 total ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

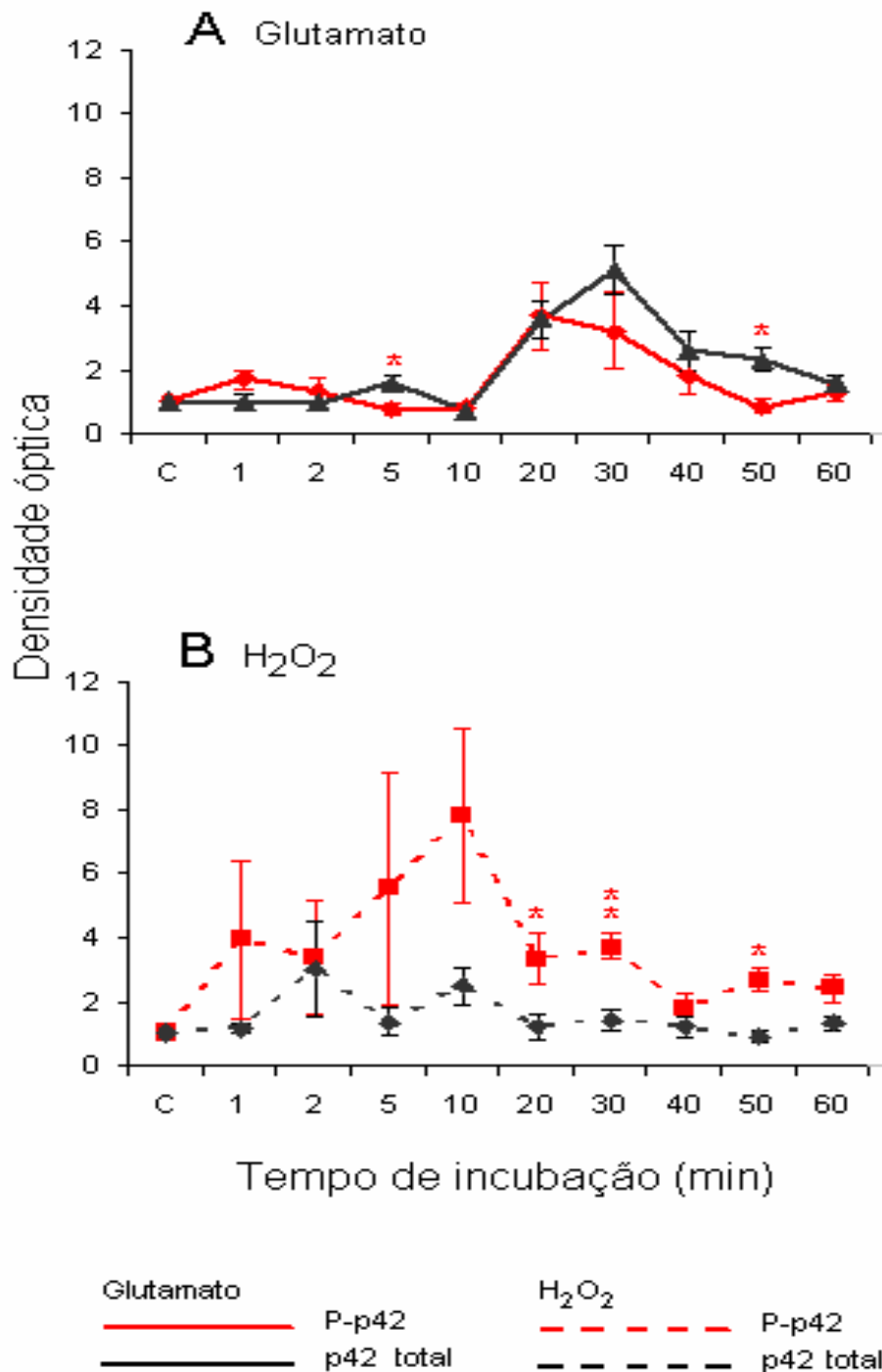


Figura 27 painéis **A e B**: efeitos do glutamato 100 μ M e do peróxido de hidrogênio 1000 μ M, respectivamente, sobre a concentração da P-p42 (forma ativa) e p42 total. * $p < 0,05$, e ** $p < 0,001$.

II.5 DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos que o efeito da excitabilidade de altas concentrações de glutamato, assim como, o estresse oxidativo causado pela espécie reativa de oxigênio, peróxido de hidrogênio, provocaram uma significativa perda de neurônios corticais de culturas de 12 dias. Esse efeito do glutamato, provavelmente, se deve a uma hiperativação de receptores ionotrópicos presentes na membrana plasmática desses neurônios. Os receptores mGluR1 e mGluR5 são expressos em culturas de 7 a 10 dias de neurônios corticais de ratos (Huang e cols. 2005), enquanto, receptores ionotrópicos são apenas expressos em neurônio em culturas de pelo menos 12 dias (Uberti e cols. 1998). Os resultados obtidos por Kajta e cols., (2004) indicam uma diferença regional no tempo de expressão dos receptores NMDA. Esses autores verificaram que, diferentemente dos neurônios hipocâmpais, neurônios do córtex em cultura, acima de 10 dias, expressam receptores ionotrópicos do tipo NMDA.

No presente trabalho, observamos que 1 μM de glutamato não teve efeito significativo sobre a viabilidade de neurônios corticais, ao contrário das concentrações de 10 μM e 100 μM cujo efeito foi significativo. Portanto, concentrações relativamente baixas de glutamato não são suficientes para induzir a morte celular. Dados da literatura mostram que, uma baixa concentração extracelular, fisiológica, deste neurotransmissor (1-3 μM) é mantida através de transportadores específicos (Danbolt, 2001; Huang e Bergles, 2004), indicando, portanto, que uma concentração de 1 μM não seria suficiente para provocar a morte celular. Nossos dados estão de acordo com aqueles obtidos por Rosenberg e cols. (1992) que verificaram também que altas concentrações de glutamato (205 μM) são excitotóxicas para as células. Observamos que culturas expostas à concentração de 100 μM de glutamato apresentaram uma redução na viabilidade celular em torno de 20%, 1 hora após o período de incubação e, de aproximadamente 23%

após 24 horas. Santos e cols. (2001), trabalhando com neurônios de retina, verificaram que 100 μ M de glutamato, agindo em receptores NMDA, reduziu a viabilidade celular em 26% em 1 hora de incubação e que 5 horas depois da estimulação, as células apresentaram uma morfologia nuclear do tipo apoptótica.

Verificamos também que, a viabilidade celular é reduzida de aproximadamente 60%, no primeiro minuto de incubação, por peróxido de hidrogênio na concentração de 1000 μ M e, chega a atingir uma redução de 90% após 24 h ou 48 h de incubação. O peróxido de hidrogênio comumente é usado para estudar mecanismos oxidativos envolvidos com a morte celular (Misonou e cols. 2000). Zhu e cols. (2005), utilizando concentrações variando de 200 a 400 μ M para estudar os efeitos do estresse oxidativo na membrana e no citoesqueleto de astrócitos, observaram mudanças morfológicas na actina e miosina relacionadas com os processos de polimerização e despolimerização. Demonstraram também que, quanto maior a concentração de peróxido de hidrogênio maior a peroxidação das membranas lipídicas de astrócitos e neurônios.

Para verificar se o glutamato ou o peróxido de hidrogênio alteram processos de regulação de proteínas por fosforilação, decidimos, como um primeiro passo, estudar o efeito desses tratamentos, isoladamente, sobre o perfil de fosforilação das fosfotirosinas-proteínas, baseando-se no fato de que, mudanças nas proteínas fosfotirosinas é um evento primário em vias de sinalização celular. Verificamos que, com relação à condição controle, o peróxido de hidrogênio provocou uma alteração significativa no perfil de fosforilação de várias fosfoproteínas-tirosinas de peso molecular na faixa de 50 a 250 KD. Resultados similares foram obtidos por Kanterewicz e cols (1998) que observaram, em fatias do hipocampo, um aumento da fração de fosfotirosinas totais, após 5 e 10 min de incubação com peróxido de hidrogênio 1mM e 10mM. Por outro lado, com relação à condição controle, observamos uma diminuição

significativa na fosforilação de resíduos de tirosinas dessas fosfoproteínas provocadas por glutamato 100 μ M. Williamson e cols. (2002) verificaram que o tratamento de culturas corticais primárias de neurônios humano e de rato, expostas ao peptídeo β -amilóide, induz a um rápido aumento na fosforilação de várias fosfoproteínas-tirosinas, inclusive a proteína *tau*.

O próximo passo foi verificar se uma alta concentração de glutamato ou peróxido de hidrogênio tinham efeitos sobre o nível de fosforilação e/ou concentração total da proteína associada aos microtúbulos, fosfoproteína *tau*, e de outras fosfoproteínas da classe das cinases.

Os resultados dos experimentos com a proteína *tau* mostraram que o tratamento com glutamato, detectado através do uso do anticorpo monoclonal *tau-1*, levou a um aumento significativo na defosforilação desta proteína. No entanto, um achado curioso é que o glutamato não teve efeito sobre a concentração da forma fosforilada detectada por um anticorpo específico (PHF-1) para três das isoformas dessa proteína. Esses dados, sugerem que, esse aumento pode ser o resultado de um efeito na expressão da proteína ou uma diminuição da forma fosforilada (através da ativação de fosfatases e/ou inibição de cinases) correspondente as outras isoformas não detectadas pelo anticorpo PHF-1. A ativação de fosfatases, induzida pelo Ca^{+2} , tem sido sugerida ser um mecanismo responsável pela defosforilação da *tau* (Saito e cols. 1995).

O tratamento com peróxido de hidrogênio provocou um aumento significativo na concentração da forma defosforilada (detectado com o anticorpo *tau-1*) e uma diminuição da forma fosforilada das isoformas detectadas com o anticorpo PHF-1. No entanto, parece que, o efeito que resultou no aumento da forma defosforilada não poderia ser explicado pela diminuição da fosforilação, conforme detectado pelo anticorpo PHF-1, pois, a intensidade dos efeitos tem apenas uma correspondência

parcial. Isso também sugere um possível efeito do peróxido de hidrogênio sobre a expressão dessa proteína.

A produção de radicais livres parece estar envolvida com a excitotoxicidade provocada pelo glutamato, podendo representar uma contribuição importante nos mecanismos de degeneração causada por exposição a níveis tóxicos de glutamato (Beal, 1995; Dugan e cols. 1995). Como, no presente trabalho, tanto o peróxido de hidrogênio quanto o glutamato provocaram um aumento da forma defosforilada da proteína *tau*, levantamos a hipótese de um possível envolvimento do estresse oxidativo no efeito do glutamato sobre o nível de fosforilação da *tau*. No entanto, se considerarmos a curva de tempo dos dois processos, a qual indica que o glutamato induz um aumento da forma defosforilada de maneira temporalmente diferente do peróxido de hidrogênio. Essa nossa hipótese provavelmente não estaria correta e, portanto, esse dado necessita ainda de maiores esclarecimentos. A defosforilação da *tau* causa alteração do citoesqueleto que ocorre durante a excitotoxicidade, levando também a mudanças no nível de fosforilação de outras proteínas do citoesqueleto, tais como, MAP1b, MAP2c e neurofilamentos (Yang e cols. 1995; Pang e cols. 1996).

O tratamento de culturas de neurônios com β amilóide parece induzir a produção de radicais livres, com conseqüente morte celular (Behl e cols. 1994; Café e cols. 1996). No entanto, conforme mencionado acima, o efeito do peptídeo β amilóide sobre a fosforilação (aumento da forma fosforilada) da *tau* é oposto ao verificado no presente estudo. Por outro lado, nossos dados estão de acordo com Davis e cols. (1997) que, utilizando cultura de neurônios, encontraram resultados na mesma direção, ou seja, uma diminuição da fosforilação da *tau* causada por glutamato após 4 horas de incubação e por peróxido de hidrogênio após 1 hora de incubação. Nossos dados, além de confirmar esses achados, acrescentam uma informação sobre prováveis características temporais desses efeitos. Davis e cols (1997) sugerem que, o fato do tratamento

de cultura de neurônios com peróxido de hidrogênio não causar um aumento na fosforilação da *tau*, mas, sim resultar na defosforilação desta proteína, possibilita um questionamento do papel do estresse oxidativo como causa direta da hiperfosforilação da *tau* e formação dos NFT (Davis e cols. 1997).

Com a finalidade de contribuir para o esclarecimento de outros aspectos, relacionados ao evento de regulação da proteína *tau* por fosforilação, estudamos o envolvimento de proteínas cinases no mecanismo de ação do glutamato (100 μ M) e do peróxido de hidrogênio (1000 μ M). Entre as cinases estudadas, se encontra a GSK3- $\alpha\beta$, que participa na regulação da fosforilação da *tau*. A GSK- β , é uma serina/treonina cinase, abundante no cérebro, e que tem papel na estabilização de microtúbulos (Takahashi e cols., 1995; Cohen, 1999). Observamos que, tanto o glutamato quanto o peróxido de hidrogênio causam um aumento significativo na concentração da forma fosforilada da GSK3- $\alpha\beta$, sendo que, esse efeito do glutamato e, não o do peróxido de hidrogênio, foi acompanhado por um aumento significativo na concentração da GSK-3- $\alpha\beta$ total, indicando um efeito do glutamato também na expressão da proteína. Além disto, verificamos que nas concentrações utilizadas, os efeitos do peróxido de hidrogênio antecederam os efeitos do glutamato. Lin e cols. (2004), usando células progenitoras neuronais, observaram um aumento na forma fosforilada da GSK3- α , mas não na isoforma P-GSK3- β , induzido por peróxido de hidrogênio (200 μ M). Esse efeito foi acompanhado por uma apoptose aguda dessas células. Schafer e cols., (2004) utilizando clones de células de hipocampo de camundongo, resistentes ao estresse oxidativo causados por agentes como o glutamato (2 mM até 40 mM) e peróxido de hidrogênio (1,2 mM), mostraram uma diminuição na concentração da GSK3 total e um aumento na Ser-P-GSK3- β , quando comparada com condições controles (células sensíveis). Observaram também que, a inibição da GSK-3 β com cloreto de lítio nas células sensíveis, aumentou a tolerância destes

neurônios aos efeitos da alta concentração de glutamato e peróxido de hidrogênio. Portanto, esses dados da literatura e os nossos resultados sugerem um papel da GSK3- $\alpha\beta$ no mecanismo de ação desses compostos e um possível envolvimento com a morte celular.

Outra cinase estudada foi a p38 MAPK, baseado em evidências do possível envolvimento dessa enzima no mecanismo de morte celular. Por exemplo, Feijoo e cols. (2004) sugerem que a *tau*, tem um papel adaptativo na resposta dos neurônios ao estresse e que isoformas da p38 podem contribuir para a hiperfosforilação da *tau* nas taupatias humanas. Peart e cols. (2007) observaram que, o estresse provocado pela isquemia desencadeia a ativação da p38 MAPK, sugerindo uma associação na falha da cardioproteção com uma falha na ativação da p38. Esses autores mostram que, a ativação da via da p38MAPK, com anisomicina, melhora a função pós-isquêmica em corações de idosos.

Existem também evidências de que a p38 MAPK parece ter papel importante na neurotoxicidade envolvendo o NO. Culturas de neurônios corticais expostas ao NO apresentaram um aumento na fosforilação da p38 MAPK, com 15 minutos de exposição. O íon Zn^{+2} parece participar da via de ativação da p38MAPK a qual envolve o NO, disfunção mitocondrial e formação de ROS (Bossy-Wetzel e cols. 2004).

No presente trabalho, verificamos que o estresse oxidativo, provocado por alta concentração de peróxido de hidrogênio, induz um aumento significativo na concentração da forma fosforilada da p38 (P-p38) e não altera a expressão da p38. No entanto, em tempo de incubação mais prolongado (50 min), observamos um efeito significativo do peróxido de hidrogênio sobre a expressão da p38. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Zhu e cols. (2005), que trabalhando com cultura de astrócitos, evidenciaram um aumento na fosforilação da p38 pelo peróxido de hidrogênio, sugerindo que a ativação de importantes MAPKs tenham um papel no mecanismo de morte celular induzido pelo estresse

oxidativo. No entanto, esses autores não estudaram o efeito desse tratamento em diferentes tempos de incubação. No presente trabalho observamos que o peróxido de hidrogênio inicia seu efeito a partir de 1 min de incubação, atingindo níveis significativos aos 2 min os quais se mantêm até 10 min.

Observamos também que o efeito do glutamato não alterou de forma significativa a concentração da P-p38 e nem a p38 total, quando comparado ao controle. No entanto, verificamos uma tendência de aumento na concentração da P-p38 a partir de 30 min de incubação. Nossos resultados não estão de acordo com os dados obtidos por Segura Torres e cols. (2006), que observaram uma indução da ativação da p38 pelo glutamato e sugeriram uma possível associação dessa alteração com o processo de apoptose neuronal causada por excitotoxicidade. Não temos uma explicação para essa contradição, mas uma hipótese a ser levantada seria o tipo de preparação utilizada, pois, esses autores trabalharam com tratamento *in vivo* seguido de avaliação em tecido cerebral cortical.

Outras sub-classes das MAPK cinases estudadas foram a p44 e p42 também denominada ERK1 e ERK2, respectivamente. Verificamos que o glutamato em alta concentração provocou um aumento significativo na concentração da forma fosforilada da p44 (P-p44) mas, não teve efeito na concentração da P-p42. Além disto, o glutamato induziu, nos tempos iniciais de incubação, um aumento na expressão da p44 total e da p42 total, sendo que para a p42 esse efeito foi detectado até 50 min de incubação. Santos e cols. (2001), observaram que a estimulação de receptores de glutamato, em neurônios de cultura de retina, com kainato ou glutamato na concentração de 100 μ M, induziu, em 2 min, a ativação das proteínas ERKs. Mao e cols. (2004) observaram também um aumento da fosforilação da ERK1/ERK2 em culturas de neurônios de estriato de ratos, estimuladas com glutamato. Resultados similares foram verificados na resposta de fosforilação da ERK1/ERK2 quando

ligantes seletivos foram usados para cada um dos três subtipos de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato). Com relação à P-p44 (ERK1), esses dados estão de acordo com os nossos resultados que indicam efeito similar em neurônios corticais, nos quais, a P-p44 foi alterada pelo glutamato na concentração de 100 μ M. No entanto, além do efeito sobre a P-p44 observamos, como mencionado acima, efeito do glutamato sobre a expressão da p44 e p42.

Em relação aos efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a atividade das MAPKs, p42 e p44, observamos apenas um aumento na forma ativa da P-p44, que foi significativo nos tempos de 20, 30 e 50 minutos de incubação. O estresse oxidativo induzido pelo peróxido não alterou a concentração total da p42 (ERK2) e nem da p44 (ERK1). Resultados similares foram obtidos por Kefaloyianni e cols. (2006) que, utilizando células de mioblasto expostas à 1mM de peróxido de hidrogênio, verificaram um aumento na forma fosforilada da ERK1/ERK2 e não observaram efeito na expressão (ERK1/ERK2 total). Da mesma maneira que verificamos em neurônios de córtex em cultura, Kanterewicz e cols. (1998) também observaram um aumento na fosforização da p44 e p42 em culturas de hipocampo com tempos de incubação de 5 e 10 minutos expostas a concentrações de peróxido de hidrogênio (1mM e 10 mM).

II.6 CONCLUINDO: nossos resultados indicam que, tanto uma alta concentração de glutamato (100 μ M) como de peróxido de hidrogênio (1000 μ M) causam alterações significativas na atividade da proteína *tau*. Ambos os estímulos são neurotóxicos para neurônios corticais em cultura e provocam alterações específicas e com diferenças temporais, em sub-classes de MAPKs. Alguns desses efeitos induzem disfunções em componentes do sistema de fosforilação relacionados apenas com mudanças conformacionais, ou seja, da forma ativa para a inativa ou vice-versa e, outros, provocam alterações na expressão de

fosfoproteínas importantes do sistema de sinalização celular, possivelmente, relacionadas com a morte neuronal.

CONCLUSÃO FINAL

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, o processo de envelhecimento resulta em déficits do aprendizado e memória espacial e que esses déficits não podem ser evitados por uma dieta restrita em 50% de calorias. O consumo crônico de etanol durante o envelhecimento, parece contrapor aspectos específicos desses déficits cognitivos, no caso, à flexibilidade comportamental que envolve a utilização de componentes espaciais. O consumo crônico de etanol reverteu as alterações provocadas pelo envelhecimento, elevando o índice de extinção para valores próximos dos indivíduos adultos. Os dados apresentados indicam também que o sistema serotoninérgico parece ter um importante papel como substrato biológico do aprendizado, da extinção de um comportamento e da memória espacial. A disfunção desse sistema neuroquímico, verificada no presente estudo, pode estar relacionada com alterações, verificadas por outros autores, em outros circuitos neurais como, por exemplo, o glutamatérgico. Os dados aqui obtidos, em experimentos com cultura celular, sugerem que, estímulos excitotóxicos, como alta concentração de glutamato, podem ser um dos fatores responsáveis pela morte neuronal a qual resulta, nessas condições, na perda progressiva da homeostase celular. Um dos fatores envolvidos nesse mecanismo, possivelmente está relacionado com os processos celulares que geram e tamponam espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, sendo alguns dos componentes do sistema de sinalização, relacionados à regulação de fosfoproteínas (p.ex. MAPks, GSK-3) um alvo importante dessas alterações funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, E. J. e WILLIAMS JR., R. C. Association of microtubules and neurofilaments in vitro is not mediated by atp. **Biochemistry** **23**:6031-6035, 1984a.

AAMODT, E. J. e WILLIAMS JR., R. C. Microtubule-associated protein connected microtubules and neurofilaments in vitro. **Biochemistry** **23**:6023-6031, 1984b.

ABDUL, H. M. e BUTTERFIELD, D. A. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: Implications for Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine** **42**:371-384, 2007.

ABRAMS, J. K., JOHNSON, P. L., HOLLIS, J. H., e LOWRY, C. A. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **1018**:46-57, 2004.

ACARIN, L., GONZALEZ, B., e CASTELLANO, B. Glial activation in the immature rat brain: implication of inflammatory transcription factors and cytokine expression. **Prog.Brain Res** **132**:375-389, 2001.

AMENTA, F., BRONZETTI, E., SABBATINI, M., e VEGA, J. A. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: A quantitative immunohistochemical studyS. **Microscopy Research and Technique** **43**:29-33, 1998.

ANTONELLI, T., TOMASINI, M. C., TATTOLI, M., CASSANO, T., FINETTI, S., MAZZONI, E., TRABACE, L., CARRATU, M. R., CUOMO, V., TANGANELLI, S., e FERRARO, L. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and carbon monoxide reduces extracellular glutamate levels in primary rat cerebral cortex cell cultures. **Neurochemistry International** **49**:568-576, 2006.

ARANEDA, S., MAGOUL, R., e CALAS, A. [H-3] Serotonin Retrograde Labeling in Serotonergic Fibers. **Brain Research Bulletin** **22**:951-958, 1989.

ARENDDT, T. Impairment in memory function and neurodegenerative changes in the cholinergic basal forebrain system induced by chronic intake of ethanol. **J Neural Transm.Suppl** **44**:173-187, 1994.

ARENDDT, T., ALLEN, Y., MARCHBANKS, R. M., SCHUGENS, M. M., SINDEN, J., LANTOS, P. L., e GRAY, J. A. Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system. **Neuroscience** **33**:435-462, 1989.

ARENDR, T., BIGL, V., ARENDR, A., e TENNSTEDT, A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. **Acta Neuropathol.(Berl)** **61**:101-108, 1983.

ARENDR, T., HOLZER, M., FRUTH, R., BRUCKNER, M. K., e GARTNER, U. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of beta/A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. **Neuroscience** **69**:691-698, 1995.

ARMSTRONG, D. M. e IKONOMOVIC, M. D. AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the hippocampal dentate gyrus of patients with Alzheimer disease. Evidence for hippocampal plasticity. **Mol.Chem.Neuropathol.** **28**:59-64, 1996a.

ARMSTRONG, D. M. e IKONOMOVIC, M. D. AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the hippocampal dentate gyrus of patients with Alzheimer disease. Evidence for hippocampal plasticity 1. **Mol.Chem.Neuropathol.** **28**:59-64, 1996b.

ARONICA, E. M., GORTER, J. A., GROOMS, S., KESSLER, J. A., BENNETT, M. V., ZUKIN, R. S., e ROSENBAUM, D. M. Aurintricarboxylic acid prevents GLUR2 mRNA down-regulation and delayed neurodegeneration in hippocampal CA1 neurons of gerbil after global ischemia. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **95**:7115-7120, 1998.

ARRIZA, J. L., ELIASOF, S., KAVANAUGH, M. P., e AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **94**:4155-4160, 1997.

ARRIZA, J. L., FAIRMAN, W. A., WADICHE, J. I., MURDOCH, G. H., KAVANAUGH, M. P., e AMARA, S. G. Functional Comparisons of 3 Glutamate Transporter Subtypes Cloned from Human Motor Cortex. **Journal of Neuroscience** **14**:5559-5569, 1994.

ASCHNER, M., SYVERSEN, T., SOUZA, D. O., ROCHA, J. B., e FARINA, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz.J Med.Biol.Res** **40**:285-291, 2007.

ATZORI, C., GHETTI, B., PIVA, R., SRINIVASAN, A. N., ZOLO, P., DELISLE, M. B., MIRRA, S. S., e MIGHELI, A. Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. **J Neuropathol.Exp.Neurol.** **60**:1190-1197, 2001.

BARAONA, E., ZEBALLOS, G. A., SHOICHET, L., MAK, K. M., e LIEBER, C. S. Ethanol consumption increases nitric oxide production in rats, and its peroxynitrite-mediated toxicity is attenuated by polyenylphosphatidylcholine. **Alcohol Clin.Exp.Res** **26**:883-889, 2002.

BARILI, P., DE CAROLIS, G., ZACCHEO, D., e AMENTA, F. Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. **Mech.Ageing Dev.** **106**:57-92, 1998.

BARJA, G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? **Biol.Rev Camb.Philos.Soc.** **79**:235-251, 2004a.

BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends Neurosci** **27**:595-600, 2004b.

BARJA, G., CADENAS, S., ROJAS, C., PEREZ-CAMPO, R., e LOPEZ-TORRES, M. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. **Free Radic Res** **21**:317-327, 1994.

BARJA, G. e HERRERO, A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. **FASEB J** **14**:312-318, 2000.

BARNES, N. M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology** **38**:1083-1152, 1999.

BARRACHINA, M., DALFÓ, E., PUIG, B., VIDAL, N., FREIXES, M., CASTAÑO, E., e FERRER, I. Amyloid-beta deposition in the cerebral cortex in Dementia with Lewy bodies is accompanied by a relative increase in AbetaPP mRNA isoforms containing the Kunitz protease inhibitor. **Neurochem.Int.** **46**:253-260, 2005.

BAUMANN, K., MANDELKOW, E. M., BIERNAT, J., PIWNICA-WORMS, H., e MANDELKOW, E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. **FEBS Lett.** **336**:417-424, 1993.

BAYDAS, G. e TUZCU, M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. **Exp.Neurol.** **194**:175-181, 2005.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann.Neurol.** **38**:357-366, 1995.

BEATTY, W. W., KATZUNG, V. M., MORELAND, V. J., e NIXON, S. J. Neuropsychological performance of recently abstinent alcoholics and cocaine abusers. **Drug Alcohol Depend.** **37**:247-253, 1995.

BECKER, J. T., BUTTERS, N., RIVOIRA, P., e MILIOTIS, P. Asking the right questions: problem solving in male alcoholics and male alcoholics with Korsakoff's syndrome. **Alcohol Clin.Exp.Res** **10**:641-646, 1986.

BECKMAN, K. B. e AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev.** **78**:547-581, 1998.

BEHAN, M. e BROWNFIELD, M. S. Age-related changes in serotonin in the hypoglossal nucleus of rat: implications for sleep-disordered breathing. **Neurosci Lett.** **267**:133-136, 1999.

BEHBEHANI, M. M., JIANG, M. R., CHANDLER, S. D., e ENNIS, M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. **Pain** **40**:195-204, 1990.

BEHL, C., DAVIS, J. B., LESLEY, R., e SCHUBERT, D. Hydrogen-Peroxide Mediates Amyloid-Beta Protein Toxicity. **Cell** **77**:817-827, 1994.

BENNETT-CLARKE, C. A., CHIAIA, N. L., e RHOADES, R. W. Thalamocortical afferents in rat transiently express high-affinity serotonin uptake sites. **Brain Res** **733**:301-306, 1996.

BEVILACQUA, L., RAMSEY, J. J., HAGOPIAN, K., WEINDRUCH, R., e HARPER, M. E. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. **Am.J Physiol Endocrinol.Metab** **289**:E429-E438, 2005.

BI, R., BROUTMAN, G., FOY, M. R., THOMPSON, R. F., e BAUDRY, M. The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus
2. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **97**:3602-3607, 2000.

BINDER, L. I., GUILLOZET-BONGAARTS, A. L., GARCIA-SIERRA, F., e BERRY, R. W. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease** **1739**:216-223, 2005.

BITTIGAU, P. e IKONOMIDOU, C. Glutamate in neurologic diseases. **J Child Neurol.** **12**:471-485, 1997.

BLARD, O., FEUILLETTE, S., BOU, J., CHAUMETTE, B., FREBOURG, T., CAMPION, D., e LECOURTOIS, M. Cytoskeleton proteins are modulators of mutant tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **Hum.Mol.Genet.** **16**:555-566, 2007.

BLIWISE, D. L. Principles and practice of sleep medicine. **3rd.**:26-42, 2000.

BOHM, K. J., VATER, W., STEINMETZER, P., KUSNETSOV, S. A., RODIONOV, V. I., GELFAND, V. I., e UNGER, E. Effect of MAP 1, MAP 2, and tau-proteins on structural parameters of tubulin assemblies. **Acta Histochem.Suppl** **39**:357-364, 1990.

BOKOR, H., CSAKI, A., KOCSIS, K., e KISS, J. Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. **Eur J Neurosci** **16**:1227-1239, 2002.

BORGES, M. M., PAULA-BARBOSA, M. M., e VOLK, B. Chronic alcohol consumption induces lipofuscin deposition in the rat hippocampus. **Neurobiol.Aging** **7**:347-355, 1986.

BOSSY-WETZEL, E., TALANTOVA, M. V., LEE, W. D., SCHOLZKE, M. N., HARROP, A., MATHEWS, E., GOTZ, T., HAN, J. H., ELLISMAN, M. H., PERKINS, G. A., e LIPTON, S. A. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. **Neuron** **41**:351-365, 2004.

BOUTON, M. E. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. **Biol.Psychiatry** **52**:976-986, 2002.

BRANDT, R. e LEE, G. The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. **J Neurochem.** **61**:997-1005, 1993.

BRANDT, R., LEGER, J., e LEE, G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. **J Cell Biol.** **131**:1327-1340, 1995.

BREDDT, D. S., HWANG, P. M., e SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature** **347**:768-770, 1990.

BROWN, A. W., MARLOWE, K. J., e BJELKE, B. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. **Neurobiol.Aging** **24**:607-614, 2003.

BRUCE-KELLER, A. J., UMBERGER, G., MCFALL, R., e MATTSON, M. P. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. **Ann.Neurol.** **45**:8-15, 1999.

BRUNS, J., Jr. e HAUSER, W. A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. **Epilepsia** **44 Suppl 10**:2-10, 2003.

BUÉE, L., BUSSIÈRE, T., BUÉE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A., e HOF, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. **Brain Res Brain Res Rev** **33**:95-130, 2000.

BUÉE-SCHERRER, V., CONDAMINES, O., MOURTON-GILLES, C., JAKES, R., GOEDERT, M., PAU, B., e DELACOURTE, A. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. **Brain Res Mol.Brain Res** **39**:79-88, 1996.

BUHOT, M. C. Serotonin receptors in cognitive behaviors. **Curr.Opin.Neurobiol.** **7**:243-254, 1997.

BUHOT, M. C., MARTIN, S., e SEGU, L. Role of serotonin in memory impairment. **Ann.Med.** **32**:210-221, 2000.

BURES, J., BURESOVA, o., e HUSTON, J. Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour. **2nd**:83-84, 1983.

BURSCH, W., PAFPE, S., PUTZ, B., BARTHEL, G., e SCHULTE-HERMANN, R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. **Carcinogenesis** **11**:847-853, 1990.

BUTTERFIELD, D. A., CASTEGNA, A., LAUDERBACK, C. M., e DRAKE, J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. **Neurobiol.Aging** **23**:655-664, 2002.

CACCAMO, A., ODDO, S., SUGARMAN, M. C., AKBARI, Y., e LAFERLA, F. M. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. **Neurobiol.Aging** **26**:645-654, 2005.

CADETE-LEITE, A., ANDRADE, J. P., SOUSA, N., MA, W., e RIBEIRO-DASILVA, A. Effects of chronic alcohol consumption on the cholinergic innervation of the rat hippocampal formation as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry. **Neuroscience** **64**:357-374, 1995.

CAFÉ, C., TORRI, C., BERTORELLI, L., ANGERETTI, N., LUCCA, E., FORLONI, G., e MARZATICO, F. Oxidative stress after acute and chronic application of β -amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. **Neuroscience Letters** **203**:61-65, 1996.

CAGGIANO, D. M., JIANG, Y., e PARASURAMAN, R. Aging and repetition priming for targets and distracters in a working memory task. **Neuropsychol.Dev.Cogn B Aging Neuropsychol.Cogn** **13**:552-573, 2006.

CALAPAI, G., MAZZAGLIA, G., SAUTEBIN, L., COSTANTINO, G., MARCIANO, M. C., CUZZOCREA, S., DI ROSA, M., e CAPUTI, A. P. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. **Psychopharmacology (Berl)** **125**:398-401, 1996.

CANO, E. e MAHADEVAN, L. C. Parallel Signal-Processing Among Mammalian Mapks
128. **Trends in Biochemical Sciences** **20**:117-122, 1995.

CARRIER, M. F., SIMON, C., CASSOLY, R., e PRADEL, L. A. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. **Biochimie** **66**:305-311, 1984.

CARNEY, E. W., ZABLOTNY, C. L., MARTY, M. S., CRISSMAN, J. W., ANDERSON, P., WOOLHISER, M., e HOLSAPPLE, M. The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats. **Toxicol.Sci.** **82**:237-249, 2004.

CARNEY, J. M., STARKE-REED, P. E., OLIVER, C. N., LANDUM, R. W., CHENG, M. S., WU, J. F., e FLOYD, R. A. Reversal of age-related increase in

brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **88**:3633-3636, 1991.

CARPENTER, A. F., CARPENTER, P. W., e MARKESBERY, W. R. Morphometric analysis of microglia in Alzheimer's disease. **J Neuropathol.Exp.Neurol.** **52**:601-608, 1993.

CARVALHO, F. M., PEREIRA, S. R. C., PIRES, R. G. W., FERRAZ, V. P., ROMANO-SILVA, M. A., OLIVEIRA-SILVA, L. F., e RIBEIRO, A. M. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** **83**:481-489, 2006.

CASAMENTI, F., SCALI, C., VANNUCCHI, M. G., BARTOLINI, L., e PEPEU, G. Long-term ethanol consumption by rats: effect on acetylcholine release in vivo, choline acetyltransferase activity, and behavior. **Neuroscience** **56**:465-471, 1993.

CERMAK, L. S. Cognitive-processing deficits in chronic alcohol abusers. **Alcohol Health and Research World** **14**:130-136, 1990.

CHAVES, M. M., ROCHA-VIEIRA, E., SILVA, R. D. L. E., DOS REIS, A. P., e NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of Ageing and Development** **104**:103-109, 1998.

CHENG, F. C., KUO, J. S., CHIA, L. G., TSAI, T. H., e CHEN, C. F. Rapid Measurement of the Monoamine Content in Small Volumes of Rat Plasma. **Journal of Chromatography B-Biomedical Applications** **654**:177-183, 1994.

CHOI, D. W. Calcium-Mediated Neurotoxicity - Relationship to Specific Channel Types and Role in Ischemic Damage. **Trends in Neurosciences** **11**:465-469, 1988.

CICCIA, R. M. e LANGLAIS, P. J. An examination of the synergistic interaction of ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. **Alcohol Clin.Exp.Res.** **24**:622-634, 2000.

CLARK, A. S., MAGNUSSON, K. R., e COTMAN, C. W. In vitro Autoradiography of Hippocampal Excitatory Amino-Acid Binding in Aged Fischer 344 Rats - Relationship to Performance on the Morris Water Maze. **Behavioral Neuroscience** **106**:324-335, 1992.

CLARKE, P. G. H. e EGLOFF, M. Combined Effects of Deafferentation and De-Efferentation on Isthmo-Optic Neurons During the Period of Their Naturally-Occurring Cell-Death. **Anatomy and Embryology** **179**:103-108, 1988.

COHEN, P. e COHEN, P. T. W. Protein Phosphatases Come of Age. **Journal of Biological Chemistry** **264**:21435-21438, 1989.

COLTON, C. A., SNELL, J., CHERNYSHEV, O., e GILBERT, D. L. Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **738**:54-63, 1994.

COOPER, J. R., BLOOM, F. E., e ROTH, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology. **7th.**:1996.

CORREAS, I., PADILLA, R., e AVILA, J. The Tubulin-Binding Sequence of Brain Microtubule-Associated Proteins, Tau and Map-2, Is Also Involved in Actin Binding. **Biochemical Journal** **269**:61-64, 1990.

COYLE, J. T. e PUTTFARCKEN, P. Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders. **Science** **262**:689-695, 1993.

CRAIK, F. I. M., MOSCOVITCH, M., e MCDOWD, J. M. Contributions of Surface and Conceptual Information to Performance on Implicit and Explicit Memory Tasks. **Journal of Experimental Psychology-Learning Memory and Cognition** **20**:864-875, 1994.

CROW, T. J., CROSS, A. J., COOPER, S. J., DEAKIN, J. F. W., FERRIER, I. N., JOHNSON, J. A., JOSEPH, M. H., OWEN, F., POULTER, M., LOFTHOUSE, R., CORSELLIS, J. A. N., CHAMBERS, D. R., BLESSED, G., PERRY, E. K., PERRY, R. H., e TOMLINSON, B. E. Neurotransmitter receptors and monoamine metabolites in the brains of patients with Alzheimer-type dementia and depression, and suicides. **Neuropharmacology** **23**:1561-1569, 1984.

CULLEN, K. M., KOCSI, Z., e STONE, J. Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhaemorrhages. **Neurobiol.Aging** **27**:1786-1796, 2006.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology** **65**:1-105, 2001.

DAOUST, M., ERNOUF, D., NARCISSE, G., KOUPERNIK, M., e HANTOUCHE, M. Alcohol and Serotonergic System. **Annales Medico-Psychologiques** **150**:143-146, 1992.

DAVIDOFF, M. S. e LOLOVA, I. S. Age-related changes in serotonin-immunoreactivity in the telencephalon and diencephalon of rats. **J.Hirnforsch.** **32**:745-753, 1991.

DAVIS, D. R., ANDERTON, B. H., BRION, J. P., REYNOLDS, C. H., e HANGER, D. P. Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. **Journal of Neurochemistry** **68**:1590-1597, 1997.

DAVIS, V. E., BROWN, H., HUFF, J. A., e CASHAW, J. L. Alteration of Serotonin Metabolism to 5-Hydroxytryptophol by Ethanol Ingestion in Man. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** **69**:132-&, 1967.

DE LUCA, C. R., WOOD, S. J., ANDERSON, V., BUCHANAN, J. A., PROFFITT, T. M., MAHONY, K., e PANTELIS, C. Normative data from the CANTAB. I: development of executive function over the lifespan. **J Clin.Exp.Neuropsychol.** **25**:242-254, 2003.

DE MAGALHAES, J. P. e SANDBERG, A. Cognitive aging as an extension of brain development: a model linking learning, brain plasticity, and neurodegeneration. **Mech.Ageing Dev.** **126**:1026-1033, 2005.

DE PRIL, R., FISCHER, D. F., e VAN LEEUWEN, F. W. Conformational diseases: an umbrella for various neurological disorders with an impaired ubiquitin-proteasome system. **Neurobiol.Aging** **27**:515-523, 2006.

DECKER, M. W. The Effects of Aging on Hippocampal and Cortical Projections of the Forebrain Cholinergic System. **Brain Research Reviews** **12**:423-438, 1987.

DEFRANCO, C., TARBOX, A. R., e MCLAUGHLIN, E. J. Cognitive deficits as a function of years of alcohol abuse. **Am.J Drug Alcohol Abuse** **11**:279-293, 1985.

DEITMER, J. W., BROER, A., e BROER, S. Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. **Journal of Neurochemistry** **87**:127-135, 2003.

DELACOURTE, A. Tauopathies: recent insights into old diseases
1. **Folia Neuropathol.** **43**:244-257, 2005.

DEWAR, D., CHALMERS, D. T., GRAHAM, D. I., e MCCULLOCH, J. Glutamate metabotropic and AMPA binding sites are reduced in Alzheimer's disease: an autoradiographic study of the hippocampus. **Brain Res** **553**:58-64, 1991.

DIBATTISTA, D. e JOACHIM, D. Dietary energy shortage and ethanol intake in golden hamsters. **Alcohol** **15**:55-63, 1998.

DICKSON, D. W., FARLO, J., DAVIES, P., CRYSTAL, H., FULD, P., e YEN, S. H. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. **Am.J Pathol.** **132**:86-101, 1988.

DIETRICH, W. D., HALLEY, M., ALONSO, O., GLOBUS, M. Y., e BUSTO, R. Intraventricular infusion of N-methyl-D-aspartate. 2. Acute neuronal consequences. **Acta Neuropathol.(Berl)** **84**:630-637, 1992.

DILLON, K. A., GROSS-ISSEROFF, R., ISRAELI, M., e BIEGON, A. Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol. **Brain Res** **554**:56-64, 1991.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., e MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci** **22**:391-397, 1999.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. **Pharmacol.Ther.** **81**:163-221, 1999.

DODD, P. R., BECKMANN, A. M., DAVIDSON, M. S., e WILCE, P. A. Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. **Neurochemistry International** **37**:509-533, 2000.

DOLEZAL, V. e TUCEK, S. Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices. **J Neurochem.** **36**:1323-1330, 1981.

DOMBRÁDI, V. Structure and function of protein phosphatases. **European Journal of Biochemistry** **269**:1049-1049, 2002.

DOMÍNGUEZ, R., CRUZ-MORALES, S. E., CARVALHO, M. C., XAVIER, M., e BRANDAO, M. L. Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. **Physiol Behav.** **80**:203-210, 2003.

DOPKINS, S., KOVNER, R., e GOLDMEIER, E. Acquisition of a new color name in amnesics and normal controls. **Cortex** **26**:189-200, 1990.

DRECHSEL, D. N., HYMAN, A. A., COBB, M. H., e KIRSCHNER, M. W. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. **Mol.Biol.Cell** **3**:1141-1154, 1992.

DREW, B., PHANEUF, S., DIRKS, A., SELMAN, C., GREDILLA, R., LEZZA, A., BARJA, G., e LEEUWENBURGH, C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. **Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol** **284**:R474-R480, 2003.

DREWES, G., EBNETH, A., PREUSS, U., MANDELKOW, E. M., e MANDELKOW, E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. **Cell** **89**:297-308, 1997.

DREWES, G., LICHTENBERG-KRAAG, B., DORING, F., MANDELKOW, E. M., BIERNAT, J., GORIS, J., DOREE, M., e MANDELKOW, E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. **EMBO J** **11**:2131-2138, 1992.

DUAN, W. e MATTSON, M. P. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **J Neurosci Res** **57**:195-206, 1999.

DUBEY, A., FORSTER, M. J., LAL, H., e SOHAL, R. S. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. **Arch Biochem.Biophys.** **333**:189-197, 1996.

DUDEK, S. M. e JOHNSON, G. V. Postnatal changes in serine/threonine protein phosphatases and their association with the microtubules. **Brain Res Dev.Brain Res** **90**:54-61, 1995.

DUGAN, L. L., SENSI, S. L., CANZONIERO, L. M. T., HANDRAN, S. D., ROTHMAN, S. M., LIN, T. S., GOLDBERG, M. P., e CHOI, D. W. Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Cortical-Neurons Following Exposure to N-Methyl-D-Aspartate. **Journal of Neuroscience** **15**:6377-6388, 1995.

ECKLES-SMITH, K., CLAYTON, D., BICKFORD, P., e BROWNING, M. D. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. **Brain Res Mol.Brain Res** **78**:154-162, 2000.

ERECINSKA, M. e SILVER, I. A. Metabolism and Role of Glutamate in Mammalian Brain. **Progress in Neurobiology** **35**:245-296, 1990.

ERICSSON, M., POSTON, W. S., e FOREYT, J. P. Common biological pathways in eating disorders and obesity. **Addict.Behav** **21**:733-743, 1996.

ESTRADA-SÁNCHEZ, A. M., CAMACHO, A., MONTIEL, T., e MASSIEU, L. Cerebellar Granule Neurons are More Vulnerable to Transient Transport-Mediated Glutamate Release than to Glutamate Uptake Blockade. Correlation with Excitatory Amino Acids Levels. **Neurochem.Res** 2007.

FADDA, F. e ROSSETTI, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Prog.Neurobiol.** **56**:385-431, 1998.

FAGNI, L., ANGO, F., PERROY, J., e BOCKAERT, J. Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology** **15**:289-298, 2004.

FAIRMAN, W. A., VANDENBERG, R. J., ARRIZA, J. L., KAVANAUGH, M. P., e AMARA, S. G. An Excitatory Amino-Acid Transporter with Properties of A Ligand-Gated Chloride Channel. **Nature** **375**:599-603, 1995.

FEIJOO, C., CAMPBELL, D. G., JAKES, R., GOEDERT, M., e CUENDA, A. Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38d at Thr50 promotes microtubule assembly. **Cell Science** **118**:397-408, 2004.

FEIN, G., TORRES, J., PRICE, L. J., e DI, S., V Cognitive performance in long-term abstinent alcoholic individuals. **Alcohol Clin.Exp.Res** **30**:1538-1544, 2006.

FERNANDES, P. A., RIBEIRO, A. M., PEREIRA, R. F. S., MARRA, H. L. D., e PITTELLA, J. E. Chronic ethanol intake and ageing effects on cortical and basal forebrain cholinergic parameters: morphometric and biochemical studies. **Addiction Biology** **7**:29-36, 2002.

FERRER, I., BLANCO, R., CARMONA, M., PUIG, B., BARRACHINA, M., GOMEZ, C., e AMBROSIO, S. Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. **J Neural Transm.** **108**:1383-1396, 2001.

FINCH, C. E. Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. **Neurobiol.Aging** **24 Suppl 1**:S123-S127, 2003.

FLOOD, J. F., MORLEY, J. E., e LA REGINNA, M. Age-related changes in the pharmacological improvement of retention in senescence accelerated mouse (SAM). **Neurobiol.Aging** **14**:159-166, 1993.

FLOYD, R. A. e HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiol.Aging** **23**:795-807, 2002.

FONTANA, D. J., DANIELS, S. E., HENDERSON, C., EGLIN, R. M., e WONG, E. H. Ondansetron improves cognitive performance in the Morris water maze spatial navigation task. **Psychopharmacology (Berl)** **120**:409-417, 1995.

FRANCIS, P. T., PALMER, A. M., SNAPE, M., e WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol.Neurosurg.Psychiatry** **66**:137-147, 1999.

FRANDBSEN, A. e SCHOUSBOE, A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. **Int.J Dev.Neurosci** **8**:209-216, 1990.

FREMEAU, R. T., BURMAN, J., QURESHI, T., TRAN, C. H., PROCTOR, J., JOHNSON, J., ZHANG, H., SULZER, D., COPENHAGEN, D. R., STORM-MATHISEN, J., REIMER, R. J., CHAUDHRY, F. A., e EDWARDS, R. H. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **99**:14488-14493, 2002.

FREUND, G. Neurotransmitter function in relation to aging and alcoholism. In HARTFORD, J. T. e SAMORAJSKI, T.(Eds.). Alcoholism in the Elderly. New York: Raven Press, 1984. pp. 65-83.

FUKAGAWA, N. K. Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.** **222**:293-298, 1999.

GADEA, A. e LOPEZ-COLOME, A. M. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. **Journal of Neuroscience Research** **63**:453-460, 2001.

GAGE, F. H., DUNNETT, S. B., e BJORKLUND, A. Spatial learning and motor deficits in aged rats. **Neurobiol.Aging** **5**:43-48, 1984.

GAGE, F. H., DUNNETT, S. B., e BJORKLUND, A. Age-related impairments in spatial memory are independent of those in sensorimotor skills. **Neurobiol.Aging** **10**:347-352, 1989.

GALLAGHER, M. e BURWELL, R. D. Relationship of age-related decline across several behavioral domains. **Neurobiol.Aging** **10**:691-708, 1989.

GALLANT, D. The serotonin system and alcoholism: basic research and clinical problems. **Alcohol Clin.Exp.Res** **17**:1345-1993.

GANGULI, M., VANDER, B. J., SAXTON, J. A., SHEN, C., e DODGE, H. H. Alcohol consumption and cognitive function in late life: a longitudinal community study. **Neurology** **65**:1210-1217, 2005.

GARRIDO, M. J. e FERNANDEZ-GUINEA, S. [Neuropsychological deficits in alcoholics: some implications for road safety]. **Rev Neurol.** **38**:277-283, 2004.

GARVER, T. D., OYLER, G. A., HARRIS, K. A., POLAVARAPU, R., DAMUNI, Z., LEHMAN, R. A., e BILLINGSLEY, M. L. Tau phosphorylation in brain slices: pharmacological evidence for convergent effects of protein phosphatases on tau and mitogen-activated protein kinase. **Mol.Pharmacol.** **47**:745-756, 1995.

GEDDES, J. W., ULAS, J., BRUNNER, L. C., CHOE, W., e COTMAN, C. W. Hippocampal excitatory amino acid receptors in elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease: non-N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroscience** **50**:23-34, 1992.

GEGELASHVILI, G. e SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Research Bulletin** **45**:233-238, 1998.

GOEDERT, M., HASEGAWA, M., JAKES, R., LAWLER, S., CUENDA, A., e COHEN, P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. **FEBS Lett.** **409**:57-62, 1997.

GOEDERT, M., JAKES, R., CROWTHER, R. A., COHEN, P., VANMECHELEN, E., VANDERMEEREN, M., e CRAS, P. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. **Biochem.J** **301** (Pt 3):871-877, 1994.

GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., JAKES, R., RUTHERFORD, D., e CROWTHER, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. **Neuron** **3**:519-526, 1989a.

GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., POTIER, M. C., ULRICH, J., e CROWTHER, R. A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats:

differential expression of tau protein mRNAs in human brain. **EMBO J** **8**:393-399, 1989b.

GORMAN, A. M., MCGOWAN, A., O'NEILL, C., e COTTER, T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. **J Neurol.Sci.** **139 Suppl**:45-52, 1996.

GOTTFRIES, C. G. Drug treatment of cognitive impairment and emotional disturbance in the elderly. Symposium: The biological rationale for drug treatment psychiatric patient. **Nordic.J.Psych.** **47**:59-65, 1993.

GOTZ, J., SCHILD, A., HOERNDLI, F., e PENNANEN, L. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. **Int.J.Dev.Neurosci.** **22**:453-465, 2004.

GRAD, B. R. e ROZENCWAIG, R. The role of melatonin and serotonin in aging: update. **Psychoneuroendocrinology** **18**:283-295, 1993.

GREDILLA, R. e BARJA, G. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. **Endocrinology** **146**:3713-3717, 2005.

GREDILLA, R., BARJA, G., e LOPEZ-TORRES, M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. **J Bioenerg.Biomembr.** **33**:279-287, 2001.

GREEN, K. L., GATTO, G. J., e GRANT, K. A. The nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (N omega-nitro-L-arginine methyl ester) does not produce discriminative stimulus effects similar to ethanol. **Alcohol Clin.Exp.Res** **21**:483-488, 1997.

GREENE, L. A. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. **J Cell Biol.** **78**:747-755, 1978.

GREENWOOD, J. A., SCOTT, C. W., SPREEN, R. C., CAPUTO, C. B., e JOHNSON, G. V. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. **J Biol.Chem.** **269**:4373-4380, 1994.

GUAN, Z., GIUSTETTO, M., LOMVARDAS, S., KIM, J. H., MINIACI, M. C., SCHWARTZ, J. H., THANOS, D., e KANDEL, E. R. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. **Cell** **111**:483-493, 2002.

GUILLOZET-BONGAARTS, A. L., GARCIA-SIERRA, F., REYNOLDS, M. R., HOROWITZ, P. M., FU, Y., WANG, T., CAHILL, M. E., BIGIO, E. H., BERRY, R. W., e BINDER, L. I. Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. **Neurobiol.Aging** **26**:1015-1022, 2005.

GUTEKUNST, C. A., LI, S. H., YI, H., MULROY, J. S., KUEMMERLE, S., JONES, R., RYE, D., FERRANTE, R. J., HERSCH, S. M., e LI, X. J. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. **J.Neurosci.** **19**:2522-2534, 1999.

HAGEN, T. M., INGERSOLL, R. T., WEHR, C. M., LYKKESFELDT, J., VINARSKY, V., BARTHOLOMEW, J. C., SONG, M. H., e AMES, B. N. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **95**:9562-9566, 1998.

HALBERSTADT, A. L. e BALABAN, C. D. Organization of projections from the raphe nuclei to the vestibular nuclei in rats. **Neuroscience** **120**:573-594, 2003.

HALLIDAY, G., BAKER, K., e HARPER, C. Serotonin and alcohol-related brain damage. **Metab Brain Dis.** **10**:25-30, 1995.

HALLIDAY, G., ELLIS, J., HEARD, R., CAINE, D., e HARPER, C. Brainstem serotonergic neurons in chronic alcoholics with and without the memory impairment of Korsakoff's psychosis. **J Neuropathol.Exp.Neurol.** **52**:567-579, 1993.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem.** **59**:1609-1623, 1992.

HAMBURGER, V. Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. **J Comp Neurol.** **160**:535-546, 1975.

HAMBURGER, V. e LEVIMONTALCINI, R. Proliferation, Differentiation and Degeneration in the Spinal Ganglia of the Chick Embryo Under Normal and Experimental Conditions. **Journal of Experimental Zoology** **111**:457-501, 1949.

HANGER, D. P., HUGHES, K., WOODGETT, J. R., BRION, J. P., e ANDERTON, B. H. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. **Neurosci Lett.** **147**:58-62, 1992.

HARDY, J. Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? **Curr.Alzheimer Res** **3**:71-73, 2006.

HARDY, J. e ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends Pharmacol.Sci.** **12**:383-388, 1991.

HARDY, J. A. e HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** **256**:184-185, 1992.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol** 1955.

HERRERA, A. J., MACHADO, A., e CANO, J. The influence of age on neurotransmitter turnover in the rat's superior colliculus. **Neurobiol.Aging** **12**:289-294, 1991.

HIROKAWA, N. Microtubule Organization and Dynamics Dependent on Microtubule-Associated Proteins. **Current Opinion in Cell Biology** **6**:74-81, 1994.

HOCKENBERY, D. M., OLTVAI, Z. N., YIN, X. M., MILLIMAN, C. L., e KORSMEYER, S. J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell** **75**:241-251, 1993.

HODGES, H., SOWINSKI, P., SINDEN, J. D., NETTO, C. A., e FLETCHER, A. The selective 5-HT₃ receptor antagonist, WAY100289, enhances spatial memory in rats with ibotenate lesions of the forebrain cholinergic projection system. **Psychopharmacology (Berl)** **117**:318-332, 1995.

HOLLMANN, M., BOULTER, J., MARON, C., BEASLEY, L., SULLIVAN, J., PECHT, G., e HEINEMANN, S. Zinc Potentiates Agonist-Induced Currents at Certain Splice Variants of the Nmda Receptor. **Neuron** **10**:943-954, 1993.

HOLLMANN, M. e HEINEMANN, S. Cloned Glutamate Receptors. **Annual Review of Neuroscience** **17**:31-108, 1994.

HONIG, W. K. Studies of working memory in the pigeon. In HULSE, S. H., FOWLER, H., e HONIG, W. K.(Eds.). Cognitive processes in animal behavior. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1978.

HOOZEMANS, J. J. M., VEERHUIS, R., ROZEMULLER, J. M., e EIKELENBOON, P. Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. **Int.J Dev.Neurosci** **24**:157-165, 2005.

HUANG, W. D., FEI, Z., e ZHANG, X. Traumatic injury induced homer-1a gene expression in cultured cortical neurons of rat. **Neurosci Lett.** **389**:46-50, 2005.

HUANG, X., MOIR, R. D., TANZI, R. E., BUSH, A. I., e ROGERS, J. T. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **1012**:153-163, 2004.

HUANG, Y. H. e BERGLES, D. E. Glutamate transporters bring competition to the synapse. **Curr.Opin.Neurobiol.** **14**:346-352, 2004.

HUNT, J. V. e WOLFF, S. P. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. **Free Radic Res Commun.** **12-13 Pt 1**:115-123, 1991.

HYMAN, A. A. e KARSENTI, E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. **Cell** **84**:401-410, 1996.

IAMPOLSKII, L. I. e GALIMOV, I. Evolutionary genetics of aging in Daphnia. **Zh.Obshch.Biol.** **66**:416-424, 2005.

IKEDA, M., KOMIYAMA, T., SATO, I., HIMI, T., e MUROTA, S. Neuronal nitric oxide synthase is resistant to ethanol. **Life Sci.** **64**:1623-1630, 1999.

IKEDA, S., KISHIDA, S., YAMAMOTO, H., MURAI, H., KOYAMA, S., e KIKUCHI, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. **EMBO J** **17**:1371-1384, 1998.

IKEGAMI, K., MUKAI, M., TSUCHIDA, J., HEIER, R. L., MACGREGOR, G. R., e SETOU, M. TLL7 is a mammalian beta-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites. **J Biol.Chem.** **281**:30707-30716, 2006.

IKONOMOVIC, M. D., SHEFFIELD, R., e ARMSTRONG, D. M. AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the aged human hippocampal formation
1. **J Comp Neurol.** **359**:239-252, 1995.

INGEBRITSEN, T. S. e COHEN, P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. **Science** **221**:331-338, 1983.

INGRAM, D. K., WEINDRUCH, R., SPANGLER, E. L., FREEMAN, J. R., e WALFORD, R. L. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. **J Gerontol** **42**:78-81, 1987.

INOUE, H. e OKADA, Y. Roles of volume-sensitive chloride channel in excitotoxic neuronal injury. **J Neurosci** **27**:1445-1455, 2007.

IQBAL, K., ALONSO, A. C., GONG, C. X., KHATOON, S., PEI, J. J., WANG, J. Z., e GRUNDKE-IQBAL, I. Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. **J Neural Transm.Suppl** **53**:169-180, 1998.

IQBAL, K. e NOVAK, M. From tangles to tau protein. **Bratisl.Lek.Listy** **107**:341-342, 2006.

ISHIDA, A., SHIGERI, Y., TANIGUCHI, T., e KAMESHITA, I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. **Pharmacol.Ther.** **100**:291-305, 2003.

ISHIDA, A., TADA, Y., NIMURA, T., SUEYOSHI, N., KATOH, T., TAKEUCHI, M., FUJISAWA, H., TANIGUCHI, T., e KAMESHITA, I. Identification of major Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-binding proteins in brain: biochemical analysis of the interaction. **Arch Biochem.Biophys.** **435**:134-146, 2005.

ISHIGURO, K., TAKAMATSU, M., TOMIZAWA, K., OMORI, A., TAKAHASHI, M., ARIOKA, M., UCHIDA, T., e IMAHORI, K. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. **J Biol.Chem.** **267**:10897-10901, 1992.

ISHII, H. T., FORD, E. D., e KENNEDY, M. C. Physiological and ecological implications of adaptive reiteration as a mechanism for crown maintenance and longevity. **Tree Physiol** **27**:455-462, 2007.

ITO, U., SPATZ, M., WALKER, J. T., Jr., e KLATZO, I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. **Acta Neuropathol.(Berl)** **32**:209-223, 1975.

IWATA, N., HIGUCHI, M., e SAIDO, T. C. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. **Pharmacol.Ther.** **108**:129-148, 2005.

JACOBS, B. L. e AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev** **72**:165-229, 1992.

JACOBS, B. L. e FORNAL, C. A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology** **21**:9S-15S, 1999.

JÄKÄLÄ, P., SIRVIÖ, J., RIEKKINEN, P. J. Jr., e RIEKKINEN, P. J. Effects of *p*-chlorophenylalanine and methysergide on the performance of a working memory task. **Pharmacol.Biochem.Behav.** **44**:411-418, 1993.

JANCSIK, V., FILLIOL, D., e RENDON, A. Tau proteins bind to kinesin and modulate its activation by microtubules. **Neurobiology (Bp)** **4**:417-429, 1996.

JICHA, G. A., O'DONNELL, A., WEAVER, C., ANGELETTI, R., e DAVIES, P. Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. **J Neurochem.** **72**:214-224, 1999.

JOHNSON, G. V. Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. **J Neurochem.** **59**:2056-2062, 1992.

JUDGE, S., JUDGE, A., GRUNE, T., e LEEUWENBURGH, C. Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. **Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol** **286**:R254-R259, 2004.

JULIUS, D. Serotonin receptor knockouts: a moody subject. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **95**:15153-15154, 1998.

KAGAN, V. E., FABISIAK, J. P., SHVEDOVA, A. A., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., SCHOR, N. F., e KAWAI, K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. **FEBS Lett.** **477**:1-7, 2000.

KAJTA, M., DOMIN, H., GRYNKIEWICZ, G., e LASON, W. Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: An involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen

synthase kinase-3beta intracellular signaling pathway. **Neuroscience** **145**:592-604, 2007.

KAJTA, M., LASON, W., e KUPIEC, T. Effects of estrone on N-methyl-D-aspartic acid- and staurosporine-induced changes in caspase-3-like protease activity and lactate dehydrogenase-release: time- and tissue-dependent effects in neuronal primary cultures. **Neuroscience** **123**:515-526, 2004.

KANAI, Y. e HEDIGER, M. A. Primary Structure and Functional-Characterization of A High-Affinity Glutamate Transporter. **Nature** **360**:467-471, 1992.

KANDEL, E. R. e SCHWARTS, J. H. Principles of neural science. 1987.

KANDEL, E. R. Genes, synapses, and long-term memory. **J Cell Physiol** **173**:124-125, 1997.

KANTEREWICZ, B. I., KNAPP, L. T., e KLANN, E. Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus. **Journal of Neurochemistry** **70**:1009-1016, 1998.

KEFALOYIANNI, E., GAITANAKI, C., e BEIS, I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappa B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. **Cellular Signalling** **18**:2238-2251, 2006.

KEMPF, E. e MANDEL, P. Reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of norepinephrine, dopamine, serotonin, and related major metabolites. **Anal.Biochem.** **112**:223-231, 1981.

KERR, J. F. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. **J Pathol.** **105**:13-20, 1971.

KERR, J. F. R., GOBÉ, G. C., WINTERFORD, C. M., e HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. In SCHWARTZ, L. M. e OSBORNE, B. A.(Eds.). Cell death. New York: Academic Press, 1995. pp. 1-27.

KERR, J. F. R. e HARMON, B. V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In TOMEI, L. D. e COPE, F. O.(Eds.). Apoptosis: The molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. pp. 5-29.

KEUKER, J. I., KEIJSER, J. N., NYAKAS, C., LUITEN, P. G., e FUCHS, E. Aging is accompanied by a subfield-specific reduction of serotonergic fibers in the tree shrew hippocampal formation. **J Chem.Neuroanat.** **30**:221-229, 2005.

KEUNG, W. M., KUNZE, L., LI, D. J., e LAZO, O. Volitional ethanol consumption affects overall serotonin metabolism in Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Biochem.Biophys.Res Commun.** **271**:823-830, 2000.

- KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res** **239**:57-69, 1982.
- KOLLEGER, H., MCBEAN, G. J., e TIPTON, K. F. Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. **Biochem.Pharmacol.** **45**:260-264, 1993.
- KOSIK, K. S., ORECCHIO, L. D., BINDER, L., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M., e LEE, G. Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. **Neuron** **1**:817-825, 1988.
- KOSIK, K. S. e SHIMURA, H. Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. **Biochim.Biophys.Acta** **1739**:298-310, 2005.
- KOWALD, A. The mitochondrial theory of aging. **Biol.Signals Recept.** **10**:162-175, 2001.
- KRAMER, J. H., BLUSEWICZ, M. J., e PRESTON, K. A. The premature aging hypothesis: old before its time? **J Consult Clin.Psychol.** **57**:257-262, 1989.
- KRAUSE, K. H. Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. **Exp.Gerontol** **42**:256-262, 2007.
- KRAZEM, A., MONS, N., HIGUERET, P., e JAFFARD, R. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. **Neurosci Lett.** **338**:62-66, 2003.
- KURE, S., TOMINAGA, T., YOSHIMOTO, T., TADA, K., e NARISAWA, K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. **Biochem.Biophys.Res Commun.** **179**:39-45, 1991.
- KUROSINSKI, P., GUGGISBERG, M., e GOTZ, J. Alzheimer's and Parkinson's disease--overlapping or synergistic pathologies? **Trends Mol.Med.** **8**:3-5, 2002.
- LAAKE, J. H., SLYNGSTAD, T. A., HAUG, F. M. S., e OTTERSEN, O. P. Glutamine from Glial-Cells Is Essential for the Maintenance of the Nerve-Terminal Pool of Glutamate - Immunogold Evidence from Hippocampal Slice Cultures. **Journal of Neurochemistry** **65**:871-881, 1995.
- LATTAL, K. M. e ABEL, T. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. **Journal of Neuroscience** **21**:5773-5780, 2001.
- LEDERMAN, S. A. e ROSSO, P. Effects of Food Restriction on Fetal and Placental Growth and Maternal Body-Composition. **Growth** **44**:77-88, 1980.

LEDO, A., FRADE, J., BARBOSA, R. M., e LARANJINHA, J. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. **Mol.Aspects Med.** **25**:75-89, 2004.

LEE, S. J., CHUNG, Y. H., JOO, K. M., LIM, H. C., JEON, G. S., KIM, D., LEE, W. B., KIM, Y. S., e CHA, C. I. Age-related changes in glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 beta) immunoreactivity in the central nervous system of rats. **Neuroscience Letters** **409**:134-139, 2006.

LEE, V. M., GIASSON, B. I., e TROJANOWSKI, J. Q. More than just two peas in a pod: common amyloidogenic properties of tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. **Trends Neurosci** **27**:129-134, 2004.

LEONARD, B. E. Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. **Psychotherapy and Psychosomatics** **65**:66-75, 1996.

LEREA, L. S., CARLSON, N. G., e MCNAMARA, J. O. N-Methyl-D-Aspartate Receptors Activate Transcription of C-Fos and Ngfi-A by Distinct Phospholipase A(2)-Requiring Intracellular Signaling Pathways. **Molecular Pharmacology** **47**:1119-1125, 1995.

LEROY, K., YILMAZ, Z., e BRION, J. P. Increased level of active GSK-3 beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. **Neuropathology and Applied Neurobiology** **33**:43-55, 2007.

LETERRIER, J. F., LIEM, R. K. H., e SHELANSKI, M. L. Interactions Between Neurofilaments and Microtubule-Associated Proteins - A Possible Mechanism for Intraorganellar Bridging. **Journal of Cell Biology** **95**:982-986, 1982.

LETIEMBRE, M., HAO, W., LIU, Y., WALTER, S., MIHALJEVIC, I., RIVEST, S., HARTMANN, T., e FASSBENDER, K. Innate immune receptor expression in normal brain aging. **Neuroscience** 2007.

LEVKOVITZ, Y., RICHTERLEVIN, G., e SEGAL, M. Effect of 5-Hydroxytryptophane on Behavior and Hippocampal Physiology in Young and Old Rats. **Neurobiology of Aging** **15**:635-641, 1994.

LIAO, H., LI, Y. R., BRAUTIGAN, D. L., e GUNDERSEN, G. G. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. **Journal of Biological Chemistry** **273**:21901-21908, 1998.

LIN, H. J., WANG, X. T., SHAFFER, K. M., SASAKI, C. Y., e MA, W. Characterization of H2O2-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. **Febs Letters** **570**:102-106, 2004.

LINDEN, R. The Survival of Developing Neurons - A Review of Afferent Control. **Neuroscience** **58**:671-682, 1994.

LINNOILA, M., VIRKKUNEN, M., GEORGE, T., ECKARDT, M., HIGLEY, J. D., NIELSEN, D., e GOLDMAN, D. Serotonin, violent behavior and alcohol. **EXS** **71**:155-163, 1994.

LITTLE, J. T., BROOCKS, A., MARTIN, A., HILL, J. L., TUNE, L. E., MACK, C., CANTILLON, M., MOLCHAN, S., MURPHY, D. L., e SUNDERLAND, T. Serotonergic Modulation of Anticholinergic Effects on Cognition and Behavior in Elderly Humans. **Psychopharmacology** **120**:280-288, 1995.

LIU, Q., XIE, F., ROLSTON, R., MOREIRA, P. I., NUNOMURA, A., ZHU, X., SMITH, M. A., e PERRY, G. Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. **Mini.Rev Med.Chem.** **7**:171-180, 2007.

LIU, W. K., WILLIAMS, R. T., HALL, F. L., DICKSON, D. W., e YEN, S. H. Detection of A Cdc2-Related Kinase Associated with Alzheimer Paired Helical Filaments. **American Journal of Pathology** **146**:228-238, 1995.

LÓPEZ-TORRES, M., GREDILLA, R., SANZ, A., e BARJA, G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine** **32**:882-889, 2002.

LU, Q., SORIA, J. P., e WOOD, J. G. P44(Mpk) Map Kinase Induces Alzheimer-Type Alterations in Tau-Function and in Primary Hippocampal-Neurons. **Journal of Neuroscience Research** **35**:439-444, 1993.

LUINE, V. e HEARNS, M. Spatial Memory Deficits in Aged Rats - Contributions of the Cholinergic System Assessed by Chat. **Brain Research** **523**:321-324, 1990.

LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. **Neuroreport** **18**:297-300, 2007.

MANN, D. M. e JONES, D. Deposition of amyloid (A4) protein within the brains of persons with dementing disorders other than Alzheimer's disease and Down's syndrome. **Neurosci.Lett.** **109**:68-75, 1990.

MAO, L., TANG, Q., SAMDANI, S., LIU, Z., e WANG, J. Q. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. **Eur J Neurosci** **19**:1207-1216, 2004.

MARAGAKIS, N. J. e ROTHSTEIN, J. D. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. **Neurobiology of Disease** **15**:461-473, 2004.

MARTIN, L. J. Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. **J Neuropathol.Exp.Neurol.** **65**:1103-1110, 2006.

MARTIN, L. J., AL ABDULLA, N. A., BRAMBRINK, A. M., KIRSCH, J. R., SIEBER, F. E., e PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A

perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Research Bulletin 46**:281-309, 1998.

MARTIN, L. J., BRAMBRINK, A. M., LEHMANN, C., PORTERACAILLIAU, C., KOEHLER, R., ROTHSTEIN, J., e TRAYSTMAN, R. J. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. **Annals of Neurology 42**:335-348, 1997.

MARTIN, P. R., ADINOFF, B., LANE, E., STAPLETON, J. M., BONE, G. A. H., WEINGARTNER, H., LINNOILA, M., e ECKARDT, M. J. Fluvoxamine Treatment of Alcoholic Amnestic Disorder. **European Neuropsychopharmacology 5**:27-33, 1995.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A., BELL, K. P., e NOREMBERG, M. D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science 195**:1356-1358, 1997.

MASON, S. T. e FIBIGER, H. C. Possible Behavioral Function for Noradrenaline-Acetylcholine Interaction in Brain. **Nature 277**:396-397, 1979.

MATSUO, E. S., SHIN, R. W., BILLINGSLEY, M. L., VANDEVOORDE, A., OCONNOR, M., TROJANOWSKI, J. Q., e LEE, V. M. Y. Biopsy-Derived Adult Human Brain Tau Is Phosphorylated at Many of the Same Sites As Alzheimers-Disease Paired Helical Filament-Tau. **Neuron 13**:989-1002, 1994.

MATTSON, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms - Abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Medicine 3**:65-94, 2003.

MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell 2007**.

MATTSON, M. P., DUAN, W., e GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. **J.Neurochem. 84**:417-431, 2003.

MATUS, A. Stiff Microtubules and Neuronal Morphology. **Trends in Neurosciences 17**:19-22, 1994.

MCGEE, A. W. e BREDET, D. S. Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. **Current Opinion in Neurobiology 13**:111-118, 2003.

MELTZER, C. C., SMITH, G., DEKOSKY, S. T., POLLOCK, B. G., MATHIS, C. A., MOORE, R. Y., KUPFER, D. J., e REYNOLDS, C. F. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: The emerging role of functional imaging. **Neuropsychopharmacology 18**:407-430, 1998.

MENESES, A. Do serotonin(1-7) receptors modulate short and long-term memory? **Neurobiol.Learn.Mem. 87**:561-572, 2007.

- MENESES, A., MANUEL-APOLINAR, L., ROCHA, L., CASTILLO, E., e CASTILLO, C. Expression of the 5-HT receptors in rat brain during memory consolidation. **Behav.Brain Res** **152**:425-436, 2004.
- MERGNER, W. J., JONES, R. T., e TRUMP, B. F. Cell death: Mechanisms of acute and lethal cell injury. 1990.
- MISONOU, H., MORISHIMA-KAWASHIMA, M., e IHARA, Y. Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells. **Biochemistry** **39**:6951-6959, 2000.
- MODY, I. e MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. **Trends Pharmacol.Sci.** **16**:356-359, 1995.
- MORA, A., SABIO, G., GONZALEZ-POLO, R. A., CUENDA, A., ALESSI, D. R., ALONSO, J. C., FUENTES, J. M., SOLER, G., e CENTENO, F. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. **J Neurochem.** **78**:199-206, 2001.
- MORGANE, P. J., GALLER, J. R., e MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Prog.Neurobiol.** **75**:143-160, 2005.
- MORIN, L. P. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. **Ann.Med.** **31**:12-33, 1999.
- MORISHIMA-KAWASHIMA, M., HASEGAWA, M., TAKIO, K., SUZUKI, M., YOSHIDA, H., TITANI, K., e IHARA, Y. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. **J Biol.Chem.** **270**:823-829, 1995.
- MORISHIMA-KAWASHIMA, M. e KOSIK, K. S. The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active. **Mol.Biol.Cell** **7**:893-905, 1996.
- MOUSSEAU, D. D., RAO, V. L., e BUTTERWORTH, R. F. Alterations in serotonin parameters in brain of thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. **J Neurochem.** **67**:1113-1123, 1996.
- MULLER, W. E., STOLL, L., SCHUBERT, T., e GELBMANN, C. M. Central cholinergic functioning and aging. **Acta Psychiatr.Scand.Suppl** **366**:34-39, 1991.
- MURAI, T., OKUDA, S., TANAKA, T., e OHTA, H. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav.** **90**:116-124, 2007.
- MUSCOLI, C., FRESTA, M., CARDILE, V., PALUMBO, M., RENIS, M., PUGLISI, G., PAOLINO, D., NISTICO, S., ROTIROTI, D., e MOLLACE, V. Ethanol-

induced injury in rat primary cortical astrocytes involves oxidative stress: effect of idebenone. **Neurosci Lett.** **329**:21-24, 2002.

MUTTER, S. A., HAGGBLOOM, S. J., PLUMLEE, L. F., e SCHIRMER, A. R. Aging, working memory, and discrimination learning. **Q.J Exp.Psychol.(Colchester.)** **59**:1556-1566, 2006.

NABESHIMA, T., HIRAMATSU, M., NIWA, K., FUJI, K., e KAMEYAMA, T. Effect of naftidrofuryl oxalate on 5-HT₂ receptors in mouse brain: evaluation based on quantitative autoradiography and head-twitch response. **Eur J Pharmacol.** **223**:109-115, 1992.

NAKAYAMA, H., JORGENSEN, H. S., RAASCHOU, H. O., e OLSEN, T. S. The influence of age on stroke outcome. The Copenhagen Stroke Study. **Stroke** **25**:808-813, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL Guide for the care and use of laboratory animals: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.) Nutrient requirements of laboratory animals. 1995.

NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **Br.Med.Bull.** **49**:653-667, 1993.

NORMILE, H. J. e ALTMAN, H. J. Effects of combined acetylcholinesterase inhibition and serotonergic receptor blockade on age-associated memory impairments in rats. **Neurobiol.Aging** **13**:735-740, 1992.

NUMAKAWA, Y., MATSUMOTO, T., YOKOMAKU, D., TAGUCHI, T., NIKI, E., HATANAKA, H., KUNUGI, H., e NUMAKAWA, T. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. **Endocrinology** **148**:627-637, 2007.

O'SHEA, R. D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol** **29**:1018-1023, 2002.

OBARA, Y., HORGAN, A. M., e STORK, P. J. The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. **J Neurochem.** **101**:470-482, 2007.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science** **164**:719-721, 1969.

OLTON, D. S. Mazes, maps, and memory. **Am.Psychol.** **34**:583-596, 1979.

OLTON, D. S. e PAPAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychologia** **17**:669-682, 1979.

- OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Annu.Rev Neurosci** **14**:453-501, 1991.
- ORGELL, L. E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **49**:517-521, 1963.
- OSCAR-BERMAN, M. e BONNER, R. T. Matching- and delayed matching-to-sample performance as measures of visual processing, selective attention, and memory in aging and alcoholic individuals. **Neuropsychologia** **23**:639-651, 1985.
- OSCAR-BERMAN, M., PULASKI, J. L., HUTNER, N., WEBER, D. A., e FREEDMAN, W. Cross-modal functions in alcoholism and aging. **Neuropsychologia** **28**:851-869, 1990.
- OSCAR-BERMAN, M. e ZOLA-MORGAN, S. M. Comparative neuropsychology and Korsakoff's syndrome. I.--Spatial and visual reversal learning 1. **Neuropsychologia** **18**:499-512, 1980.
- OSSOWSKA, K. Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. **Pol.J Pharmacol.** **45**:109-131, 1993.
- PANG, Z., UMBERGER, G. H., e GEDDES, J. W. Neuronal loss and cytoskeletal disruption following intrahippocampal administration of the metabolic inhibitor malonate: Lack of protection by MK-801. **Journal of Neurochemistry** **66**:474-484, 1996.
- PARK, S. A., CHOI, K. S., BANG, J. H., HUH, K., e KIM, S. U. Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand. **J Neurochem.** **75**:946-953, 2000.
- PARSONS, O. A. Neurocognitive deficits in alcoholics and social drinkers: a continuum? **Alcohol Clin.Exp.Res** **22**:954-961, 1998.
- PAUDEL, H. K. The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. **J Biol.Chem.** **272**:1777-1785, 1997.
- PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in the stereotaxic coordinates. **4th.**:1998.
- PEART, J. N., GROSS, E. R., HEADRICK, J. P., e GROSS, G. J. Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. **J Mol.Cell Cardiol.** 2007.
- PEI, J. J., BRAAK, E., BRAAK, H., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., WINBLAD, B., e COWBURN, R. F. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. **J Neuropathol.Exp.Neurol.** **58**:1010-1019, 1999.

PEI, J. J., BRAAK, H., GONG, C. X., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., WINBLAD, B., e COWBURN, R. F. Up-regulation of cell division cycle (cdc) 2 kinase in neurons with early stage Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. **Acta Neuropathol.(Berl)** **104**:369-376, 2002.

PEINADO, M. A. Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. **Microsc.Res Tech.** **43**:1-7, 1998.

PEINADO, M. A., DEL MORAL, M. L., ESTEBAN, F. J., MARTINEZ-LARA, E., SILES, E., JIMENEZ, A., HERNANDEZ-COBO, R., BLANCO, S., RODRIGO, J., e PEDROSA, J. A. [Aging and neurodegeneration: molecular and cellular bases]. **Rev.Neurol.** **31**:1054-1065, 2000.

PEREIRA, S. R., MENEZES, G. A., FRANCO, G. C., COSTA, A. E., e RIBEIRO, A. M. Chronic ethanol consumption impairs spatial remote memory in rats but does not affect cortical cholinergic parameters. **Pharmacol.Biochem.Behav.** **60**:305-311, 1998.

PERROY, J., GUTIERREZ, G. J., COULON, V., BOCKAERT, J., PIN, J. P., e FAGNI, L. The C terminus of the metabotropic glutamate receptor subtypes 2 and 7 specifies the receptor signaling pathways. **J Biol.Chem.** **276**:45800-45805, 2001.

PETRALIA, R. S., YOKOTANI, N., e WENTHOLD, R. J. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. **J Neurosci** **14**:667-696, 1994.

PFEFFERBAUM, A., ADALSTEINSSON, E., e SULLIVAN, E. V. Dymorphology and microstructural degradation of the corpus callosum: Interaction of age and alcoholism. **Neurobiol.Aging** **27**:994-1009, 2006.

PINES, G., DANBOLT, N. C., BJORAS, M., ZHANG, Y., BENDAHAN, A., EIDE, L., KOEPEL, H., STORM-MATHISEN, J., SEEBERG, E., e KANNER, B. I. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature** **360**:464-467, 1992.

PINTO, L. S., GUALBERTO, F. A., PEREIRA, S. R., BARROS, P. A., FRANCO, G. C., e RIBEIRO, A. M. Dietary restriction protects against chronic-ethanol-induced changes in exploratory behavior in Wistar rats. **Brain Res** **1078**:171-181, 2006.

PIRES, R. G., PEREIRA, S. R., OLIVEIRA-SILVA, I. F., FRANCO, G. C., e RIBEIRO, A. M. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behav.Brain Res** **162**:11-21, 2005.

PIRES, R. G., PEREIRA, S. R., PITTELLA, J. E., FRANCO, G. C., FERREIRA, C. L., FERNANDES, P. A., e RIBEIRO, A. M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacol.Biochem.Behav.** **70**:227-235, 2001.

PONNAPPA, B. C. e RUBIN, E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. **Alcohol Res Health** **24**:93-104, 2000.

PONZIO, F., CALDERINI, G., LOMUSCIO, G., VANTINI, G., TOFFANO, G., e ALGERI, S. Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. **Neurobiol.Aging** **3**:23-29, 1982.

POON, H. F., FARR, S. A., THONGBOONKERD, V., LYNN, B. C., BANKS, W. A., MORLEY, J. E., KLEIN, J. B., e BUTTERFIELD, D. A. Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. **Neurochem.Int.** **46**:159-168, 2005.

POPE, W., ENAM, S. A., BAWA, N., MILLER, B. E., GHANBARI, H. A., e KLEIN, W. L. Phosphorylated tau epitope of Alzheimer's disease is coupled to axon development in the avian central nervous system. **Exp.Neurol.** **120**:106-113, 1993.

PRATICÒ, D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. **Biochemical Pharmacology** **63**:563-567, 2002.

PROLLA, T. A. e MATTSON, M. P. Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: lessons from dietary restriction. **Trends Neurosci** **24**:S21-S31, 2001.

PULSINELLI, W. A., BRIERLEY, J. B., e PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann.Neurol.** **11**:491-498, 1982.

QUARTERMAIN, D., CLEMENTE, J., e SHEMER, A. 5-HT1A agonists disrupt memory of fear conditioning in mice. **Biol.Psychiatry** **33**:247-254, 1993.

RAMSEY, J. J., HAGOPIAN, K., KENNY, T. M., KOOMSON, E. K., BEVILACQUA, L., WEINDRUCH, R., e HARPER, M. E. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. **Am.J Physiol Endocrinol.Metab** **286**:E31-E40, 2004.

RAO, R., HAO, C. M., e BREYER, M. D. Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NFkappaB-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. **J Biol.Chem.** **279**:3949-3955, 2004.

RAPP, P. R. e AMARAL, D. G. Individual differences in the cognitive and neurobiological consequences of normal aging. **Trends Neurosci** **15**:340-345, 1992.

RAPP, P. R., ROSENBERG, R. A., e GALLAGHER, M. An evaluation of spatial information processing in aged rats. **Behav.Neurosci** **101**:3-12, 1987.

RAZA, M., DESHPANDE, L. S., BLAIR, R. E., CARTER, D. S., SOMBATI, S., e DELORENZO, R. J. Aging is associated with elevated intracellular calcium

levels and altered calcium homeostatic mechanisms in hippocampal neurons. **Neurosci Lett.** 2007.

REED, R. J., GRANT, I., e ROURKE, S. B. Long-term abstinent alcoholics have normal memory. **Alcohol Clin.Exp.Res** **16**:677-683, 1992.

REIMER, R. J., FREMEAU, R. T., Jr., BELLOCCHIO, E. E., e EDWARDS, R. H. The essence of excitation. **Curr.Opin.Cell Biol.** **13**:417-421, 2001.

RENDON, A., JUNG, D., e JANCSIK, V. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria 2. **Biochem.J** **269**:555-556, 1990.

REYNOLDS, C. F., III e KUPFER, D. J. Depression and aging: a look to the future. **Psychiatr.Serv.** **50**:1167-1172, 1999.

REZVANI, A. H., GRADY, D. R., PEEK, A. E., e PUCILOWSKI, O. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. **Pharmacol.Biochem.Behav.** **50**:265-270, 1995.

RIBEIRO, A. M. Aspectos bioquímicos: Envelhecimento cerebral normal e demências. In VIANA DE FREITAS, S., PY, L., CANÇADO, F. A. X., DOLL, J., e GORZONI, M. L.(Eds.). Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. pp. 212-223.

RICAURTE, G. A., MARKOWSKA, A. L., WENK, G. L., HATZIDIMITRIOU, G., WLOS, J., e OLTON, D. S. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory. **J Pharmacol.Exp.Ther.** **266**:1097-1105, 1993.

RICE-EVANS, C. e BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Prog.Lipid Res** **32**:71-110, 1993.

RICHTER-LEVIN, G. e SEGAL, M. Age-related cognitive deficits in rats are associated with a combined loss of cholinergic and serotonergic functions. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **695**:254-257, 1993.

ROBERT, M. e MATHURANATH, P. S. Tau and tauopathies. **Neurol.India** **55**:11-16, 2007.

ROBINSON, M. B. Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. **J Neurochem.** **80**:1-11, 2002.

RODEFER, J. S. e NGUYEN, T. N. Naltrexone reverses age-induced cognitive deficits in rats. **Neurobiol.Aging** 2006.

ROSENBERG, P. A., AMIN, S., e LEITNER, M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. **J Neurosci** **12**:56-61, 1992.

ROSIER, A., DUPONT, P., PEUSKENS, J., BORMANS, G., VANDENBERGHE, R., MAES, M., DE GROOT, T., SCHIEPERS, C., VERBRUGGEN, A., e MORTELMANS, L. Visualisation of loss of 5-HT_{2A} receptors with age in

healthy volunteers using [18F]altanserin and positron emission tomographic imaging. **Psychiatry Res** **68**:11-22, 1996.

ROSSI, D. J., OSHIMA, T., e ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. **Nature** **403**:316-321, 2000.

RYAN, C. e BUTTERS, N. Learning and memory impairments in young and old alcoholics: evidence for the premature-aging hypothesis. **Alcohol Clin.Exp.Res** **4**:288-293, 1980.

SABBAGH, M. N., SHAH, F., REID, R. T., SUE, L., CONNOR, D. J., PETERSON, L. K., e BEACH, T. G. Pathologic and nicotinic receptor binding differences between mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and normal aging. **Arch Neurol.** **63**:1771-1776, 2006.

SAITO, T., ISHIGURO, K., UCHIDA, T., MIYAMOTO, E., KISHIMOTO, T., e HISANAGA, S. In-Situ Dephosphorylation of Tau by Protein Phosphatase-2A and Phosphatase-2B in Fetal-Rat Primary Cultured Neurons. **Febs Letters** **376**:238-242, 1995.

SALINSKA, E. e STAFIEJ, A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. **Neurochem.Int.** **43**:469-474, 2003.

SALTHOUSE, T. A. Age-related differences in basic cognitive processes: implications for work. **Exp.Aging Res** **20**:249-255, 1994.

SANCHEZ, J. F., SNIDERHAN, L. F., WILLIAMSON, A. L., FAN, S., CHAKRABORTY-SETT, S., e MAGGIRWAR, S. B. Glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling. **Mol.Cell Biol.** **23**:4649-4662, 2003.

SANTÍN, L. J., RUBIO, S., BEGEGA, A., e ARIAS, J. L. Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks. **Alcohol** **20**:149-159, 2000.

SANTOS, A. E., CARVALHO, A. L., LOPES, M. C., e CARVALHO, A. P. Differential postreceptor signaling events triggered by excitotoxic stimulation of different ionotropic glutamate receptors in retinal neurons. **J Neurosci Res** **66**:643-655, 2001.

SANTOS, A. M. G. A memória operacional é alterada por manipulações motivacionais? **Anais da XI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental (FESBE)** 1996.

SANTUCCI, A. C., KNOTT, P. J., e HAROUTUNIAN, V. Excessive serotonin release, not depletion, leads to memory impairments in rats. **European Journal of Pharmacology** 1996.

SANZ, A., CARO, P., IBANEZ, J., GOMEZ, J., GREDILLA, R., e BARJA, G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production

and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. **J Bioenerg.Biomembr.** **37**:83-90, 2005.

SANZ, A., CARO, P., SANCHEZ, J. G., e BARJA, G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **1067**:200-209, 2006.

SCAHILL, R. I., FROST, C., JENKINS, R., WHITWELL, J. L., ROSSOR, M. N., e FOX, N. C. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. **Arch.Neurol.** **60**:989-994, 2003.

SCHAFFER, M., GOODENOUGH, S., MOOSMANN, B., e BEHL, C. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. **Brain Research** **1005**:84-89, 2004.

SCHULZ, D., TOPIC, B., SOUZA SILVA, M. A., e HUSTON, J. P. Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? **Neurobiol.Learn.Mem.** **82**:128-141, 2004.

SEGER, R. e KREBS, E. G. Protein Kinases .7. the Mapk Signaling Cascade 16. **Faseb Journal** **9**:726-735, 1995.

SEGURA TORRES, J. E., CHAPARRO-HUERTA, V., RIVERA CERVANTRES, M. C., MONTES-GONZÁLEZ, R., FLORES SOTO, M. E., e BEAS-ZÁRATE, C. Neuronal cell death due to glutamate excitotoxicity is mediated by P38 activation in the rat cerebral cortex. **Neuroscience Letters** **403**:233-238, 2006.

SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron** **6**:487-498, 1991.

SELL, D. R. e MONNIER, V. M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. **J Biol.Chem.** **264**:21597-21602, 1989.

SENGUPTA, A., WU, Q., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., e SINGH, T. J. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. **Mol.Cell Biochem.** **167**:99-105, 1997.

SHAH, G. N. e MOORADIAN, A. D. Age-related changes in the blood-brain barrier. **Exp.Gerontol** **32**:501-519, 1997.

SHEINEIDER, E. L. Theories of aging:a perspective. In WARNER, H. R.(Ed.). Modern biological theories of ageing. New York: Raven Press, 1987. pp. 1-4.

SHIGERI, Y., SEAL, R. P., e SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain Res Brain Res Rev** **45**:250-265, 2004.

- SHIMOHAMA, S. Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. **Apoptosis** **5**:9-16, 2000.
- SILES, E., MARTINEZ-LARA, E., CANUELO, A., SANCHEZ, M., HERNANDEZ, R., LOPEZ-RAMOS, J. C., DEL MORAL, M. L., ESTEBAN, F. J., BLANCO, S., PEDROSA, J. A., RODRIGO, J., e PEINADO, M. A. Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. **Brain Res** **956**:385-392, 2002.
- SINGH, T. J., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I., e IQBAL, K. Modulation of GSK-3-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline-dependent protein kinases. **FEBS Lett.** **358**:4-8, 1995.
- SINGH, T. J., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I., e IQBAL, K. Non-proline-dependent protein kinases phosphorylate several sites found in tau from Alzheimer disease brain. **Mol.Cell Biochem.** **154**:143-151, 1996.
- SMITH, C. P., SHARMA, S., e STEINLE, J. J. Age-related changes in sympathetic neurotransmission in rat retina and choroid. **Experimental Eye Research** **84**:75-81, 2007.
- SMITH, M. A., SAYRE, L. M., MONNIER, V. M., e PERRY, G. Radical AGEing in Alzheimer's disease. **Trends Neurosci** **18**:172-176, 1995.
- SOHAL, R. S., KU, H. H., AGARWAL, S., FORSTER, M. J., e LAL, H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. **Mech.Ageing Dev.** **74**:121-133, 1994.
- SOHAL, R. S. e WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science** **273**:59-63, 1996.
- SONTAG, E., NUNBHAKDI-CRAIG, V., BLOOM, G. S., e MUMBY, M. C. A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. **J Cell Biol.** **128**:1131-1144, 1995.
- SONTAG, E., NUNBHAKDI-CRAIG, V., LEE, G., BRANDT, R., KAMIBAYASHI, C., KURET, J., WHITE, C. L., III, MUMBY, M. C., e BLOOM, G. S. Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. **J Biol.Chem.** **274**:25490-25498, 1999.
- SQUIRE, L. R. The neuropsychology of human memory. **Annu.Rev Neurosci** **5**:241-273, 1982.
- SQUIRE, L. R. The organization and neural substrates of human memory. **Int.J Neurol.** **21-22**:218-222, 1987.
- SQUIRE, L. R. e KNOWLTON, B. J. Learning about categories in the absence of memory. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **92**:12470-12474, 1995.
- SQUIRE, L. R. e ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science** **253**:1380-1386, 1991.

STAUBLI, U. e XU, F. B. Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. **J Neurosci** **15**:2445-2452, 1995.

STECKLER, T. e SAHGAL, A. The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behaviour. **Behav.Brain Res** **67**:165-199, 1995.

STEINBUSCH, H. W., VAN LUIJTELAAR, M. G., DIJKSTRA, H., NIJSSEN, A., e TONNAER, J. A. Aging and regenerative capacity of the rat serotonergic system. A morphological, neurochemical and behavioral analysis after transplantation of fetal raphe cells. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** **600**:384-402, 1990.

STEMMELIN, J., LAZARUS, C., CASSEL, S., KELCHE, C., e CASSEL, J. C. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. **Neuroscience** **96**:275-289, 2000.

STEWART, G. R., PRICE, M., OLNEY, J. W., HARTMAN, B. K., e COZZARI, C. N-methylaspartate: an effective tool for lesioning basal forebrain cholinergic neurons of the rat. **Brain Res** **369**:377-382, 1986.

STONG, R. Neurochemical changes in the aging human brain: implications for behavioral impairment and degenerative diseases. **Geriatrics** **53 (Suppl 1)**:S9-S12, 1998.

STOPPINI, M., ANDREOLA, A., FORESTI, G., e BELLOTTI, V. Neurodegenerative diseases caused by protein aggregation: a phenomenon at the borderline between molecular evolution and ageing. **Pharmacol.Res** **50**:419-431, 2004.

STRBAK, V., BENICKY, J., MACHO, L., JEZOVA, D., e NIKODEMOVA, M. Four-week ethanol intake decreases food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats. **Metabolism-Clinical and Experimental** **47**:1269-1273, 1998.

STRONG, R. Neurochemical changes in the aging human brain: Implications for behavioral impairment and neurodegenerative disease. **Geriatrics** **53**:S9-S12, 1998.

SULLIVAN, E. V. e PFEFFERBAUM, A. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. **Psychopharmacology** **180**:583-594, 2005.

SULLIVAN, E. V., ROSENBLOOM, M. J., e PFEFFERBAUM, A. Pattern of motor and cognitive deficits in detoxified alcoholic men. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research** **24**:611-621, 2000.

SUZUKI, Y., TAKAGI, Y., NAKAMURA, R., HASHIMOTO, K., e UMEMURA, K. Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats. **Brain Research** **964**:116-120, 2003.

SZILARD, L. On the nature of aging process. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **45**:30-45, 1959.

TAKAHASHI, M., TOMIZAWA, K., ISHIGURO, K., TAKAMATSU, M., FUJITA, S. C., e IMAHORI, K. Involvement of Tau-Protein Kinase-I in Paired Helical Filament-Like Phosphorylation of the Juvenile Tau in Rat-Brain. **Journal of Neurochemistry** **64**:1759-1768, 1995.

TANAKA, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking glutamate transporter GLT-1 (vol 276, pg 1699, 1997). **Science** **278**:21-21, 1997.

TEROL, J., BARGUES, M., CARRASCO, P., PEREZ-ALONSO, M., e PARICIO, N. Molecular characterization and evolution of the protein phosphatase 2A B ' regulatory subunit family in plants. **Plant Physiology** **129**:808-822, 2002.

THASE, M. E. Treatment issues related to sleep and depression. **Journal of Clinical Psychiatry** **61**:46-50, 2000.

THATCHER, G. R., BENNETT, B. M., e REYNOLDS, J. N. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. **Curr.Alzheimer Res** **3**:237-245, 2006.

TOPIC, B., DERE, E., SCHULZ, D., SOUZA SILVA, M. A., JOCHAM, G., KART, E., e HUSTON, J. P. Aged and adult rats compared in acquisition and extinction of escape from the water maze: focus on individual differences. **Behav.Neurosci** **119**:127-144, 2005.

TRINCZEK, B., BRAJENOVIC, M., EBNETH, A., e DREWES, G. MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. **J Biol.Chem.** **279**:5915-5923, 2004.

TROULINAKI, K. e TAVERNARAKIS, N. Neurodegenerative conditions associated with ageing: a molecular interplay? **Mech.Ageing Dev.** **126**:23-33, 2005.

TSOLAKI, M., SAKKA, V., GERASIMOU, G., DIMACOPOULOS, N., CHATZIZISI, O., FOUNTOULAKIS, K. N., KYRIAZIS, G., PAPANASTASIOU, J., e KAZIS, A. Correlation of rCBF (SPECT), CSF tau, and cognitive function in patients with dementia of the Alzheimer's type, other types of dementia, and control subjects. **Am.J Alzheimers.Dis.Other Demen.** **16**:21-31, 2001.

TSUKANE, M. e YAMAUCHI, T. Increase in apoptosis with neural differentiation and shortening of the lifespan of P19 cells overexpressing tau. **Neurochemistry International** **48**:243-254, 2006.

TURLEJSKI, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. **Acta Neurobiol.Exp (Wars.)** **56**:619-636, 1996.

- UBERTI, D., BELLONI, M., GRILLI, M., SPANO, P., e MEMO, M. Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurones triggered by excitatory amino acids. **Eur J Neurosci** **10**:246-254, 1998.
- UNGER, J. W. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. **Microsc.Res Tech.** **43**:24-28, 1998.
- VALLETT, M., TABATABAIE, T., BRISCOE, R. J., BAIRD, T. J., BEATTY, W. W., FLOYD, R. A., e GAUVIN, D. V. Free radical production during ethanol intoxication, dependence, and withdrawal. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research** **21**:275-285, 1997.
- VAN DER ZEE, E. A., COMPAAN, J. C., BOHUS, B., e LUITEN, P. G. Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC gamma in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. **Hippocampus** **5**:349-362, 1995.
- VAN HAARD, P. M. M. e PAVEL, S. Chromatography of urinary indole derivatives. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications** **429**:59-94, 1988.
- VAN LUIJTELAAR, M. G., TONNAER, J. A., e STEINBUSCH, H. W. Aging of the serotonergic system in the rat forebrain: an immunocytochemical and neurochemical study. **Neurobiol.Aging** **13**:201-215, 1992.
- VENERO, J. L., DE LA, R. C., MACHADO, A., e CANO, J. Age-related changes on monoamine turnover in hippocampus of rats. **Brain Res** **631**:89-96, 1993.
- VERHAEGHEN, P. e MARCOEN, A. Memory aging as a general phenomenon: episodic recall of older adults is a function of episodic recall of young adults. **Psychol.Aging** **8**:380-388, 1993.
- VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol.** **313**:643-668, 1991.
- VERTES, R. P. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. **J Comp Neurol.** **442**:163-187, 2002.
- VERZÁR, L. Aging of connective tissue. **Gerontologia** **1**:363-378, 1957.
- VIRCHOW, R. L. K. e CHANCE, F. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology, twenty lectures delivered in the Pathological Institute of Berlin during the months of February, March and April, 1858. 1860.
- VITEK, M. P., BHATTACHARYA, K., GLENDENING, J. M., STOPA, E., VLASSARA, H., BUCALA, R., MANOGUE, K., e CERAMI, A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **91**:4766-4770, 1994.

- WALKER, J. A. e OLTON, D. S. Fimbria-fornix lesions impair spatial working memory but not cognitive mapping. **Behav.Neurosci** **98**:226-242, 1984.
- WALSH, M. J. Role of acetaldehyde in the interactions of ethanol with neuroamines. **Advances in Mental Science** **3**:233-266, 1973.
- WALSH, R. N. e CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin** **83**:482-504, 1976.
- WALTON, H. S. e DODD, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. **Neurochem.Int.** 2006.
- WANG, J. Z., GRUNDKE-IQBAL, I., e IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. **Eur J Neurosci** **25**:59-68, 2007.
- WANG, R. Y., WANG, P. S., e YANG, Y. R. Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. **Gerontology** **49**:27-32, 2003.
- WEINGARTEN, M. D., LOCKWOOD, A. H., HWO, S. Y., e KIRSCHNER, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **72**:1858-1862, 1975.
- WILLIAMS, B., GRANHOLM, A. C., e SAMBAMURTI, K. Age-dependent loss of NGF signaling in the rat basal forebrain is due to disrupted MAPK activation. **Neurosci Lett.** **413**:110-114, 2007.
- WILLIAMS, L. R. Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. **Cerebrovasc.Brain Metab Rev** **7**:55-73, 1995.
- WILLIAMS, W. M. e CHUNG, Y. W. Evidence for an age-related attenuation of cerebral microvascular antioxidant response to oxidative stress. **Life Sci.** **79**:1638-1644, 2006.
- WILLIAMSON, R., SCALES, T., CLARK, B. R., GIBB, G., REYNOLDS, C. H., KELLIE, S., BIRD, I. N., VARNDILL, I. M., SHEPPARD, P. W., EVERALL, I., e ANDERTON, B. H. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. **J Neurosci** **22**:10-20, 2002.
- WOLOZIN, B. e DAVIES, P. Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. **Ann.Neurol.** **22**:521-526, 1987.
- WOO, J., KAY, R., YUEN, Y. K., e NICHOLLS, M. G. Factors influencing long-term survival and disability among three-month stroke survivors. **Neuroepidemiology** **11**:143-150, 1992.
- WOOD, W. G. e ARMBRECHT, H. J. Behavioral effects of ethanol in animals: age differences and age changes. **Alcohol Clin.Exp.Res** **6**:3-12, 1982.

WOODGETT, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **EMBO J** **9**:2431-2438, 1990.

WOUTERLOOD, F. G. Innervation of Entorhinal Principal Cells by Neurons of the Nucleus Reunions Thalami. Anterograde PHA-L Tracing Combined with Retrograde Fluorescent Tracing and Intracellular Injection with Lucifer Yellow in the Rat. **Eur J Neurosci** **3**:641-647, 1991.

WU, A., WAN, F., SUN, X., e LIU, Y. Effects of dietary restriction on growth, neurobehavior, and reproduction in developing Kunmin mice. **Toxicol.Sci.** **70**:238-244, 2002.

WYLLIE, A. H., KERR, J. F., e CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int.Rev Cytol.** **68**:251-306, 1980.

XIA, J., SIMONYI, A., e SUN, G. Y. Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase, and superoxide dismutase in rat cerebellum. **Alcohol Clin.Exp.Res** **23**:702-707, 1999.

YAN, S. D., CHEN, X., SCHMIDT, A. M., BRETT, J., GODMAN, G., ZOU, Y. S., SCOTT, C. W., CAPUTO, C., FRAPPIER, T., SMITH, M. A., e . Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** **91**:7787-7791, 1994.

YANG, Q. N., WANG, S., KARLSSON, J. E., HAMBERGER, A., e HAGLID, K. G. Phosphorylated and Nonphosphorylated Neurofilament Proteins - Distribution in the Rat Hippocampus and Early Changes After Kainic Acid-Induced Seizures. **Journal of Chemical Neuroanatomy** **9**:217-228, 1995.

YANG, S. D., YU, J. S., SHIAH, S. G., e HUANG, J. J. Protein kinase FA/glycogen synthase kinase-3 alpha after heparin potentiation phosphorylates tau on sites abnormally phosphorylated in Alzheimer's disease brain. **J Neurochem.** **63**:1416-1425, 1994.

YORK, J. L. e BIEDERMAN, I. Motor performance in detoxified alcoholics. **Alcohol Clin.Exp.Res** **12**:119-124, 1988.

YOSHIDA, H., HASTIE, C. J., MCLAUCHLAN, H., COHEN, P., e GOEDERT, M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). **J Neurochem.** **90**:352-358, 2004.

YOSHIMOTO, K., MCBRIDE, W. J., LUMENG, L., e LI, T. K. Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. **Alcohol Clin.Exp.Res** **16**:781-785, 1992.

YOSHIZUMI, M., ABE, J., HAENDELER, J., HUANG, Q., e BERK, B. C. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. **J Biol.Chem.** **275**:11706-11712, 2000.

YU, B. P., SUESCUN, E. A., e YANG, S. Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. **Mech.Ageing Dev.** **65**:17-33, 1992.

YU, J. Z. e RASENICK, M. M. Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. **FASEB J** **20**:1452-1461, 2006.

YU, Z. F. e MATTSON, M. P. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. **J Neurosci Res** **57**:830-839, 1999.

ZECEVIC, N. Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. **Glia** **48**:27-35, 2004.

ZHENG-FISCHHOFER, Q., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. M., ILLENBERGER, S., GODEMANN, R., e MANDELKOW, E. Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. **Eur J Biochem.** **252**:542-552, 1998.

ZHU, D., TAN, K. S., ZHANG, X., SUN, A. Y., SUN, G. Y., e LEE, J. C. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. **J Cell Sci.** **118**:3695-3703, 2005.



Research report

Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: Correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters

Ieda F. Oliveira-Silva^{a,d}, Lucas Pinto^a, Silvia R.C. Pereira^b, Vany P. Ferraz^c,
Alfredo J.A. Barbosa^d, Vivian A.A. Coelho^a, Felipe F.A.S. Gualberto^a, Valeria F. Souza^a,
Rosiane R.M. Faleiro^e, Glaucia C. Franco^e, Angela M. Ribeiro^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica-Imunologia, Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular, LaNeC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brazil

^b Departamento de Psicologia, Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular, LaNeC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brazil

^d Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brazil

^e Departamento de Estatística, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brazil

Received 5 December 2006; received in revised form 6 March 2007; accepted 13 March 2007

Available online 16 March 2007

Abstract

We investigated age-related changes in learning and memory performance and behavioural extinction in the water maze; and in endogenous levels of serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in the neocortex, hippocampus, thalamus and dorsal raphe nucleus of Wistar rats. Another aim was to assess the correlation between behavioural and biochemical parameters, which were measured in rodents of two different ages: 5 months (adults) and 16 months (middle-aged). The middle-aged subjects succeeded in learning the behavioural task, albeit with significantly worse performance when compared to adult animals. Aging also had significant main effects on memory and extinction. An age-dependent decrease in 5-HIAA levels was observed in both hippocampus and dorsal raphe nucleus (DRN). The decrease in DRN 5-HIAA was paralleled by a decrease in 5-HIAA/5-HT ratio in this brain area, which was significantly correlated to the animals' spatial memory performance and behavioural extinction. In addition, using middle-aged rats, a 2 × 2 factorial study was carried out to examine the effects of food restriction and chronic ethanol consumption on rat's performance in a spatial behavioural task and on central serotonergic parameters. None of these two treatments had a significant effect on the behavioural and biochemical parameters assessed, with the exception of extinction index, which was significantly affected by ethanol consumption. Long-term ethanol ameliorated the impairment in behavioural flexibility caused by aging. In conclusion, long-term ethanol consumption may have a role in protecting against age-related deficit in behavioural extinction. Moreover, the present results also indicate that DRN serotonergic system is involved in spatial memory and behavioural extinction.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aging; Caloric restriction; Chronic ethanol; Spatial memory; Behavioural extinction; 5-HT; 5-HIAA; Rats

1. Introduction

During normal aging, various cognitive processes, including learning and memory, are profoundly affected in both humans [65,77,22] and rodents [25,26,66,33]. De Luca et al. [18] showed that old subjects have decreased performance

in tasks requiring cognitive flexibility, providing support for the hypothesis of a vulnerability of executive skills to normal aging. Accordingly, using an animal model, Topic et al. [79] showed that behavioural extinction is affected during aging. However, although there are some studies about extinction processes [34,43,44,64,67,78], the biological substrates involved in this behavioural phenomenon are still unknown. While the role played by the cholinergic system in age-related cognitive impairment has been extensively investigated [14,21,71], relatively few studies have examined whether the central serotonergic system

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3499 2642; fax: +55 31 3499 2614.
E-mail address: angelamr@icb.ufmg.br (A.M. Ribeiro).