

PUCRS

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

NATÁLIA ELTZ SILVA

**EFEITO DA INJEÇÃO DA PROTEÍNA B-AMILOIDE₁₋₄₂ EM DIFERENTES FORMAS NO
VENTRÍCULO ENCEFÁLICO: UM MODELO DE ASPECTOS CELULARES DA DOENÇA DE
ALZHEIMER EM ZEBRAFISH**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EFEITO DA INJEÇÃO DE DIFERENTES FORMAS DA PROTEÍNA B-AMILOIDE_{E1-42} NO VENTRÍCULO ENCEFÁLICO DE *ZEBRAFISH*: UM MODELO DE ASPECTOS CELULARES DA DOENÇA DE ALZHEIMER

NATÁLIA ELTZ SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Monica Ryff Moreira Roca Vianna

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

2017

Ficha Catalográfica

S586e Silva, Natália Eltz

Efeito da injeção de diferentes formas da proteína β -amiloide 1-42 no ventrículo encefálico de zebrafish : Um modelo de aspectos celulares da Doença de Alzheimer / Natália Eltz Silva . – 2017.

47 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Monica Ryff Moreira Roca Vianna.

1. Doença de Alzheimer. 2. Neurodegeneração. 3. β -amiloide. 4. Zebrafish. I. Vianna, Monica Ryff Moreira Roca. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Monica Vianna por ter me acolhido desde o meu 3º semestre de faculdade e por todos os ensinamentos, auxílio e carinho ao longo destes anos.

A Laura Nery que foi como minha coorientadora durante esses anos e por todos os ensinamentos, paciência e amizade. Ambas foram essenciais para o meu crescimento pessoal e como pesquisadora.

Ao Fabiano Peres pelas inúmeras explicações, apoio, por ouvir minhas reclamações e dividir o lanche conosco.

Às alunas Raphaela, Gabriela e Christiane por me ajudarem nos experimentos e pela companhia nos finais de semana e feriados.

A Laura, Luiza, Stefani, Débora, Camila e Paula por fazerem meus dias no laboratório mais felizes.

A Ângela, Marina, Daniela, Mariana e Ana pelos anos de amizade.

A Karina, Daiani, Gabriela, Rafael e Raphaela pela nossa união nos tempos de Iniciação Científica que dura até hoje.

Aos demais membros do ZebLab foi um prazer conviver e aprender com vocês.

Ao Cristiano por acreditar em mim e por todo o apoio, companheirismo, amor e compreensão.

A minha madrinha Zeneida e meu padrinho Anderson, meus avós Maria, Maria Helena e Ernesto por estarem ao meu lado.

Aos meus irmãos Vinicius e Nicole que são parte de mim e que amo com todo o meu coração.

A minha pequena e doce afilhada Marina, que com sua chegada me trouxe luz e amor.

Principalmente ao meu pai Gilberto que foi quem mais me apoiou, acreditou e incentivou os meus estudos e a minha mãe Maureen que esteve ao meu lado durante todos os momentos, inclusive nos mais difíceis e estressantes. A pessoa que sou hoje é fruto de todo o esforço, dedicação, amor e carinho de vocês. Serei eternamente grata por ter vocês em minha vida.

Resumo

Com o envelhecimento da população, doenças relacionadas com o envelhecimento vêm se tornando mais comuns. A Doença de Alzheimer (DA), a forma prevalente de demência, inclui como sintomas iniciais deficit cognitivos que são atribuídos a efeitos tóxicos de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) que se acumula em placas senis e emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada. A cascata amiloide inicialmente proposta para explicar os efeitos do $A\beta$ apontava para as placas de depósito de $A\beta_{1-42}$ como a forma tóxica da molécula responsável pela disfunção e morte neuronal. Recentemente diversas evidências apontam para a toxicidade das versões solúveis do peptídeo antes da agregação em placas. O melhor entendimento da dinâmica de agregação do amiloide, limpeza e potencial tóxico das versões solúveis pode permitir significativos avanços no conhecimento dos mecanismos da doença e a identificação de potenciais alvos para terapias da DA. Neste estudo utilizamos o teleóstio *zebrafish* como modelo para a caracterização destes processos. Embriões com 24 horas receberam injeção intracerebroventricular de $A\beta_{1-42}$ humano preparado de forma a ter diferentes potenciais de agregação: monomérica, oligomérica e formadora de placas. Ao atingirem 5 dias pós-fertilização (dpf), a quantificação dos níveis de $A\beta_{1-42}$ demonstrou um aumento remanescente dos níveis do peptídeo nos animais injetados com a solução que favorecia a formação de placas. Após monitorarmos eventuais efeitos embriotóxicos e teratogênicos, ao atingirem 5dpf, os animais foram também avaliados em relação a aspectos fisiológicos gerais e sua capacidade cognitiva. Embora a injeção não tenha impactado significativamente a sobrevivência dos animais ou a capacidade exploratória, a injeção da solução oligomérica induziu deficit cognitivos específicos em relação ao controle injetado com veículo. Juntos, estes resultados suportam a versão revisada da cascata amiloide na qual, embora a presença de placas corresponda a um maior acúmulo de $A\beta_{1-42}$, a presença de versões oligoméricas pode induzir efeitos neurotóxicos significativos e resultar em deficit cognitivos, especialmente nos estágios iniciais da doença.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, neurodegeneração, β -amiloide e *zebrafish*.

Abstract

Aging-related diseases are becoming more common. Alzheimer's disease (AD), the most prevalent form of dementia, includes as initial symptoms cognitive deficits that are attributed to the toxic effects of amyloid β peptide (A β) that accumulates in senile plaques and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein. The amyloid cascade initially proposed to explain the effects of A β pointed to the plaques as the most toxic form of the A β molecule responsible for neuronal dysfunction and death. Recently, several evidences point to the increased toxicity of the soluble forms of the peptide. A better understanding of the dynamics of amyloid aggregation, clearance and toxic potential of the soluble versions may foster significant advances in the understanding AD mechanisms and the identification of potential targets for AD therapies. In this study we used the zebrafish as a model. 24-hour embryos received intracerebroventricular injection of human A β_{1-42} prepared to have different aggregation potentials: monomeric, oligomeric and plaque-forming. At 5 days post-fertilization (dpf), quantification of A β_{1-42} levels demonstrated a remnant increase in peptide levels in the animals injected with the solution that favored plaque formation. After monitoring for embryotoxic and teratogenic effects, 5dpf the animals were also evaluated in relation to general physiological aspects and their cognitive ability. Although the injection did not significantly impact animal survival or exploratory ability, the oligomeric solution induced specific cognitive deficits in relation to the vehicle-injected control. Together these results support the revised version of the amyloid cascade in which, although the presence of plaques corresponds to a greater accumulation of A β_{1-42} , oligomeric forms may induce significant neurotoxic effects and result in cognitive deficits specially at disease's early stages.

Key words: Alzheimer's disease, neurodegeneration, β -amyloid and zebrafish.

LISTA DE ABREVIATÖES

A β	β -Amiloide
APP	Proteína Precursora Amiloide
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPF	Dias Pós-Fertilização
HPF	Horas Pós-Fertilização
MS222	Metanosulfato (Tricaína)
PET	Positron Emission Tomography

Sumário	
CAPÍTULO 1	6
1 Introdução	6
1.1 Doença de Alzheimer	6
1.2 <i>Zebrafish</i>	11
1.3 Fármacos Neuroprotetores	12
1.3.1 Rapamicina	13
2 Justificativa	14
3 Objetivos	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO 2	16
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO	16
CAPÍTULO 3	33
1 RESULTADOS ADICIONAIS	33
1.1 Resultados do teste inicial com fármaco neuroprotetor	33
1.2 A β e Rapamicina	34
1.3 Ensaio para avaliação de Morte Celular	35
1.4 Western Blotting	36
CAPÍTULO 4	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	44

CAPÍTULO 1

1 Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que a partir da década de 70 tem feito a população de idosos com mais de 65 anos crescer significativamente. Estima-se que em 2050 haverá cerca de 1,5 bilhão de pessoas acima dos 65 anos de idade ^[1] (Figura 1), sendo que em 2014 eram 841 milhões de idosos ^[2]. Este aumento se deve, em grande parte, a um aumento na longevidade média relacionada ao declínio de mortes por doenças anteriormente consideradas intratáveis e à eficácia nas intervenções de saúde.

Com o envelhecimento populacional, torna-se cada vez mais crítico o estudo, entendimento e busca de terapias para doenças associadas ao envelhecimento, cuja prevalência também aumenta. Dentre as doenças associadas ao envelhecimento, as demências e doenças neurodegenerativas correspondem a mais de 100 diferentes patologias que têm como característica comum o comprometimento das funções cerebrais, como memória, percepção e habilidades cognitivas ^[3]. Entre estas, a Doença de Alzheimer (DA) é a mais prevalente doença degenerativa e foi descrita há 110 anos pelo médico Alois Alzheimer.

O envelhecimento populacional, além de afetar pacientes e familiares, onera o sistema de saúde e a economia. Os custos financeiros com tratamentos e cuidados ficaram em 604 bilhões de dólares por ano em 2012, sendo a DA a causa mais comum, possivelmente, contribuindo para até 70% dos casos, segundo a Organização Mundial da Saúde ^[5].

Apesar de ser uma doença descrita há mais de um século, as características gerais diagnósticas da DA se assemelham a outras demências, sendo a doença identificada normalmente de forma tardia, dificultando o tratamento. O diagnóstico inclui teste de estado mental, exames físicos e neurológicos, exames genéticos (para identificação de Alzheimer Familiar) e de imagens cerebrais ^[6]. Apesar de ser acompanhada por conhecidas

alterações moleculares, apenas recentemente ficaram disponíveis marcadores moleculares para diagnóstico de placas senis, alteração molecular típica da doença, por tomografia por emissão de pósitrons (positron emission tomography (PET) [6, 7], embora o acesso a estes recursos seja ainda restrito: Em 2012 a *Food and Drug Administration* dos EUA aprovou o primeiro marcador para imagem molecular a ser usado para a DA, o Amyvid (Florbetapir F-18) que se liga ao peptídeo β -amiloide ($A\beta$); Em 2013 foi aprovado o Vizamyil (Flutametamol F18) e em 2014 o Neuraceq (Florbetaben F18), os três marcadores possuem a característica de serem visualizados durante o PET, mostrando a presença de placas senis [6, 7].

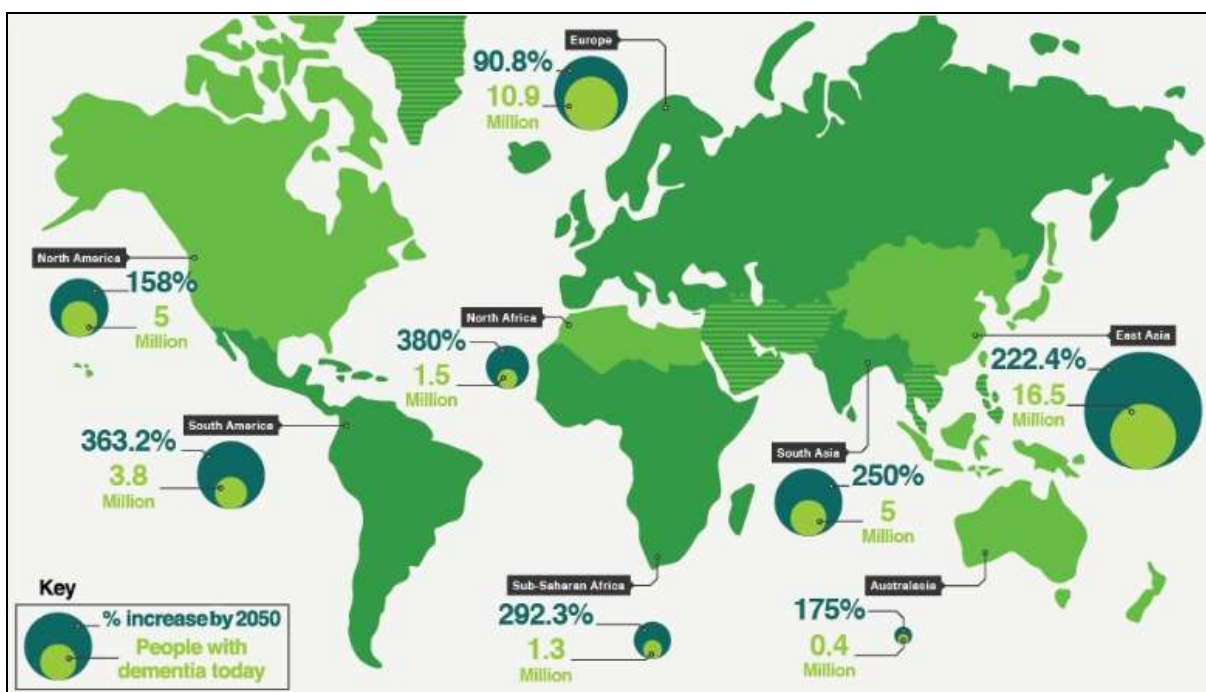


Figura 1: Distribuição geográfica dos casos de demência no mundo e estimativa de aumento em 2050^[4].

A DA possui características moleculares típicas como o acúmulo do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) em placas senis no meio extracelular e emaranhados de proteína tau hiperfosforilada intracelular. A tau é uma proteína associada ao citoesqueleto de microtúbulos que confere estabilidade ao citoesqueleto de neuritos^[8], em especial do axônio, podendo ser fosforilada por diferentes quinases. A hiperfosforilação da tau acarreta seu desprendimento dos microtúbulos e agregação, acumulando no citoplasma e assumindo

conformações patogênicas que comprometem o fluxo de informações e processos celulares neuronais [8,9].

A dinâmica de agregação dos peptídeos vem sendo estudada, enquanto as placas senis provavelmente começam como agregados não filamentosos de peptídeos A β entre 40 e 42/43 resíduos [10], formando inicialmente as fibrilas amiloides na DA, são polímeros produzidos a partir de um péptido de aproximadamente 4,5 kDa β -amiloide [11]. Sabe-se que a Doença de Alzheimer possui duas 'formas' caracterizadas por sintomas comuns: a forma principal, considerada esporádica, responsável pela maioria dos casos, tem como fatores de risco aspectos relacionados com o estilo de vida, nível de instrução e comorbidades, entre outros [12], e a Doença de Alzheimer Familiar (FAD), determinada geneticamente, responsável pela minoria dos casos.

Estudos da FAD tiveram grande importância no descobrimento dos genes relacionados com a origem da doença, interação entre o mau processamento da Proteína Precursora do Amiloide (APP) e o desenvolvimento da patologia [13, 14,15], assim como a participação crítica dos genes da presenilina 1(PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2), que codificam proteínas dos complexos transmembrana das secretases. Quando em processo de mutação, estas proteínas geram peptídeos A β de tamanhos diversos, com efeitos tóxicos e maior tendência a formar agregados [16,17,18].

A clivagem da APP é feita de maneira orquestrada na membrana plasmática por três complexos de proteases da família secretase - α -, β - e γ -secretase e pode ser direcionada de duas formas: a via amiloidogênica, que acarreta a formação do peptídeo A β , e a não amiloidogênica (Figura 2). A APP é inicialmente clivada no domínio extracelular pela α -secretase dentro da sequência A β , formando APP α ; enquanto β -secretase cliva no fim da extremidade N-terminal de A β , liberando APP β [19]. Na via não amiloidogênica, a clivagem subsequente da γ -secretase forma o fragmento p3 contendo a região C-terminal de A β , já na via amiloidogênica, seguido do desprendimento de APP β , ocorre a liberação do peptídeo A β pela clivagem da γ -secretase no C-terminal de A β [20,21]. As presenilinas integram a porção catalítica da γ -secretase. Existem duas isoformas principais de A β que são formadas conforme a região de clivagem da γ -secretase, a A β 40 e A β 42. Em condições fisiológicas, a maioria da A β é secretada de neurônios como A β 40, que é mais facilmente eliminada.

Porém, formas mais longas de A β agregam-se mais facilmente devido à natureza hidrofóbica e podem levar à formação de fibrilas de A β que por sua vez poderão servir como núcleos para a formação de placas [22].

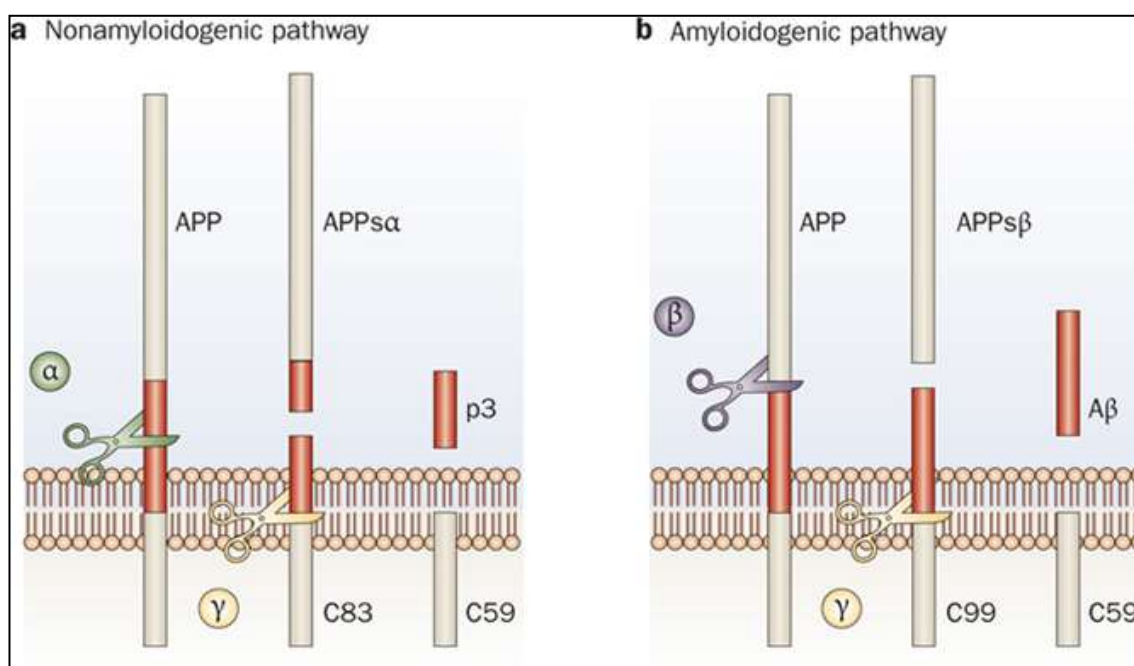


Figura 2: Esquema da clivagem da APP nas vias amiloidogênica e não amiloidogênica (Strooper DB, Vassar R & Golde T, 2010) [20].

A partir de análises de agregados proteicos nos tecidos neurais *post-mortem* de pacientes com DA, foi proposta, no final dos anos 1980, a teoria da cascata amiloide (*amyloid cascade*) ou hipótese das placas amiloides, a qual atribui a morte neuronal à presença das placas de proteína A β não solúveis [23,24]. Ao longo dos últimos anos, contudo, diferentes teorias a respeito do desenvolvimento da DA e da formação das placas foram sendo revistas, incluindo a demonstração de que formas solúveis de A β , localizadas na região intra e extracelular e em diferentes tamanhos, possuem efeitos neurotóxicos [17]. O A β humano pode existir em diversos estados de agregação e solubilidade, desde monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros, dodecâmeros, oligômeros de ordem superior e protofibrilas, bem como fibrilas maduras, que podem formar placas amiloides [25] (Figura 3).

A versão atualizada da cascata amiloide atribui efeitos tóxicos a oligômeros e fibrilas através de diversos mecanismos ainda em estudo ^[17], embora o debate acerca da real contribuição das diferentes formas de amiloide seja polêmico e esteja longe de um consenso ^[26,27]. Huang e Mucke propuseram que as fibrilas A β insolúveis encontradas nas placas de amiloides e a forma monomérica são menos patogênicas do que as fibrilas não solúveis que são os dímeros A β , trimeros e oligômeros maiores de A β ^[28] (Figura 3).

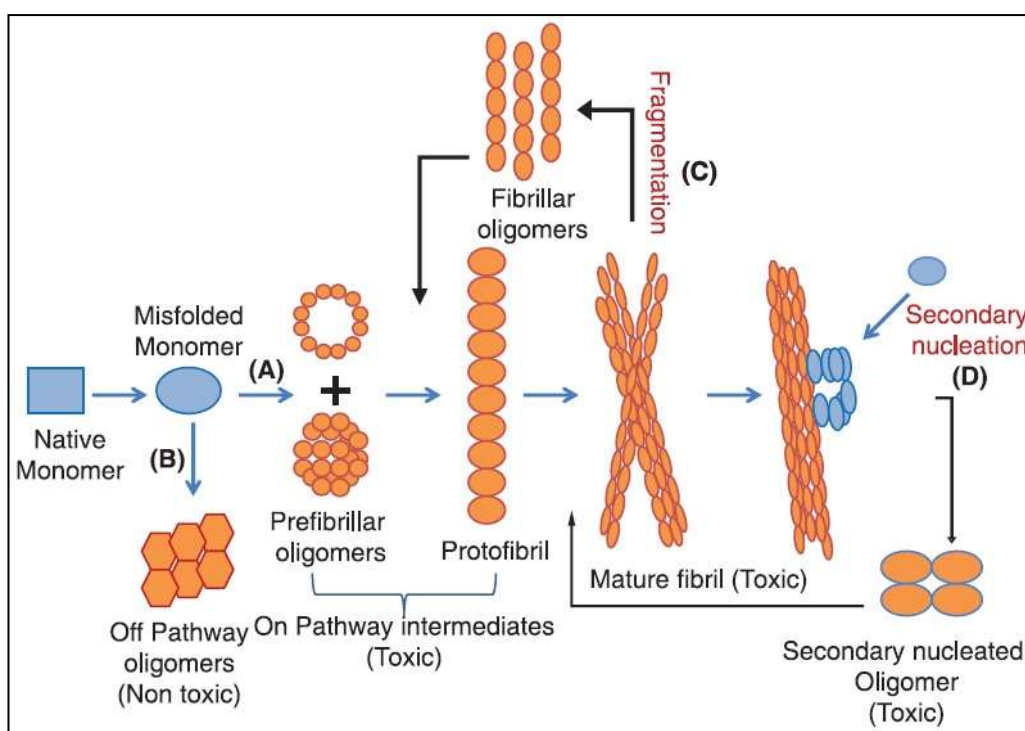


Figura 3: Esquema da agregação da proteínas A β . (a) proteínas nativas se dobram e sofrem alteração conformacional para formar protofibrilas e fibrilas maduras, (b) monômeros dobrados formam oligômeros, (c) fibrilas maduras sofrem fragmentação para formar oligômeros fibrilares que novamente se agregam para formar fibrilas maduras, (d) as fibrilas maduras atuam como um modelo para oligomerização e catalisam a reação de nucleação secundária formando oligômeros tóxicos a partir dos monômeros (Verma et al. 2015) ^[29].

Apesar dos altos índices de incidência da DA, atualmente ainda não há nenhuma terapia eficaz que previna, retarde ou reverta a doença ^[6]. Atualmente as estratégias farmacológicas disponíveis se restringem a tratar sintomas da DA, como déficits de memória, alterações no sono ou tentar retardar o processo de degeneração e incluem inibidores da

enzima colinesterase que potencializam a transmissão colinérgica e antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA que previnem a excitotoxicidade induzida por glutamato. Neste cenário, o entendimento das dinâmicas moleculares dos agentes tóxicos em suas diferentes apresentações é crítico para o entendimento dos mecanismos da doença e para a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

1.2 Zebrafish

O teleósteo *Danio rerio*, conhecido mundialmente como *zebrafish*, foi descrito primeiramente por Francis Hamilton, em 1822, pertencente à família Cyprinidae, uma das mais ricas em número de representantes entre os vertebrados. Esta espécie tem distribuição geográfica no sul e sudeste da Ásia. George Streissinger (1983) propôs primeiramente o uso do *zebrafish* como animal modelo para pesquisas em biologia do desenvolvimento, genética, neurofisiologia e biomedicina^[30].

Este animal modelo é um pequeno peixe de água doce com fertilização e desenvolvimento externos e ovos relativamente grandes (cerca de 0,7 milímetros de diâmetro) e transparentes, o que facilita a observação e manipulação dos embriões quando comparado com os demais animais modelo de vertebrados. O seu desenvolvimento embrionário é muito rápido, sendo completo em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando eclode do córion dando origem a uma larva^[30] que só então inicia o processo de pigmentação, embora isto também possa ser prevenido farmacologicamente, o que facilita o acompanhamento dos processos em tempo real. Por ser um organismo aquático, possui a capacidade de absorver substâncias adicionadas ao seu meio, sendo usado para *screening* farmacológico e testes de novos fármacos. Atualmente muitos procedimentos já estão validados para avaliar parâmetros comportamentais e cognitivos, com poder translacional para mamíferos e humanos^[31]. Portanto, é um ótimo modelo animal para estudos de desenvolvimento e alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso.

Pela complexidade das doenças neurodegenerativas e os diversos processos nela envolvidos, cada vez mais se torna necessário modelar aspectos das doenças em organismos menos complexos para conseguirmos entendimento de dinâmicas e seleção de alvos moleculares para estudo.

Considerando que a DA atinge exclusivamente humanos, apesar de manifestações similares em canídeos ^[32,33], é importante garantir que os animais modelo usados no seu estudo possuam toda a maquinaria molecular associada à doença ^[34]. Diversas estratégias já foram estabelecidas em animais modelos para o desenvolvimento de patologias com aspectos neurodegenerativos, diversos animais transgênicos para o estudo da DA foram criados utilizando roedores e, mais recentemente, também *zebrafish* ^[35].

Estudos utilizando o *zebrafish* para investigações da Doença de Alzheimer ainda são escassos, mas Cunvong e colaboradores aplicaram injeção intraocular de A β em *zebrafish* adulto, o que resultou em ramificações anormais dos vasos sanguíneos da retina ^[36]. Em abordagem similar, foi observado o mesmo efeito da A β no cérebro de embriões e larvas e a senescência de células endoteliais no desenvolvimento vascular de *zebrafish* ^[37]. Nosso grupo de pesquisa estabeleceu recentemente uma metodologia para injeção intracerebroventricular de peptídeo humano A β ₁₋₄₂ em larvas de *zebrafish* ^[38], estudos utilizando estratégias similares em roedores, e observou déficits cognitivos e aumento na fosforilação de tau ^[39].

1.3 Fármacos Neuroprotetores

Considerando a complexidade da DA e o desconhecimento atual de sua etiologia, a busca por agentes neuroprotetores capazes de prevenir o seu desenvolvimento é bastante atrativa. Apesar da grande gama de estudos utilizando animais modelo para o entendimento da doença, é difícil encontrar um animal que combine características da DA como acúmulo de A β e efeitos comportamentais associados à doença que permita ao mesmo tempo o *screening* de drogas neuroprotetoras. Assim o *zebrafish* demonstra uma vantagem e vem sendo utilizado para *screening* farmacológico por ter a capacidade de absorver substâncias do meio, além de ser um modelo para estudo de neurodegeneração.

1.3.1 Rapamicina

A Rapamicina é um composto antifúngico produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, isolado na década de 70 em forma pura, cristalina, com baixa toxicidade aguda, inibe crescimento e proliferação celular e atua por inibição da sinalização de mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) ^[40,41]. A via de sinalização mTOR desempenha papel importante na rede de sinalização que controla o crescimento e metabolismo em resposta a estímulos ambientais ^[42], e forma dois complexos: mTORC1 e mTORC2, estes complexos possuem diferenças quanto à sensibilidade à rapamicina. A mTOR é regulada por vários estímulos fisiológicos e patológicos através de vias de sinalização e proteínas intermediárias. A mTOR ativa várias proteínas envolvidas na regulação da síntese proteica, crescimento e proliferação celular, plasticidade sináptica e expressão de canais iônicos ^[43].

A rapamicina já foi utilizada para tratar crises convulsivas e esclerose lateral em *zebrafish*, porém, em um curto período de tempo, viram que os animais tratados tiveram uma melhora no nado comparado com os animais controle ^[44], foi mostrado que a rapamicina pode prolongar a longevidade de células de levedura quiescentes ^[45], a inibição da atividade de sinalização da via mTOR pode ser uma abordagem terapêutica futura para prevenir ou reverter a DA ^[46], podendo ser usada para distúrbios neurológicos como para a doença de Parkinson ^[35] e doença de Alzheimer ^[46,47]. A rapamicina também mostrou possuir um efeito na longevidade de mamíferos, retardando o envelhecimento ^[48], além de apresentar uma melhora na aprendizagem e memória, além de reduzir níveis de A β e tau ^[49].

2 Justificativa

Com o aumento da expectativa de vida populacional e com isso a incidência de doenças neurodegenerativas, cada vez se torna mais necessário o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes às doenças e a busca por novas terapias.

O desenvolvimento de modelos animais para o estudo e entendimento dos diferentes fatores envolvidos na DA se torna crucial para a busca de novos fármacos e diagnóstico precoce.

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos da injeção intracerebral de $A\beta_{1-42}$ em condições monoméricas, oligoméricas e formadoras de placas sobre parâmetros embrionários, comportamentais, vias de sinalização associadas à Doença de Alzheimer e potencial agregador. Adicionalmente avaliar os possíveis efeitos do fármaco rapamicina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos embriotoxicológicos, incluindo alterações morfológicas dos animais injetados com os tipos de β -amiloide a partir das 2dpf até os 5dpf.
- Avaliar a comportamento locomotor e respostas cognitivas aversivas aos 5dpf.
- Avaliar os níveis de apoptose no tecido cerebral aos 5dpf.
- Quantificar as proteínas β -amiloide, tau, tau-p por *western blot* aos 5dpf.
- Padronizar técnica de ELISA e quantificar os níveis encefálicos de $A\beta$ nos indivíduos aos 5dpf.
- Avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores do fármaco rapamicina.

CAPÍTULO 2

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Title: *Cognitive deficits induced by A β ₄₂ oligomers but not monomers and fibrillar forms of the peptide in zebrafish independently of brain accumulation*

Authors: Natália Eltz^{1,2}, Laura R. Nery^{1,2}, Raphaela S. Fonseca^{1,2}, Gabriela Urbanski^{1,2}, Christiane Pizzato^{1,2}, Monica R. Vianna^{1,2}

Affiliation: ¹ZebLab & ²Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author: Monica Vianna, Ph.D.: monica.vianna@pucrs.br

Abstract

Plaques composed of insoluble fibrils of Amyloid- β peptides (A β) mainly of 42 (A β ₄₂) and 40 (A β ₄₀) amino acids have long been considered a key pathological marker and a prime target for Alzheimer's disease prevention and treatment. A β ₄₂ is more hydrophobic than A β ₄₀, aggregates more rapidly forming stable oligomers and is predominant in plaques. Recent data supports soluble A β oligomers as toxic mediators of synaptic dysfunction, redefining the traditional "amyloid cascade" theory. In this scenario, additional platforms for *in vivo* studies of A β ₄₂ dynamics and evaluation of specific effects and of its transitional monomeric, oligomeric and fibrillar forms are essential to much needed advances in the field. We tested the toxicity, cognitive effects and brain accumulation after hindbrain ventricle injection of human A β ₄₂ monomers, oligomers and fibrils in the zebrafish embryo. We demonstrate that soluble oligomers are associated with specific cognitive deficits at 5dpf independent of the brain accumulation of A β ₄₂ detected by ELISA only in animals injected with a plaque-forming fibrillar preparation. Our data reinforces the updated version of the amyloid cascade

suggesting the synaptotoxic effects of soluble oligomers preceding accumulation and supports zebrafish as an additional model for studying its underlying mechanisms.

Key words: Zebrafish; Alzheimer's Disease, Amyloid- β , Oligomers, Cognition, ELISA

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly with increasing 4.6 million new patients per year ^[1] and estimated 66 million cases in 2030 ^[2]. AD is a progressive neurological disorder initially characterized by synaptic dysfunction and cognitive deficits such as memory loss, speech difficulties, depression, hallucinations and evolving to a costly dependent care before death. Disease-modifying therapies are still unavailable mostly due to our lack of understanding of the underlying molecular mechanisms of this devastating disease progression. The presence of intraneuronal neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau and extracellular deposits of amyloid- β ($A\beta$) peptides in senile plaques have long been considered the molecular hallmarks of the disease.

The extracellular release of $A\beta$ peptides of varying sizes, among which the major forms are of 42 ($A\beta_{42}$) and 40 ($A\beta_{40}$) amino acids, is a result of the amyloid precursor protein ($A\beta$ APP) proteolytic processing by β - and γ -secretases in the amyloidogenic pathway. $A\beta$ soluble forms tend to aggregate in oligomers of different masses and progressively form fibrils that integrate large deposits known as senile plaques. $A\beta$ brain levels can be elevated because of enhanced production of aggregative forms or reduced clearance. $A\beta_{42}$ is more hydrophobic than $A\beta_{40}$, aggregates more rapidly forming stable oligomers and is predominant form in plaques ^[3].

The Amyloid Cascade Hypothesis postulated that the progressive deposition of insoluble fibrils in plaques is the central event of AD pathology ^[4]. This scenario encouraged drug development efforts targeting $A\beta$ large aggregates and clearance despite the lack of correspondence between the amount of plaques and the degree of synaptic loss or cognitive deficits in patients and murine models of AD ^[5,6,7]. More than a decade ago, several lines of evidence began to support a paradigm shift and soluble oligomers (but not fibrils or plaques) are currently seen as the major toxic agents causing synaptic loss and cognitive decline in AD ^[3]. The toxic effects of natural and synthetic oligomers on synaptic plasticity include cognitive deficits in murine and inhibition of LTP (long-term potentiation, an

electrophysiological correlate of long-term memory) maintenance [8,9,10,11,12]. Despite a significant correlation between the amount of soluble oligomers, synapses and cognitive dysfunction [3,13,14,15] our current understanding of the different oligomeric species and its dynamics remain elusive and new study platforms are needed [16,17].

Zebrafish is a model organism advantageous for translational experiments due to its significant genetic similarity with humans associated to valuable high-throughput screening potential that can contribute to studies of neurological human diseases mechanisms [18,19,20]. Our lab previously established a protocol for intraventricular injection of human A β ₄₂ in zebrafish and demonstrated that it induces cognitive deficits, increases tau phosphorylation in residues that resemble AD early stages and diminishes synaptic markers [21]. In this study we aimed to compare the behavioral and molecular effects of A β ₄₂ with different aggregation potentials including soluble monomers, oligomers and fibrils and test if this strategy could aid in future studies dedicated to investigate the oligomers dynamics and cellular targets.

Methodology

Animals

Adult AB strain wild type zebrafish from our facility colony were kept and bred according to standard procedures in an automated re-circulating system (Tecniplast, Italy) at a density of 1.5 fish per liter with a constant light-dark cycle (14–10h) [22]. For breeding, females and males (2:1) were housed in a breeding tank overnight separated by a transparent barrier that was removed when lights went on in the following morning. Embryos were collected, cleaned and placed in sterile petry dishes (30 embryos per dish) with the system's clean water (reverse osmosis filtered and salt equilibrated), stored in an incubator with controlled temperature of 27.5 °C and a light-dark cycle (14-10h). All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, 15/00490), followed the Brazilian legislation (no.11.794/08) and conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the use of fish in research [23].

Amyloid- β solutions for injection

The human A β_{42} peptide (Sigma-Aldrich) solutions were diluted following manufacturer instructions in PBS at an initial concentration of 1000 μ M and diluted to the final 10 μ M. Solutions with different aggregation potentials were prepared according to the literature, as follows: the monomeric A β solution was prepared as described by Cameron et al. [24]; a preferentially oligomeric solution was prepared by incubating the monomeric solution for 5 days at 37 ° C, according to Pontrello et al. [25] while the fibrillar solution was produced by the incubation of the monomeric solution under 800rpm shaking for 36 hours at 23 ° C as detailed in O'Hare et al. [26].

Brain intra-ventricular Injection

Embryos at 1 day post-fertilization (dpf) had their chorion removed and were prepared for brain intra-ventricular injection according to Gutzman and Sive (2009) [27] as described in Nery et al. (2014) [21]. Embryos were anesthetized with tricaine (MS-222, Sigma-Aldrich) and placed in 0.75% agar-coated dishes so that the hindbrain ventricle was accessible for injection. The microinjection needle attached to a micromanipulator (Narishige) and a PicoLiter injection pump (Warner Instruments) was used under a stereomicroscope (Nikon, SMZ 1500). The needle was carefully placed on the roof plate of the hindbrain and 5–10 nl of the A β_{42} solutions in 1% DMSO 0.5% Phenol Red Phosphate Buffered Saline (PBS) solution was injected while the control group received the equivalent 1% DMSO 0.5% Phenol Red in PBS vehicle. The procedure took no more than 10 minutes per animal and all groups were run and analyzed simultaneously throughout the study. After the injections the animals were transferred to 6-well plates (15 animals per well) and maintained in the incubator for 4 days.

Animals were assigned to the following groups and subsequent analyses were performed blind throughout the study: vehicle injected controls (Control group), animals injected with A β_{42} solutions prepared as previously validated to contain Monomers

(Monomer group), Oligomers (Oligomer group) and fibrillar forms of A β ₄₂ (Fibrillar group) (Figure 1).

Survival and morphological evaluation

Survival and morphological defects were monitored daily under a stereomicroscope (Nikon, SMZ 1500) from day 1 to 5 during the daily media change. The morphological phenotypes analyzed included pericardial and brain edema, aberrations in yolk extension, eyes and tail malformations and blood accumulation. Survival was analyzed using Kaplan-Meier test^[21].

Behavioral Analysis

Exploratory test

At 5 dpf, animals were individually exposed to a new environment to test their exploration and locomotion abilities^[28] (n = 20 animals in triplicate). The new environment consisted of a 24-well plate well with 3 ml of water in which behavioral parameters were analyzed for 5 minutes after 1min of habituation. Animal's performances in the round arena were recorded with an HD digital webcam (Logitech) and blindly analyzed using an automated protocol (ANYmaze, Stoelting). Among the evaluated parameters were the total distance traveled, speed when active, periods of activity and thigmotaxis (preference for the outer portions of the arena^[29]).

Avoidance task

For assessing animals' cognitive capacity, their scape response to an aversive stimulus (a 1.35 cm diameter red bouncing ball) was tested in 6-well cell culture plates in which they were placed 5 animals per well (n = 10 in triplicate) according to Nery et al. (2014)^[21] in a protocol adapted from Pelkowski et al. (2011)^[30]. The plate was adjusted on the surface of an LCD screen in which an animation was presented for 5 minutes after 2 minutes of habituation.

The red bouncing ball travelled from left to right over a straight 2 cm trajectory on half of the well area (stimuli area) and animal's scape efficiency was measure according to their distribution on the opposite hemisphere (non-stimulus area) after successive intervals.

Animals' performance was recorded with an HD digital webcam (Logitech) and analyzed by "blind observers". Both behavioral experiments were performed in a controlled temperature environment (27 ± 2 °C).

Enzyme-linked immunosorbent assay of A β ₄₂ detection

A β ₄₂ brain levels were quantified using an A β ₄₂ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Human A β ₄₂ Ultrasensitive ELISA Kit, Life). At 5 dpf the larvae were cricoanesthetized and euthanized by decapitation. Dissected brains (pool of 20 animals per group in triplicate) were stored in a freezer -80°C in a protease inhibitor (Sigma-Aldrich) and homogenized with RIPA (Sigma-Aldrich). Samples were incubated in the 96-well plate containing human A β ₄₂ antibody overnight at 4°C. After the incubation period the wells were washed and the secondary antibody HRP IgG was added for 30 min before a final wash. The reading was performed with absorbance of 450nm at Spectramax M2 reader (Molecular Devices, USA).

Statistical analysis

Survival throughout the 5 experimental days was analyzed by Kaplan-Meier test. Data from the other approaches were parametrically analyzed after normality confirmation using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. The level of significance was considered $p < 0.05$.

Results and Discussion

During the 5 days of evaluation no significant morphological effect was attributed to the injection regimens nor any delay in hatching rates among groups was observed. Kaplan-Meier survival curves are presented in Figure 1 and show no significant effect when all groups were compared (Log-rank (Mantel-Cox) test $p = 0.2738$, $n = 60$).

These results are in accordance to Gutzman and Sive, 2009^[27] and our previous study^[21] showing no significant deleterious effects of the injection procedure. Despite being an invasive process in a young animal, intraventricular injections in 1dpf zebrafish embryos is a viable process and may be further explored. Importantly, the process is also very fast and

precise and confirmation of correct injection site occurs in real time due to animals transparency and use of phenol red, different from equivalent approaches in rodents in which a post-mortem histological evaluation is necessary to confirm cannula placement and injection site.

The evaluation of 5dpf larvae exploratory behavior when individually exposed to a new environment was used to assess general locomotion, orientation and anxiety parameters and showed no differences between groups (Figure 2). As shown in Figure 1, no significant differences were observed in the total travelled distance during the 5 minutes exploration period ($p = 0.830$ $F_{(3,143)} = 0.293$) (Figure 2A) and the mean speed when active ($p = 0.881$ $F_{(3,143)} = 0.221$) (Figure 2B), among other testes parameters not shown. These results support the lack of other unspecific effects of injection and ensured that animals could be further compared in the subsequent cognitive test.

When animals from different groups with equivalent exploratory performances were cognitively tested regarding their ability to avoid an aversive stimulus, a significant deficit in the oligomer-injected group was observed when compared to controls ($p = 0.008$ $F_{(3,116)} = 4.527$) (Figure 2C). Our findings corroborate other demonstrations of deleterious cognitive effects of soluble A β injection into the brain ventricle of rodents ^[8,10,31,32,33]. We have also previously demonstrated a deleterious effect of A β oligomeric injection in the hindbrain ventricle of zebrafish, corroborating data pointing to neurotoxic effects of soluble oligomeric A β forms. Our data contrasts the results from O'hare and collaborators ^[26] that deleterious cognitive effects of fibrillar A β_{42} intrahippocampal injection in rats. The observed effect, however, was only evident after several weeks, what could be attributed to other cellular and molecular effects related to inflammation and microglial activation. Oligomeric assemblies of A β vary significantly in their size and tissue distribution and future studies should detail forms associated with this effect and its potential targets ^[8,10].

Next we tested the potential accumulation of A β in the brain of injected animals by ELISA. Despite the proliferative and clearance prone cellular scenario of zebrafish brain at this early developmental stage, a significant increase in A β_{42} levels was observed in animals injected with the preferential fibrillar solution ($p = 0.03$ $F_{(3,18)} = 3.676$) (Figure 3). The method used is capable of selectively detecting peptides of 42 aminoacids with a very high

sensitivity, supporting the efficacy of the protocol used to prepare the fibrillar forms of A β ₄₂^[26]. To our knowledge, this is the first quantification of A β brain levels in zebrafish using ELISA. This finding reinforces the aggregation and clearance resistant nature of A β ₄₂ fibrils and this model's potential contribution for studies of the molecular events associated to A β ₄₂ deposits. It remains to be investigated the specific tissue and cellular distribution of the increase observed in the fibrillar-injected group, as well as the deposits characteristics. Importantly, this data supports evidences of memory impairment effects of oligomeric forms of A β independently of plaques and neuronal loss^[10].

The escalation in elderly population makes increasingly important to study the neurodegenerative diseases associated with aging such as AD, which is usually diagnosed late and barely treatable for symptoms. Understanding the disease underlying mechanisms at early stages is of paramount importance for mechanistic and therapeutic purposes. The updated amyloid cascade^[34] suggests that A β has toxic effects from early stages, before plaques deposition, and reinforce the need to understand the molecular alterations that occurs in the early stages of the disease^[35,36]. Future studies using ventricular injections in zebrafish could contribute to current efforts to elucidate the differential toxicity of oligomeric forms, its target membrane receptors and underlying signaling pathways connecting to tau hyperphosphotilation and other cellular events^[37,38].

Acknowledgements: This work was supported by Fundação de Amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (2352-2551/14-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (484124/2013-7 and 467572/2014-3). N.S.E. received a graduate fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). G.U. and C.P. were recipients of FAPERGS fellowships. L.R.N. and M.R.M.V. are CNPq fellows.

References:

- [1] Tjin PV, Kamphuis W, Marlatt MW, Hol EM, Lucassen PJ (2011). Presenilin mouse and Zebrafish models for dementia: Focus on neurogenesis. *Progress in Neurobiology*. **93**,149-164.
- [2] Alzheimer's Disease International. Policy Brief for Heads of Government The Global Impact of Dementia 2013–2050, <https://www.alz.co.uk/research/G8-policy-brief>, Last updated June 20, 2017, Accessed on May 29, 2017.
- [3] Haass C, Selkoe DJ (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112.
- [4] Hardy JA, Higgins GA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**, 184–185.
- [5] Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 3228–3233.
- [6] Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA (1990). Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **137**, 1293–1297.
- [7] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000). High-level neuronal expression of abeta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20**, 4050–4058.
- [8] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* **8**, 79-84.
- [9] Reed MN, Hofmeister JJ, Jungbauer L, Welzel AT, Yu C, Sherman MA, Lesné S, LaDu MJ, Walsh DM, Ashe KH, Cleary JP (2011). Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived A β oligomers. *Neurobiol Aging*. **32**, 1784-1794.
- [10] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. **440**, 352-357.
- [11] Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* **14**, 837-842.

- [12] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. **416**, 535–539.
- [13] Wang ZH, Zagzag D, Zeng B, Kolodny EH (1999). In vivo and in vitro glioma cell killing induced by an adenovirus expressing both cytosine deaminase and thymidine kinase and its association with interferon-alpha. *J Neuropathol Exp Neurol*. **58**, 847-858.
- [14] Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. **283**, 1571-1577.
- [15] Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. **155**, 853-862.
- [16] Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. **15**, 349–357.
- [17] Larson ME, Lesné SE (2012). Soluble A β oligomer production and toxicity. *J Neurochem*. **1**, 125-39.
- [18] Phillips JB, Westerfield M (2014). Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis Model Mech*. **7**, 739-743.
- [19] Santoriello C, Zon LI (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest*. **122**, 2337-2343.
- [20] Santana S, Rico EP, Burgos JS (2012). Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease?. *Am J Neurodegener Dis*. **1**, 32–48.
- [21] Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhonfen S, Guerra HN, Freitas VM, Bonan CD, Vianna MR (2014) . Brain Intraventricular Injection of Amyloid- β in Zebrafish Embryo Impairs Cognition and Increases Tau Phosphorylation, Effects Reversed by Lithium. *PLoS One*. **9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0105862.
- [22] Westerfield, Monte. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000.
http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Last updated May 29, 2007, Accessed on January 29, 2008.
- [23] CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 2005:94.

- [24] Cameron DJ, Galvin C, Alkam T, Sidhu H, Ellison J, Luna S, Ethell DW (2012). Alzheimer's-Related Peptide Amyloid- β Plays a Conserved Role in Angiogenesis. *PLoS One*. **7**, DOI: e39598. doi:10.1371/journal.pone.0039598
- [25] Pontrello CG, Sun MY, Lin A, Fiacco TA, DeFea KA, Ethell IM (2012). Cofilin under control of β -arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD), and learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 442–451.
- [26] O'Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, Ghilardi JR, Finke MP, Kuskowski MA, Maggio JE, Shephard RA, Cleary J (1999). Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1–42). *Brain Res*. **815**, 1-10.
- [27] Gutzman JH, Sive H (2009) Zebrafish Brain Ventricle Injection. *J Vis Exp*. DOI: 10.3791/1218.
- [28] Creton R (2009). Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. **203**, 127-136.
- [29] Schnörr SJ, Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav Brain Res*. **228**, 367-74.
- [30] Pelkowski SD, Kapoor M, Richendrfer HA, Wang X, Colwill RM, Creton R (2011). A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in Zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. **223**, 135-144.
- [31] Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010). Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 2295–2300.
- [32] Balducci C, Forloni G (2014). In vivo application of beta amyloid oligomers: a simple tool to evaluate mechanisms of action and new therapeutic approaches. *Curr Pharm Des*. **20**, 2491-505.
- [33] Epelbaum S, Youssef I, Lacor PN, Chaurand P, Duplus E, Brugg B, Duyckaerts C, Delatour B (2015). Acute amnestic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. *Neurobiol. Aging*. **36**, 2043–2052.
- [34] Hardy J (2017). The Discovery of Alzheimer causing Mutations in the APP Gene and the Formulation of the "Amyloid Cascade Hypothesis". *FEBS J*. DOI: 10.1111/febs.14004.
- [35] Dumurgier J, Gabelle A, Vercautere O, Bombois S, Laplanche JL, Peoc'h K, Schraen S, Sablonnière B, Pasquier F, Touchon J, Lehmann S, Hugon J, Paquet C (2013). Exacerbated CSF abnormalities in younger patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. **54**, 486–491.

[36] Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. **42**, 631–639.

[37] Brito-Moreira J, Lourenco MV, Oliveira MM, Ribeiro FC, Ledo JH, Diniz LP, Vital JFS, Magdesian MH, Melo HM, Barros-Aragão F, de Souza JM, Alves-Leon SV, Gomes FCA, Clarke JR, Figueiredo CP, De Felice FG, Ferreira ST (2017). Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem.*, **292**(18):7327-7337.

[38] Amar F, Sherman MA, Rush T, Larson M, Boyle G, Chang L, Götz J, Buisson A, Lesné SE (2017). The amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations in neuronal signaling that lead to tau phosphorylation and aggregation. *Sci Signal.*, **10** (478). pii: eaal2021.

Figures and legends:

Figure 1:

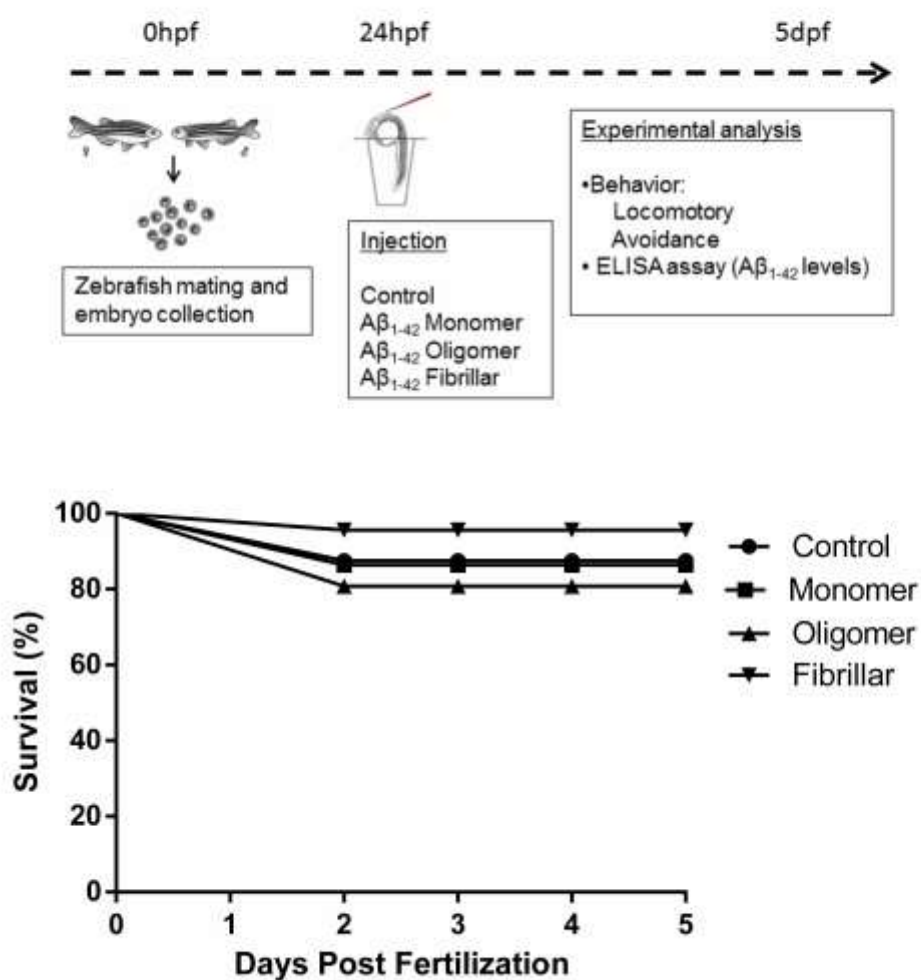


Figure 1: Study design and Kaplan-Meier Survival Curve. Representation of the study design and Kaplan-Meier survival curves: Groups had their survival rates daily monitored during the 5 days. There was no statistical difference on the survival rate between groups (Log-rank (Mantel-Cox) test $p=0.2738$, $N=60$).

Figure 2:

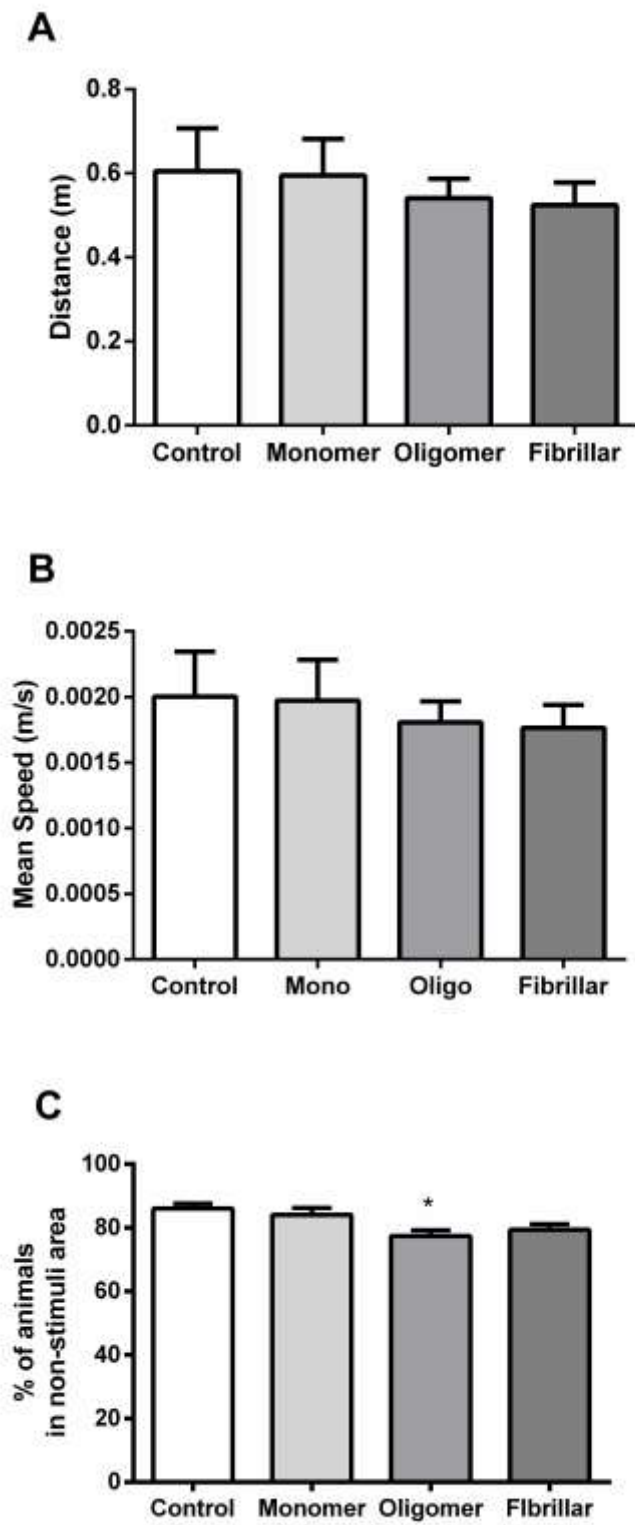


Figure 2: Behavioral effects of A β injection at 5 dpf on Exploratory parameters (A and B) and on Cognitive Responses (C). Distance traveled (A) and Mean Speed (B) (n = 20 individuals per group in triplicate) had no statistical differences between groups using One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc. Intraventricular injection of oligomeric A β_{42} significantly impaired avoidance of an aversive stimulus (C). One-way ANOVA followed by Tukey demonstrated a significant effect between animals injected with oligomeric A β_{42} and controls (*p= 0.008 $F_{(3,116)}= 4.527$) (n = 10 individuals per group in triplicate). Charts are plotted with means and SEM.

Figure 3:

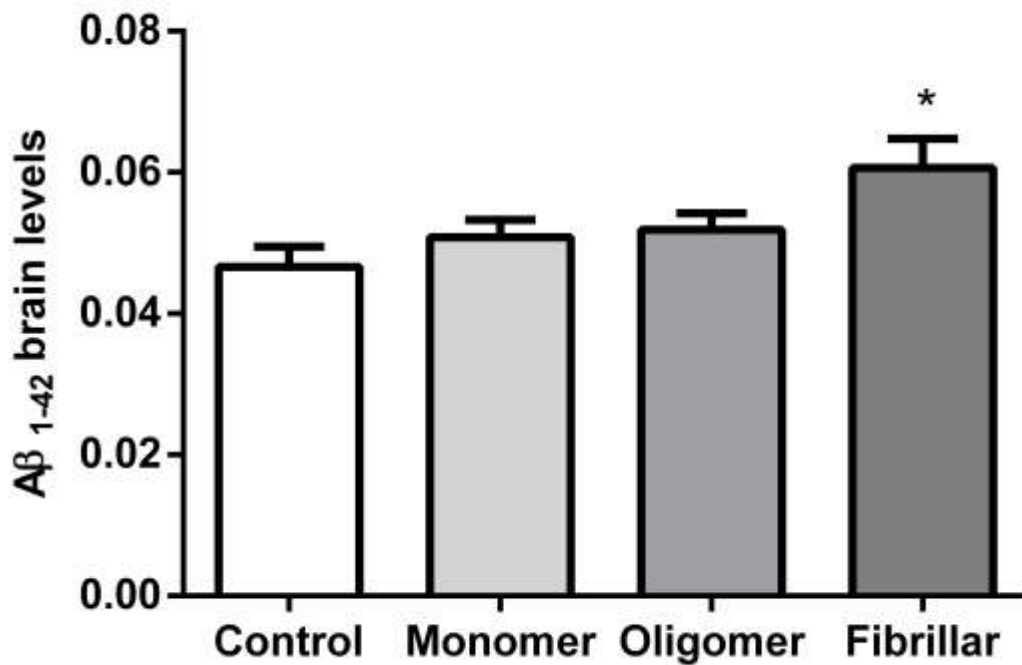


Figure 3: Relative Aβ₄₂ levels measured by ELISA. Aβ₄₂ levels in the 5dpf larvae brains were measured using a sandwich ELISA assay. Animals injected with the fibrillar form showed a significant increase in Aβ₄₂ levels in the brain compared to controls using a One-way ANOVA followed by Tukey ($p=0.03$ $F_{(3,18)}=3.676$). Columns represent means and SEM.

CAPÍTULO 3

1 RESULTADOS ADICIONAIS

Além dos resultados compilados no manuscrito apresentado no capítulo 2, outros resultados obtidos são apresentados neste capítulo. Eles não foram incluídos no artigo por terem sido insuficientemente avaliados ou terem enfrentados problemas técnicos.

1.1 Resultados do teste inicial com fármaco neuroprotetor

Antes de expor os animais injetados com A β à rapamicina, candidato a agente neuroprotetor, fizemos uma curva de concentração a fim de determinar qual seria a melhor a ser utilizada. Após a fecundação dos embriões, eles foram recolhidos, limpos e expostos com 2hpf a concentrações de 0,12; 0,24; 0,48; 0,96 e 1,92 μ M de rapamicina, acompanhados de um grupo controle (água), os animais foram armazenados em placas de 96 poço (1 animal por poço). Ao longo dos cinco dias, os animais tiveram a sobrevivência e morfologia analisadas diariamente a fim de observar se o fármaco causou alguma alteração no plano encefálico e na região ocular, nenhum efeito morfológico foi encontrado nos animais. A sobrevivência foi analisada através de uma curva de Kaplan-Meier (Figura 1) e não apresentou diferença significativa entre os grupos (Log-rank (Mantel-Cox) test $p=0.1266$, $N=30$), mesmo testados separadamente não apresentaram diferença estatística, sendo comum no primeiro dia pós-fertilização (dpf) uma leve mortalidade.

Aos 5dps foi realizada uma tarefa exploratória (Figura 2), nos parâmetros analisados de distância percorrida ($p=0.1443$ $F_{(5,66)}=1.711$) e velocidade média ($p=0.3051$ $F_{(5,66)}=1.230$), os grupos não apresentaram diferença significativa. A partir dos resultados obtidos, a concentração escolhida para os testes com A β foi a de 0,96 μ M.

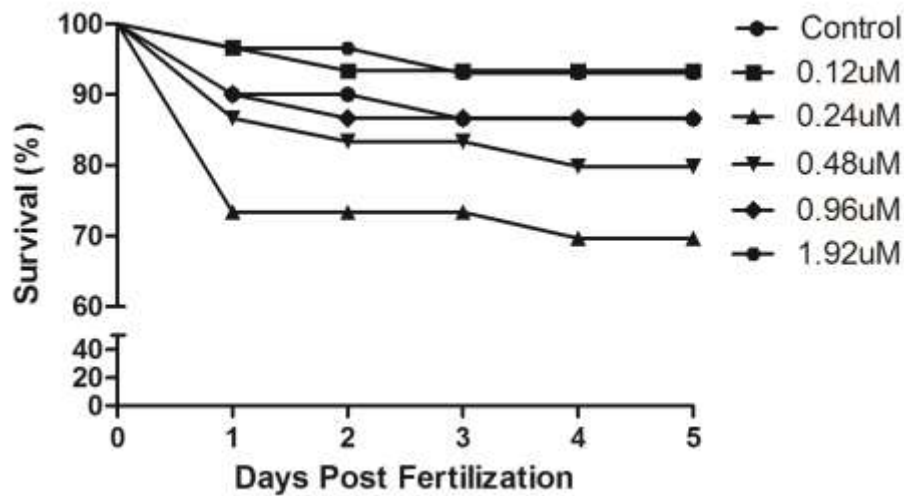


Figura 1: Sobrevivência de Kaplan-Meier. Animais tratados com rapamicina em diferentes concentrações não apresentaram diferença estatística (Log-rank (Mantel-Cox) test $p=0.1266$, $N=30$).

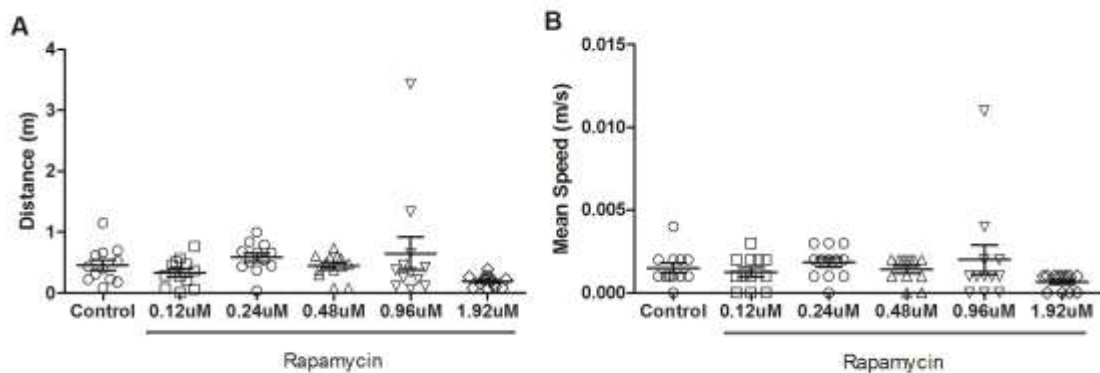


Figura 2: Efeitos comportamentais da exposição à rapamicina aos 5dpf. Parâmetros comportamentais (média \pm DP), incluindo distância percorrida (A) e velocidade média (B), não apresentaram diferença significativa One-way ANOVA seguida por post-hoc Tukey.

1.2 A β e Rapamicina

Embrões com 2hpf foram tratados com rapamicina 0,96uM em placas de petri (30 animais por placa), ao completarem 24hpf tiveram o corion removido, foram anestesiados e injetados com 10 μ M de solução de A β 1-42 em 1% PBS das três formas (grupos: monômero,

oligômero e placa) e solução veículo 1% PBS em corante vermelho (controle) sempre em tratamento. Ao completarem 2dpf, tivemos uma mortalidade de 70% nos grupos monômero e placa, nos demais grupos controle e oligômero foi 100%. Na segunda tentativa, ao completarem 24hpf, os animais que sobreviveram não estavam viáveis para o procedimento de injeção. Com isso, testei as diferentes concentrações apenas na placa a fim de ver se o meio tornaria a ficar esbranquiçado como nos experimentos anteriores, testando também animais injetados apenas com o corante vermelho e animais sem tratamento. Animais injetados e tratados morreram ao completarem 2dpf, já os animais que não receberam tratamento sobreviveram até os 5dpf.

1.3 Ensaio para avaliação de Morte Celular

Ao completarem 5dpf, os animais injetados com as diferentes formas da proteína A β (monômero, oligômero e placa), acompanhados de um grupo veículo (controle), foram anestesiados e expostos ao kit YO-PRO por 1h sem contato com a luz, após realizada lavagem com água, os animais foram acomodados em placas de petry com agar e visualizados num microscópio com luz invertida para a obtenção das imagens.

Todos os grupos apresentaram marcações de morte por apoptose na região do encéfalo, porém o grupo injetado com placa apresenta uma região maior marcada (em verde) (Figura 3 D-D'). Atualmente estes resultados estão em fase de análise e determinação da forma de quantificação.

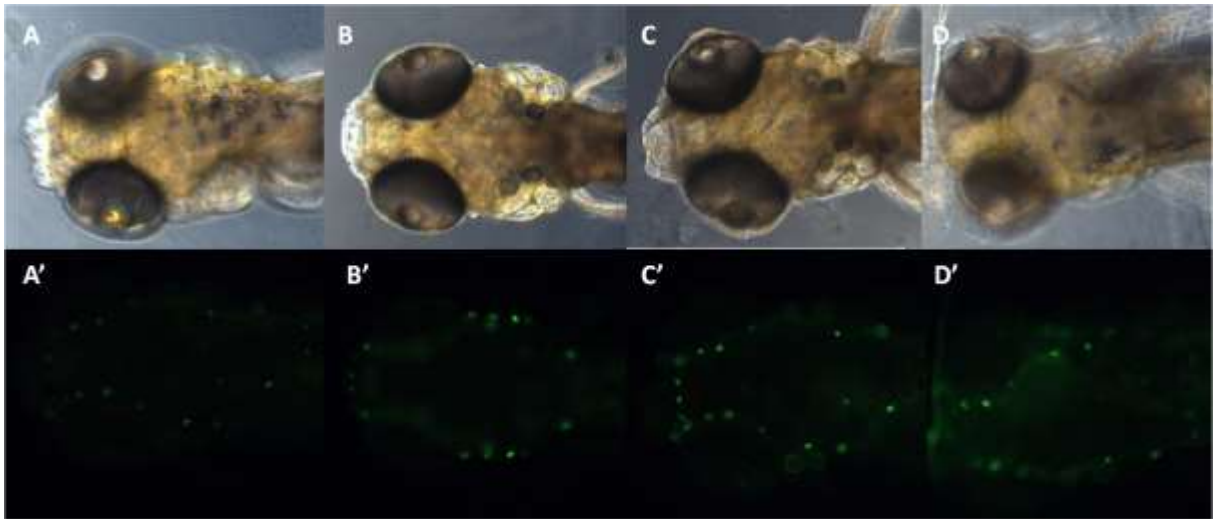


Figura 3: Detecção de apoptose por YO-PRO. A) Controle B) Monômero C) Oligômero D) Placa. A') Controle B') Monômero C') Oligômero D') Placa marcados para apoptose.

1.4 Western Blotting

Ao completarem 5dpf, os animais foram anestesiados e passaram por eutanásia por decapitação, depois tiveram o encéfalo dissecado e armazenado em inibidor de protease a -80°C [50]. Após a homogeneização e quantificação proteica (amostras apresentaram cerca de 20mg/ml de proteína), as amostras foram aplicadas em um gel de acrilamida, corridas e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Utilizamos Ponceu red para verificação da presença das proteínas na membrana e este se mostrou positivo. Após isso, incubamos com os anticorpos primários e secundários específicos e não foi possível observar nenhuma banda através da revelação com o kit ECL. Realizamos 3 tentativas com amostras diferentes, renovando os reagentes. Não foi possível adquirir uma especificidade dos anticorpos suficiente para a quantificação através desta técnica. Supomos que os anticorpos não tenham afinidade com essas amostras, visto que, em outras preparações de encéfalo de *zebrafish*, foi possível realizar esta técnica.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento da expectativa de vida e conseqüentemente aumento dos casos de demência e em especial a DA^[5], a busca pela compreensão dos mecanismos moleculares que estão associados à doença e a identificação de processos moleculares relevantes cujos alvos possam ser a base no desenvolvimento de fármacos eficazes é crítica^[51]. Esta motivação deu origem ao trabalho aqui apresentado que pretendeu estudar aspectos moleculares e comportamentais da DA num promissor modelo animal.

De forma molecular, a DA é caracterizada pela presença de β -amiloide, sendo encontrada em diferentes formas e tamanhos, e também pelo acúmulo da proteína tau hiperfosforilada^[14]. Nossa principal motivação foi caracterizar eventuais diferenças em soluções com diferentes potenciais agregadores de peptídeo $A\beta_{1-42}$. Para isso, realizamos injeções no ventrículo cerebral de embriões com 24hpf de soluções que favoreciam diferentes formas de $A\beta$ (monômeros, oligômeros e a formação de placas). Aos 5dpf foram observados aspectos moleculares e comportamentais, incluindo o desempenho cognitivo dos animais em uma tarefa aversiva. Os animais que receberam a injeção de oligômero apresentaram um pior desempenho na tarefa cognitiva sem deficit em aspectos gerais de locomoção e motivação que pudessem potencialmente comprometer os resultados observados, corroborando com estudos nos quais o oligômero altera a cognição e a memória^[52] e aqueles que sugerem que esta seja uma forma tóxica em adição às placas^[26,38]. Ao analisar o nível de $A\beta$ no encéfalo dos animais, vimos que o grupo injetado com a forma placa apresentou um nível significativamente maior, o que era esperado, uma vez que as placas se depositam^[53] e possuem maior dificuldade de *clearance*^[54]. Juntos, estes resultados reforçam a visão moderna de que a forma mais tóxica de $A\beta_{1-42}$ não são as placas e sim as versões solúveis que podem atuar sobre vias de sinalização e induzir efeitos neurotóxicos^[17,25].

Neste contexto, além da solubilidade e capacidade de interagir com receptores de membrana celular, a eliminação da proteína ou *clearance* é outro fator importante quando se pretende entender o real papel do peptídeo $A\beta$ na DA. Nos últimos anos, autores têm

focado não apenas no acúmulo, mas no controle dos níveis de peptídeo pelas taxas de eliminação do *clearance* como principal fator para o desenvolvimento da DA ^[55]. Sabe-se que a microglia possui um papel importante da regulação dos níveis de amiloide cerebral e a deposição ^[56], além disso, a eliminação no fluido intersticial e vasos sanguíneos e a atividade de proteases contribuem para o processo. Tendo em vista o estudo da limpeza da A β associado à facilidade de manipulação do *zebrafish*, futuramente serão realizadas injeções com a A β fluorescente a fim de observar o processo de *clearance* e larvas de *zebrafish* injetadas com soluções com perfil agregador de A β .

REFERÊNCIAS

- 1 WHO. Global Health and Aging. 2011
- 2 WHO. "Ageing well" must be a global priority. 2014. (<http://www.who.int>), acessado em janeiro de 2017
- 3 Authoritative information and statistics to promote better health and wellbeing (<http://www.aihw.gov.au>), acesso em janeiro de 2017
- 4 Alzheimer's Disease International. The Global Impact of Dementia 2013-2050'. 2013
- 5 WHO. Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored. 2012
- 6 Alzheimer's Disease International. Alzheimer Disease Diagnostic (<http://www.alz.org>), acessado em janeiro de 2017
- 7 Johnson KA, Minoshima S, Bohnen NI, Donohoe KJ, Foster NL, Herscovitch P, Karlawish JH, et al. Appropriate use criteria for amyloid PET: A report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. *Alzheimer's & Dementia*. (2013) 9: 1-16
- 8 Mandelkow EM & Mandelkow E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. (2012)
- 9 Newman M, Verdile G, Martins RN, Lardelli M. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2100) 1812: 346-352
- 10 Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Alzheimer's Disease Is the Most Common Neurodegenerative Disorder. 6th edition
- 11 Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. (1984) 3: 885-90
- 12 Tschanz JT, Norton MC, Zandi PP, Lyketsos CG. The Cache County Study on Memory in Aging: Factors Affecting Risk of Alzheimer's disease and its Progression after Onset. *Int Rev Psychiatry*. (2013) 25: 673-685
- 13 Tjin PV, Kamphuis W, Marlatt MW, Hol EM, Lucassen PJ. Presenilin mouse and Zebrafish models for dementia: Focus on neurogenesis. *Progress in Neurobiology*. (2011) 93: 149-164

- 14 Roberson ED, Muck L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*. (2006) 314:781-784
- 2 15 Guo Q, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H. APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Research*. (2012) 22: 78-89
- 16 Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. (1991) 349: 704-706
- 17 Ferreira, S.T., Klein, W.L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*. (2011) 96: 529-543
- 18 Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. (1995) 269: 970-3
- 19 Newman M, Musgrave IF, Lardelli M. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta*. (2007) 3: 285–97
- 20 De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. (2010) 2: 99-107
- 21 Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Lett*. (2000) 483: 6-10
- 22 Tseng BP, Esler WP, Clish CB, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV, et al. Deposition of monomeric, not oligomeric, Abeta mediates growth of Alzheimer's disease amyloid plaques in human brain preparations. *Biochemistry*. (1999) 38:10424–10431
- 23 Selkoe, D.J. Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell*. (1989) 58: 611-612
- 24 Allsop D, Wong CW, Ikeda S, Landon M, Kidd M, Glenner GG. Immunohistochemical evidence for the derivation of a peptide ligand from the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer disease. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. (1998) 85: 270-2794
- 25 Glabe CG. Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *J Biol Chem*. (2008) 44: 29639–29643

- 26 Hardy J. The Discovery of Alzheimer causing Mutations in the APP Gene and the Formulation of the "Amyloid Cascade Hypothesis". *FEBS J.* (2017) 284:1040-1044
- 27 Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience.* (2015) 6:794–799
- 28 Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* (2012) 148: 1204-1222
- 29 Verma M, Vats A, Taneja V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol.* (2015) 2:138–145
- 30 Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* (2008) 83: 13-34
- 31 Götz J, Ittner LM. Animal Models Of Alzheimer's Disease And Frontotemporal Dementia. *Nature Reviews Neuroscience.* (2008) 9: 532-544
- 32 Head E, N.W. Milgram and C.W. Cotman. Neurobiological models of aging in the dog and other vertebrate species, in: *Functional Neurobiology of Aging.*, P.R. Hof and C.V. Mobbs. Academic Press. (2001) 457– 468
- 33 Cotman CW, Head E. The Canine (Dog) Model of Human Aging and Disease: Dietary, Environmental and Immunotherapy Approaches. *Journal of Alzheimer's Disease.* (2008) 15: 685–707
- 34 Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet.* (2014) 30: 185-189
- 35 Vallée A, Lecarpentier Y. Alzheimer Disease: Crosstalk between the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway and PPARs Alpha and Gamma. *Front Neurosci.* (2016) 10: 459-471
- 36 Cunvong K, Huffmire D, Etthel DW, Cameron DJ. Amyloid- β increases capillary bed density in the adult zebrafish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2013) 54:1516
- 37 Donnini S, Giachetti A, Ziche M. Assessing vascular senescence in zebrafish. *Methods Mol Biol.* (2013) 965:517-31
- 38 Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhonfen S, Guerra HN et al. Brain Intraventricular Injection of Amyloid- β in Zebrafish Embryo Impairs Cognition and Increases Tau Phosphorylation, Effects Reversed by Lithium. *PLoS One.* (2014) 9:e105862

- 39 Kim HY, Lee DK, Chung BR, Kim HV, Kim Y. Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *Jove*. (2016) doi:10.3791/53308
- 40 Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*. (1975) 28:721–726
- 41 Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo)*. (1978) 31: 539-45.
- 42 Mathieu I and David MS. mTOR Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. (2012) 4: a011593.
- 43 Tese Anna MS. O papel do sistema purinérgico e da via de sinalização TOR em crises convulsivas e estresse oxidativo. (2013)
- 44 Siebel AM, Menezes FP, da Costa Schaefer I, Petersen BD, Bonan CD. Rapamycin suppresses PTZ-induced seizures at different developmental stages of zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. (2015)
- 45 Powers RW3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*. (2006) 20: 174-84.
- 46 Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*. (2007) 12: 112-24
- 47 Cai Z, Zhao B, Li K, Zhang L, Li C, Quazi SH, Tan Y. Mammalian target of rapamycin: a valid therapeutic target through the autophagy pathway for Alzheimer's disease? *J Neurosci Res*. (2012) 90: 1105-18
- 48 Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends life-span in genetically heterogeneous mice. *Nature*. (2009) 460: 392–395
- 49 Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*. (2010) 285: 13107–13120

- 50 Nornes S, Groth C, Camp E, Ey P, Lardelli M. Developmental control of Presenilin1 expression, endoproteolysis, and interaction in zebrafish embryos. *Exp Cell Res.* (2003) 289:124–132
- 51 Abbott A, Dolgin E. Failed Alzheimer's trial does not kill leading theory of disease. *Nature.* (2016) 540:15-16
- 52 Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neuroscience.* (2005) 8: 79–84
- 53 Gouras GK, Relkin NR, Sweeney D, Munoz DG, Mackenzie IR, Gandy S. Increased apolipoprotein E epsilon 4 in epilepsy with senile plaques. *Ann Neurol.* (1997) 3: 402-4
- 54 Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J. P., Cribbs, D. H. & LaFerla, F. M. A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated τ aggregates via the proteasome. *Neuron.* (2004) 43:321–332
- 55 Sang-Sun Yoon and Sangmee Ahn Jo. Mechanisms of Amyloid- β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease *Biomol Ther (Seoul).* (2012) 20: 245–255
- 56 Zhiqiang L, Carlo C, Aaron S, Roa Harb, Jaime G. CX3CR1 in Microglia Regulates Brain Amyloid Deposition through Selective Protofibrillar Amyloid- β Phagocytosis *The Journal of Neuroscience.* (2010) 30: 17091-17101.

APÊNDICE



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 97/2015 - CEUA

Porto Alegre, 03 de dezembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),


A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00490 intitulado "**Efeito da injeção da proteína β -amiloide (1-42) no encéfalo: Um modelo de Doença de Alzheimer em zebrafish**".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
5.372	Danio rerio	12/2015 – 03/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Mônica Ryff Moreira Vianna
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365