

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR  
DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

PAULO CESAR PATTA

**INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE FORMAS AMILOIDES EM *ZEBRAFISH*  
(*Danio rerio*) ADULTOS JOVENS E IDOSOS:  
EFEITOS COMPORTAMENTAIS E PROTEÔMICOS**

Porto Alegre  
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Injeção intracerebroventricular de formas amiloides em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos  
jovens e idosos: efeitos comportamentais e proteômicos**

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul.

**Aluno: Paulo Cesar Patta**  
**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Monica R. M. Vianna**

**PORTO ALEGRE**  
**2020**

## Ficha Catalográfica

P315i Patta, Paulo Cesar

Injeção intracerebroventricular de formas amiloides em zebrafish (*Danio rerio*) adultos jovens e idosos : efeitos comportamentais e proteômicos / Paulo Cesar Patta . – 2020.

76.

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

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

1. Alzheimer. 2. Zebrafish. 3. cognição. 4. injeção intracerebroventricular. 5. Aβ42. 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).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

**PAULO CESAR PATTA**

**Injeção intracerebroventricular de formas amiloides em *zebrafish* (*Danio rerio*) jovens adultos e idosos: efeitos comportamentais e proteômicos**

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

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCADA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Cantarelli Machado

\_\_\_\_\_

Dr. Fabiano Perez Menezes

Porto Alegre  
2020

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, sendo a causa mais comum de demência em idosos. Apesar da prevalência e severidade desta doença, são poucos os agentes terapêuticos disponíveis, sendo a maior parte pouco efetiva e restrita a retardar ou diminuir sintomas durante um período inicial após diagnóstico. Tratamentos preventivos ou que combatam efetivamente a patologia não estão disponíveis, em parte pela falta de entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo seu desenvolvimento e progressão. O *zebrafish* é um animal modelo interessante para o estudo da DA devido ao seu desenvolvimento rápido, proximidade genética de humanos e facilidade de manutenção. Técnicas de manipulação genética e injeção de compostos são exemplos de estratégias de indução de sintomas ou características moleculares da doença neste modelo. Esta Tese apresenta uma estratégia baseada em injeção cerebroventricular (CV) de A $\beta$ <sub>42</sub> em estado monomérico, oligomérico e protofibrilar no encéfalo de *zebrafish* adultos jovens (6 meses) e velhos (36 meses). Os animais injetados CV apresentaram diferenças comportamentais e locomotoras entre os dois grupos de idades, sendo que apenas os animais velhos demonstraram déficit exploratório nos grupos injetados com solução oligomérica e protofibrilar aos 7 dias pós injeção (dpi). No entanto, estas mesmas soluções causaram déficit cognitivo na tarefa de esQUIVA inibitória em adultos jovens e velhos 21 dias após a injeção. Encéfalos destes animais foram analisados por Espectrometria de Massa de forma comparativa e proteínas com variações de pelo menos 1.5 vezes foram divididas entre grupos baseadas em sua função como relação com neurotransmissão, sistema imune, metabolismo e atividade mitocondrial. Também foi desenvolvido o uso de CRISPR-Cas9 na produção de linhagens *knockout* de *zebrafish* para genes relacionados com a DA a fim de gerar modelos complementares aos existentes a fim de contribuir para o entendimento de aspectos da DA, projeto que se encontra na etapa de detecção das mutações na segunda geração heterozigótica.

Palavras-chaves: Alzheimer, *Zebrafish*, cognição, injeção intracerebroventricular, A $\beta$ <sub>42</sub>, proteoma

## ABSTRACT

The Alzheimer Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease, being the most common form of dementia in elderly people. Despite the prevalence and severity of this disease there are few therapeutic agents available, and their effectiveness is low, restrained to slow or attenuate the symptoms during an initial period after the diagnosis. Preventive or effective treatment for this pathology are not available, mostly because the lack of understanding of the physiopathological mechanisms responsible for the disease progression. The zebrafish is an interesting animal model for studying AD because of its fast development, genetic resemblance with humans and its easy husbandry. This thesis presents a strategy is based on cerebroventricular (CV) injection of A $\beta$ <sub>42</sub> in monomeric, oligomeric and protofibrillar states on young (6 months) and old (36 months) adults. The animals CV injected showed behavioral and locomotor differences between the two age groups, where only old animals showed an exploratory deficit in the groups injected with oligomeric and protofibrillar solution at 7 days post injection (dpi). However, these same solutions caused cognitive deficit observed in the inhibitory avoidance experiment in young and old adults after 21 dpi. Brain of these animals were analyzed by Mass Spectrometry comparatively and proteins with variations of at least 1.5 times were divided between groups based on their function as related to neurotransmission, immune system, metabolism and mitochondrial activity. Furthermore, this thesis presents the application of CRISPR-Cas9 technique in the production of knockout strains of zebrafish for genes related to AD, currently at the sequencing and detection of mutations on second generation heterozygotes.

Palavras-chaves: Alzheimer, *Zebrafish*, cognition, cerebroventricular injection, A $\beta$ <sub>42</sub>, proteome

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Marcadores da Doença de Alzheimer. ....	10
Figura 2. Estrutura e metabolismo de APP e seus produtos. ....	12
Figura 3. Posições de modificações pós-tradução conhecidas em A $\beta$ <sub>42</sub> . ....	13
Figura 4. Estruturas quaternárias de A $\beta$ .....	15
Figura 5. Sítios de fosforilação de Tau. ....	16
Figura 6. Interação de A $\beta$ e Tau dirigindo a progressão da DA. ....	17
Figura 7. A $\beta$ é uma neuropeptídeo antigo e conservado em vertebrados. ....	19
Figura 8. Aspectos evolucionários do genoma de <i>zebrafish</i> . ....	22
Figura 9. Gel demonstrativo da clivagem por T7 Endonuclease I .....	54
Figura 10. Resultado representativo de sequenciamento de DNA .....	55
Figura 11. Comparação entre controle e CRISPR-Cas9 para <i>TYR</i> . ....	56

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	11
SUMÁRIO.....	12
Capítulo 1 .....	7
1. Introdução .....	8
1.1 A Doença de Alzheimer.....	8
1.2 Diagnóstico .....	9
1.3 Formas da Doença .....	10
1.4 APP e seu processamento .....	11
1.5 Tau e sua relação com A $\beta$ .....	16
1.6 Mudança de paradigma na Doença de Alzheimer .....	18
1.7 Tratamentos e Desenvolvimento de Fármacos .....	20
1.8 <i>Zebrafish</i> .....	21
Capítulo 2 .....	24
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	25
3. Artigo Científico.....	25
Capítulo 3 .....	51
4. CRISPR-Cas9 em <i>Zebrafish</i> :.....	52
4.1 Objetivo Geral.....	52
4.2 Objetivos Específicos .....	52
4.3 Métodos utilizados e Resultados Obtidos.....	53
Capítulo 4 .....	58
5. Considerações finais .....	59
REFERÊNCIAS .....	63
ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	69
ANEXO B – Resultados Brutos de ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	70



# CAPÍTULO 1

## 1. Introdução

### 1.1 A Doença de Alzheimer

#### 1.1.2 Diagnóstico

#### 1.1.3 Formas da Doença

### 1.4 APP e seu processamento

### 1.5 Tau e sua relação com A $\beta$

### 1.6 Mudança de Paradigma

### 1.7 Tratamentos e desenvolvimento de Fármacos

### 1.8 *Zebrafish*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Doença de Alzheimer

O aumento na expectativa de vida é um fenômeno crescente em escala mundial e essa mudança no padrão de distribuição etária da população ocasiona maior prevalência de doenças associadas ao envelhecimento, sendo a demência um dos sintomas mais frequentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (em inglês, WHO) demência é a deterioração na memória, pensamento, comportamento e habilidade em realizar tarefas cotidianas (1). A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência diagnosticada em idosos, caracterizada pelo prejuízo na fala e habilidade motora, depressão, delírios, alucinações, agressividade, alteração de comportamento e personalidade, eventualmente tornando o portador incapaz de realizar tarefas cotidianas simples e necessitando de atenção especial (2–4). Mesmo com este conjunto de características, o diagnóstico da DA em seu estágio inicial é extremamente difícil e incomum(5). A primeira manifestação clínica da DA são lapsos de memória e esquecimento esparsos, surgindo geralmente a partir dos 65 anos (3).

Em 2019 foram estimados cerca de 50 milhões de casos no mundo, com um aumento esperado para 152 milhões no ano 2050 (6). Apesar de ter sido descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer, da prevalência e da severidade desta doença, não existem tratamentos preventivos ou que combatam efetivamente a patologia, em parte pela falta de entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo seu desenvolvimento e progressão (7,8). Os tratamentos existentes tem eficácia limitada e têm por objetivo reduzir os sintomas moderados e severos da DA, aumentando a qualidade de vida do paciente e, conseqüentemente, de seus cuidadores. Por fim, estima-se que 99% do desenvolvimento de drogas para DA resulte em falhas (9). Estas falhas podem estar relacionadas com o desenho experimental e os alvos farmacológicos que vem sendo explorados há três décadas, sem sucesso (9,10).

Os impactos socioeconômicos da DA são um dos motores da pesquisa e da busca por um tratamento eficiente. Estima-se um gasto mundial anual de 1 trilhão de dólares norte-americanos em cuidados de pacientes com DA (4,6). Aproximadamente 85% desses gastos são com cuidados familiares e sociais. A DA afeta indiretamente a qualidade de vida do cuidador e dos familiares que vivem com ele, causando depressão, ansiedade e problemas de sono nesses indivíduos (11,12). O World Alzheimer's Report de 2019 foi focado em compreender as atitudes sociais em relação DA e o estigma gerado por ela. O documento busca uma nova

abordagem na divulgação de campanhas de educação sobre a DA, propondo o abandono de termos que invocam a ideia de catástrofe comumente usados como “epidemia silenciosa”(6).

O número de casos, a falta de combate farmacológico eficiente e as perspectivas globais em relação ao aumento da DA fazem com que seu estudo e a compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos seja imperativo. A introdução desta Tese de Doutorado pretende apresentar o conhecimento científico acumulado na literatura sobre a DA, bem como as descobertas da última década que questionam hipóteses dadas como consolidadas, e, por fim, apresentar perspectivas para o futuro do entendimento desta doença.

## 1.2 Diagnóstico

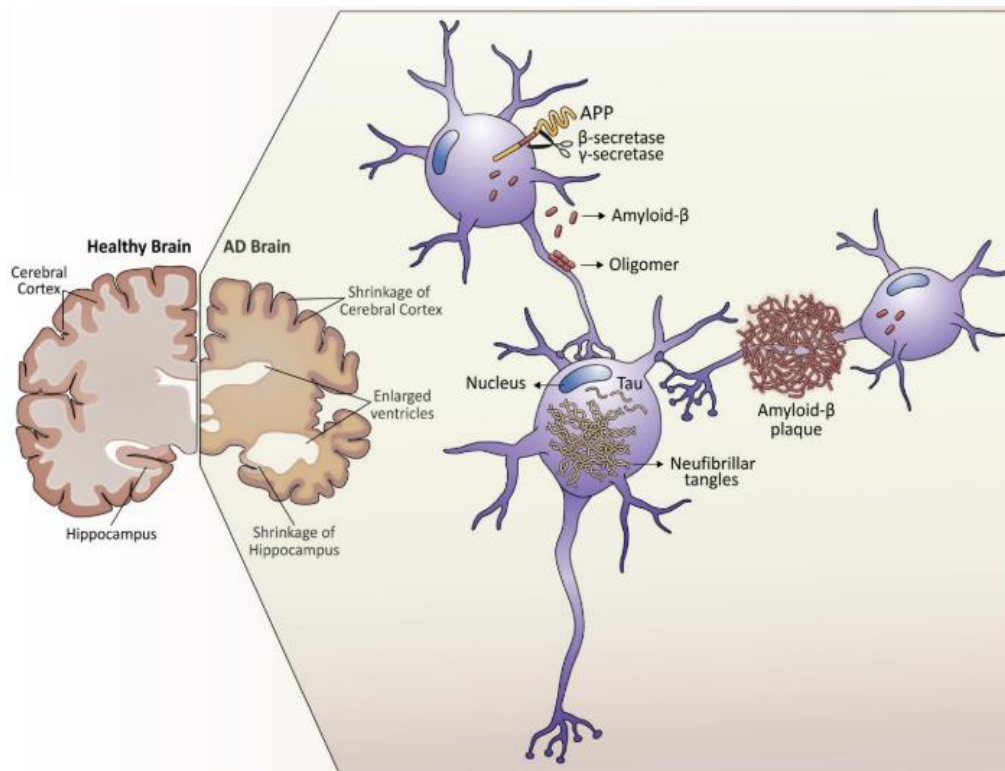
Até o presente momento, não há um teste específico não-invasivo para demência causada pela DA, portanto, médicos vem utilizando várias estratégias para se chegar a um diagnóstico clínico, dentre elas: Requisição de histórico médico e psiquiátrico familiar; Diálogo com membros da família para identificar as alterações comportamentais e cognitivas; Testes cognitivos e exames neurológicos do paciente.

O diagnóstico definitivo da DA é obtido após a autópsia e avaliação histopatológica do cérebro do paciente, onde são geralmente encontrados os emaranhados neurofibrilares de proteína Tau (do inglês *neurofibrillary tangles*, NTFs) e placas de peptídeo  $\beta$ -Amiloide (A $\beta$ ), considerados os marcadores desta doença, além da perda neuronal em várias regiões (Figura 1)(3,13). Na autópsia também se utiliza a escala de Braak para identificação da progressão de A $\beta$ , que avalia a progressão espacial dos depósitos no cérebro. O acúmulo começa na área basal do neocórtex (Estágio A de Braak), espalhando-se pelo hipocampo (Estágio B de Braak), lobos temporais até ser detectado em todas as áreas do córtex (14). O Hipocampo é a estrutura responsável por memórias baseadas em nossa experiência, já os lobos temporais processam sons e tem um papel fundamental na compreensão da linguagem (14).

No entanto, na última década, com o avanço nas técnicas de análise de imagem cerebral já é possível observar agregados de A $\beta$  e Tau e a degeneração do sistema nervoso central (SNC) em pacientes vivos através de tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, *positron emission tomography*, PET) (15). Também foram identificados biomarcadores diagnósticos no fluido cérebro espinal (FCE) e no sangue, possibilitando diagnóstico precoce e o monitoramento da progressão da DA, embora estes ainda sejam restritos em termos de abrangência da população (3,16,17). Em casos de histórico familiar e presença de sintomas antes da faixa de idade comum (aproximadamente a partir dos 65 anos) para DA, exames genéticos são requeridos. O subitem

seguinte aprofundará as diferenças conhecidas entre as formas familiares e a forma esporádica da DA e quais genes podem ser avaliados.

**Figura 1. Marcadores da Doença de Alzheimer.**



**Nota:** Conforme a DA progride, o córtex cerebral e o hipocampo acabam por ter seus volumes reduzidos devido à morte neuronal. A $\beta$  tende a oligomerizar no espaço entre os neurônios, eventualmente formando placas (*AB plaque*). Intracelularmente, a proteína Tau é hiperfosforilada, formando emaranhados neurofibrilares (*neurofibrillar tangles*). Adaptado de (18)

### 1.3 Formas da Doença

A DA é classificada em duas formas: Familiar (FAD) e Esporádica (SAD). A forma Esporádica, responsável por aproximadamente 95% dos casos, tem uma etiologia complexa e vem sendo associada com diversos fatores de risco, incluindo infecções (19), envelhecimento e estilo de vida (4). Acredita-se que o acúmulo de Tau e A $\beta$  tenha início décadas antes dos primeiros sintomas. A SAD tem seus efeitos clínicos manifestos geralmente entre os 65 e 80 anos de idade. Já a forma Familiar da Doença (FAD), também chamada de FAD de Início Precoce, tem origem genética e é responsável pela minoria dos casos (aproximadamente 5%) (5), com sintomas surgindo antes dos 60 anos e havendo relatos de manifestações clínicas a partir dos 26 anos (20). O estudo da FAD e seus componentes genéticos, iniciados no final dos anos 80, é responsável por grande parte do conhecimento sobre a DA. Estima-se que existam aproximadamente 600 famílias que são portadoras de pelo menos uma mutação relacionada

com a FAD, presentes em todos os continentes (21). Todas as mutações conhecidas relacionadas à FAD ocorrem em proteínas que clivam a Proteína Precursora de Amiloide (APP) ou na própria APP. APP é a proteína precursora de amiloide e Presenilina (PSEN) 1 e 2 são subunidades catalíticas do complexo  $\gamma$ -secretase. Este complexo enzimático é responsável pela clivagem de APP em regiões variadas na sua porção transmembrana. A Tabela 1 apresenta os genes já identificados que apresentam fenótipos relacionados à FAD, sendo que as alterações derivadas destes sempre ocasionam um desequilíbrio na razão das duas formas de A $\beta$ . É importante ressaltar que estas mutações tem caráter autossômico dominante (22) e são todas vinculadas com alteração na proporção de geração e acumulação de A $\beta$  na suas formas mais prevalentes, aquelas com 40 e 42 aminoácidos (A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, respectivamente) (3). Enquanto A $\beta$ <sub>40</sub> é considerada a forma nativa predominante, as mutações favorecem a produção de A $\beta$ <sub>42</sub>, a forma considerada mais patogênica e com maior potencial para oligomerização. Uma descrição aprofundada destas e outras proteínas relacionadas com DA será feita no item a seguir.

Tabela 1: Genes relacionado a FAD.

Gene	Proteína	Cromossomo	N° de Mutações conhecidas	Fenótipo Molecular
<i>APP</i>	Proteína Precursora de Amiloide	21q21	24	Aumento da Razão A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub> Aumento da produção de A $\beta$ Aumento de Agregação de A $\beta$
<i>PSEN1</i>	Presenilina 1	14q24	185	Aumento da Razão A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub>
<i>PSEN2</i>	Presenilina 2	1q31	14	Aumento da Razão A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub>

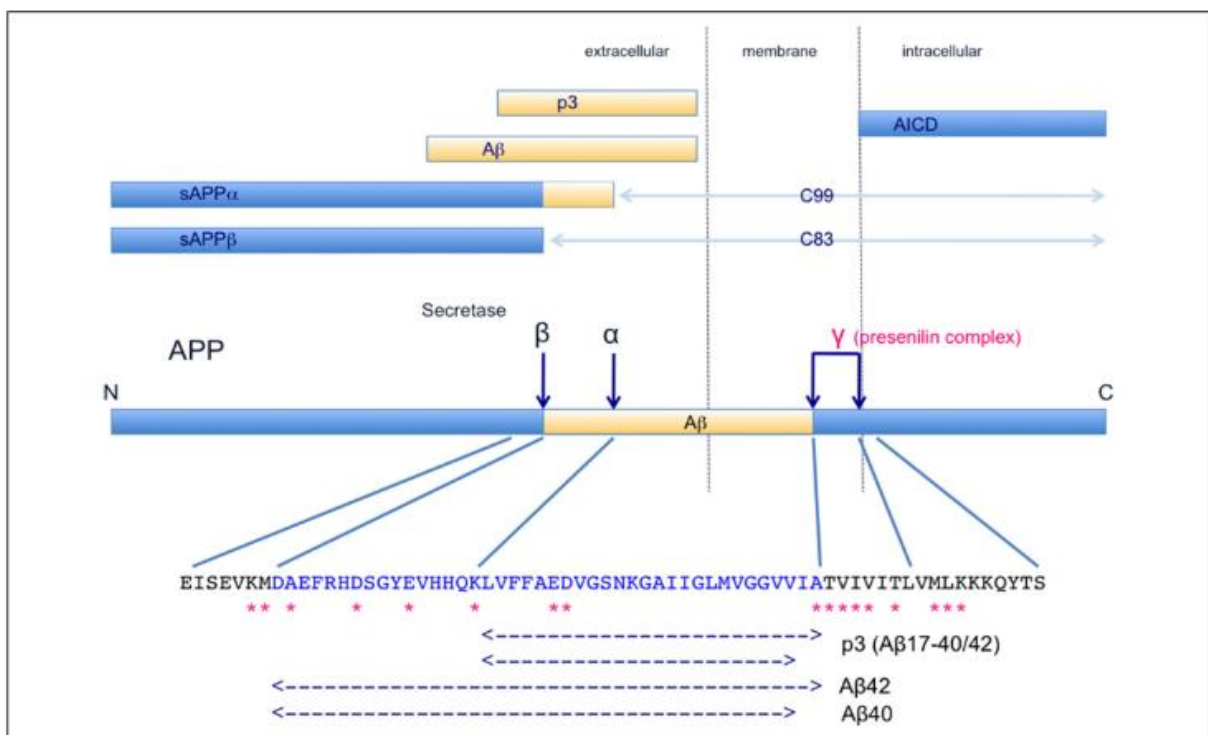
Tabela: adaptada de (23).

#### 1.4 APP e seu processamento

O *APP* humano é um gene localizado no cromossomo 21, com 18 exons. O produto da tradução do RNAm é uma proteína de aproximadamente 750 aminoácidos (aa), com uma passagem transmembrana, sendo encontrada na membrana plasmática, no complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e nas membranas mitocondriais (24). É expressa amplamente no cérebro, fígado e rins. Esta proteína é clivada em diversos sítios, gerando pequenos fragmentos com funções variadas, podendo ser pela via não-amiloidogênica ou amiloidogênica. A diferença entre estas vias consiste na primeira etapa de clivagem, que pode ser realizada por  $\alpha$ -secretase ou  $\beta$ -secretase (BACE1) (25). Um dos produtos da clivagem de

APP na via amiloidogênica é o A $\beta$ . Este peptídeo de tamanho variando de 35 a 43 aa (Figura 2) é gerado através da clivagem sequencial de APP por BACE1 e  $\gamma$ -secretase, complexo proteico que possui PSEN1 como responsável pela clivagem (26). A diferença de dois resíduos (Iso<sup>41</sup> e Ala<sup>42</sup>) entre as isoformas mais predominantes, A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub>, pode parecer insignificante, no entanto sabe-se que A $\beta$ <sub>42</sub> é capaz de formar agregados de forma muito mais rápida que A $\beta$ <sub>40</sub>, com uma capacidade de formar pentâmeros e hexâmetros, levando a protofibrilas (27,28). Além disso, A $\beta$ <sub>42</sub> tem apresenta neurotoxicidade muito maior que A $\beta$ <sub>40</sub>, e os mecanismos de agregação de das duas formas difere significativamente (29). No caso de A $\beta$ <sub>42</sub> há uma acelerada transição entre monômeros para formas oligoméricas, seguido de uma etapa mais lenta de formação de protofibrilas. Já o A $\beta$ <sub>40</sub> entra em equilíbrio entre as formas monoméricas e oligoméricas rapidamente, de forma mais lenta que A $\beta$ <sub>42</sub>, assim como o processo de conversão em protofibrilas. (29,30).

**Figura 2. Estrutura e metabolismo de APP e seus produtos.**

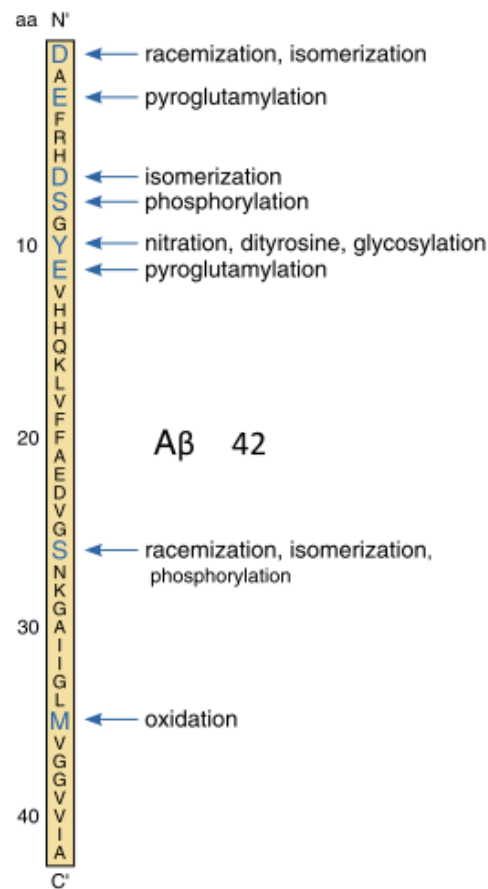


**Nota:** Via amiloidogênica de clivagem do APP. Fragmentos de A $\beta$  de diferentes tamanhos são gerados a partir da clivagem sequencial por  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase. Asteriscos na sequência de aminoácidos indicam regiões de clivagem de APP. Adaptado de (31).

Além dessa variação no tamanho do peptídeo causada pela clivagem, processos enzimáticos pós-traducionais mediados por aminopeptidases, glutamincilases, isomerases e fosforilação geram maior variabilidade ainda, chegando ao número aproximado de 20 A $\beta$  diferentes presentes em cérebros saudáveis ou com DA (Figura 3) (32).

Conhecendo a via amiloidogênica e as proteínas envolvidas ( $\beta$  e  $\gamma$ -secretase), pesquisadores cogitaram desenvolver tratamentos que inibissem essas enzimas. É interessante observar que camundongos *knockout* para BACE1 são deficientes em  $A\beta$ , porém não apresentam alterações morfológicas ou fisiológicas relevantes, nem um mecanismo compensatório identificado (26). Já o *knockout* em camundongos de componentes do complexo  $\gamma$ -secretase resulta em baixos níveis de  $A\beta$  e neurodegeneração não relacionada com DA (33).

**Figura 3. Posições de modificações pós-tradução conhecidas em  $A\beta_{42}$ .**



Nota: Posições conhecidas de modificação pós-tradução de  $A\beta$ . Adaptado de (34).

Outra peculiaridade de APP e A $\beta$  é sua relação com a Síndrome de Down (Trissomia do cromossomo 21), doença na qual se observa acúmulo de placas A $\beta$  em todos os portadores a partir dos 40 anos e sintomas da DA a partir dos 50 anos de idade em mais de 50% da população com a síndrome (35). Essa associação pode estar relacionada com um efeito dose-dependente, uma vez que o portador síndrome possui uma cópia a mais de APP.

O desenvolvimento de diversas linhagens de camundongos geneticamente modificados permitiu o entendimento da função do APP. Camundongos *knockout* para APP demonstram falhas no crescimento neurítico, na formação das comissuras cerebrais, locomoção, força muscular, no crescimento somático geral e gliose, indicando um papel importante desta proteína no desenvolvimento destes animais. (36,37). Deve-se observar que APP faz parte de uma família de proteínas com alta conservação evolutiva em vertebrados, padrão de expressão e processamento pós-traducional similar, que inclui APLP1 e APLP2, o que sugere uma possível redundância de funções (38). Experimentos realizados com camundongos *knockout* para as combinações possíveis entre estes três genes demonstraram que as proteínas APP e APLPs são relacionadas, gerando mortalidade quando APLP-2 é removida (38). Essa redundância começou a ser levada em conta nos estudos genéticos e no planejamento de estratégias para desenvolvimento de fármacos para a DA.

Recentemente Lingala et al. (39) descreveram eventos de recombinação somática de APP acontecendo naturalmente em cérebros saudáveis e com SAD, gerando milhares de mosaicos em tecido cerebral. Esses mosaicos apresentam deleção de introns, junções exon-exon precisas e, em alguns casos pequenas alterações em exons gerando mutações de polimorfismo simples (SNP). Dez dessas mutações somáticas encontradas são idênticas às descritas em FAD (39). Este fenômeno pode estar relacionado com uma necessidade intrínseca do tecido neuronal em gerar variações para este peptídeo (39).

Diversos eventos celulares já foram relacionados com acúmulo de A $\beta$  extracelular e podem comprometer a homeostase e levar à morte celular, incluindo alterações nos níveis citosólicos de cálcio (40), aumento do estresse oxidativo (41), inibição do transporte de vesículas nos axônios (42), inibição do proteassomo (43), entre outras ações neurotóxicas (44). Além disso, sabe-se que A $\beta$  também acumula-se dentro das células, embora seu papel fisiológico e patológico na DA ainda seja obscuro (45).

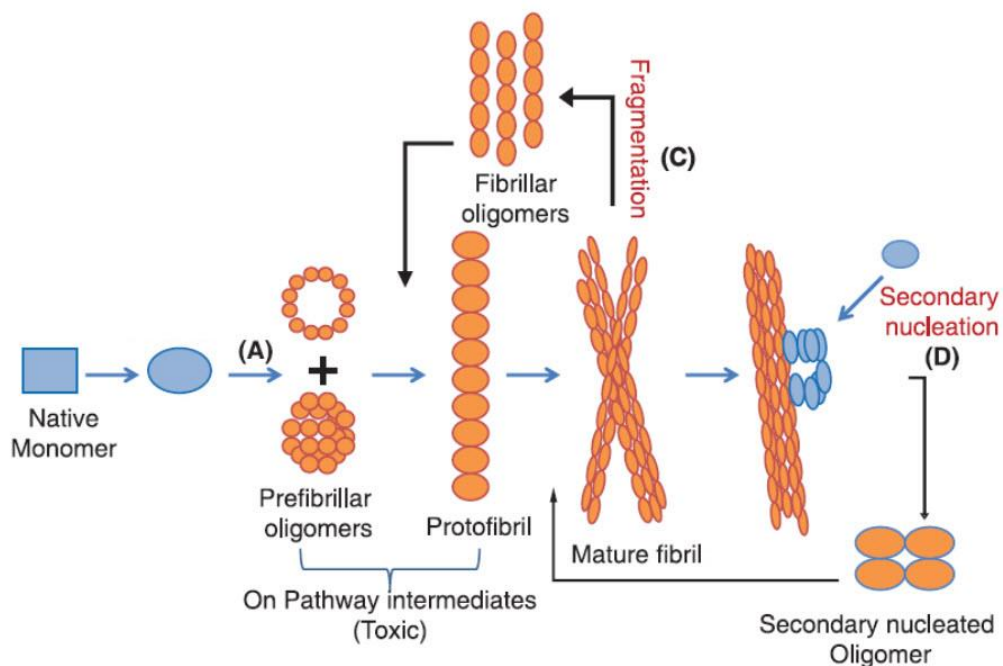
Outra proteína relacionada com AD, a Apolipoproteína E (APOE), possui quatro alelos conhecidos, sendo  $\epsilon 4$  um fator de risco para a DA (46). Essa proteína é responsável pela ligação, transporte, catabolismo de partículas lipoproteicas, mediação da imunidade inata e pode ter um papel na deposição, toxicidade, agregação, degradação e remoção (*clearance*) de



A $\beta$  do cérebro, por mecanismos ainda não completamente compreendidos (46). Recentemente uma mutação em APOE3, chamada de *christchurch*, foi detectada em uma paciente com FAD (mutação em PSEN1) que apresentou sintomas de DA a partir dos 70 anos, diferentemente de sua família que os desenvolve aos 40 anos (47). Esta mutação em APOE pode vir a ser estudada em animais modelo e planejamento de estratégias de modificação genética para proteção dos efeitos da DA.

Em relação à agregação de A $\beta$ , fenômeno que leva os monômeros de A $\beta$  a se agregarem em estruturas quaternárias variadas, estudos *in vitro* demonstraram que o processo de agregação passa por duas etapas (48,49). A primeira interação entre os monômeros de A $\beta$  cria estruturas inespecíficas em baixas concentrações (90 nM) (50), que servem como base para a formação de oligômeros maiores, em um processo chamado de nucleação. Os oligômeros por sua vez dão origem a fibrilas, chegando eventualmente em um equilíbrio dinâmico (51). A Figura 4 ilustra este processo.

**Figura 4. Estruturas quaternárias de A $\beta$**



**Nota:** Os monômeros nativos de A $\beta$  se agregam em pequenas estruturas oligoméricas (A), que por sua vez podem se organizar em protofibrilas e fibrilas maduras, fragmentando-se (C) ou servindo como centros de nucleação para novos oligômeros (D). Adaptado de (52).

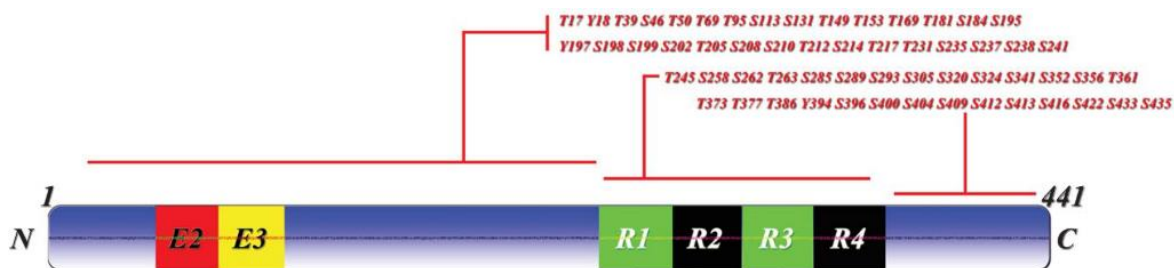
Atualmente propõe-se que os oligômeros são mais patogênicos que as fibrilas insolúveis. As placas amiloide são consideradas aglomerados extracelulares semi-inertes que englobam não só A $\beta$  mas também outras proteínas, lipídeos e metais livres (32). Além disso, A $\beta$  também

se acumula de forma intracelular, através de mecanismos menos compreendidos (53). Os agregados de A $\beta$  são, de fato, componentes fundamentais da DA, embora sua relação de causa com a doença ainda seja motivo de discussão científica, exigindo grupos multidisciplinares para a compreensão de seus aspectos, como será discutido no item 1.6 deste capítulo.

### 1.5 Tau e sua relação com A $\beta$

A proteína Tau humana, codificada pelo gene *MAPT*, possui 16 exons no cromossomo 17 e 6 isoformas conhecidas geradas por *splicing* alternativo dos exons 2, 3 e 10. Essas isoformas são reconhecidas por seu número de domínios repetidos, que podem conter três ou quatro repetições imperfeitas de 18 aa conectadas por 14 aa espaçadores, localizadas na porção C-terminal (54). Essa proteína, membro da categoria de proteínas que se associam a microtúbulos, confere estabilidade ao citoesqueleto de microtúbulos. Além disso, Tau possui inúmeros sítios de modificação pós-traducionais que alteram a intensidade de sua interação com microtúbulos. As modificações mais comuns são as fosforilações e os sítios conhecidos são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Sítios de fosforilação de Tau

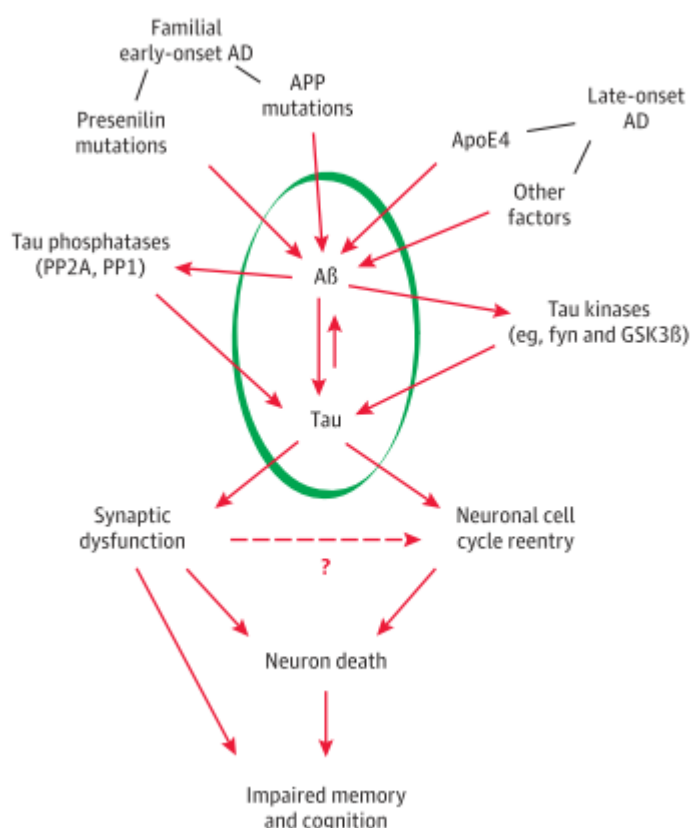


Nota: Regiões conhecidas de sítios de fosforilação de Tau são indicadas em vermelho. As regiões variáveis de ligação a microtúbulo R1/R2/R3/R4 são representadas integralmente, embora isoformas apresentem número variado. Adaptado de (55).

Quando hiperfosforilada, esta proteína se desassocia dos microtúbulos e acumula em conformações patogênicas no citoplasma e nas espinhas dendríticas em agregados denominados emaranhados neurofibrilares (NTF) que comprometem significativamente a neurotransmissão e a estabilidade sináptica, também levando à morte celular (56–58). A severidade do déficit cognitivo na DA correlaciona-se significativamente com o aumento da carga de NTF que placas A $\beta$  (59). Esse dado levou pesquisadores a proporem hipóteses nas quais a Tau é iniciadora do processo patológico (3). Evidências recentes apresentam influências recíprocas entre Tau e A $\beta$ ,

em um cenário no qual A $\beta$  teria um papel primário e anterior à Tau, gerando assim um *loop* patológico (Figura 6) (60). Este *loop* está relacionado com o acúmulo de A $\beta$  por fatores genéticos e ambientais, que iniciaria eventos de desmonte de microtúbulos dependentes de Tau, inibição de transporte de mitocôndrias por microtúbulos, e neurônios reentrando no ciclo celular, o que acarreta a uma morte massiva (61).

**Figura 6. Interação de A $\beta$  e Tau dirigindo a progressão da DA.**



**Nota:** Relações propostas entre genética, meio ambiente e fatores de risco causando interações patológicas entre A $\beta$  e Tau, levando a disfunção sináptica, morte neuronal e falhas na memória e cognição. Adaptado de (60).

O primeiro artigo a demonstrar a conexão de Tau com A $\beta$  utilizava camundongos transgênicos (62). Estes animais expressavam uma versão de Tau humana que apresenta uma substituição de uma prolina por uma lisina na posição 301 da proteína. Esta mutação está relacionada com Demência Frontotemporal e Parkinson. A injeção de A $\beta$  no cérebro desses animais causou um aumento de até 5x nos NFTs em regiões próximas do sítio de injeção (62). Nery et al. demonstraram fenômeno similar injetando A $\beta$  em embriões de *zebrafish*, resultando em aumento de Tau fosforilada na Serina 202 e Treonina 205, sítios que são modificados pela enzima Glicogênio Sintase Quinase 3 $\beta$  (63). Esta enzima é uma das principais proteínas quinases envolvidas na hiperfosforilação de Tau, que vem sendo estudada como possível alvo

terapêutico. Porém, mecanismos moleculares de interação entre A $\beta$  e Tau representam uma lacuna no estudo da DA. Pesquisadores reportaram recentemente que oligômeros A $\beta$  na faixa de concentração nanomolar sequestram a sinalização ativada por norepinefrina através do receptor adrenérgico  $\alpha$ 2A, ativando GSK3 $\beta$ , o que resulta em hiperfosforilação de Tau (59). Estes dados podem contribuir para a elucidação da interação entre os dois marcadores da doença.

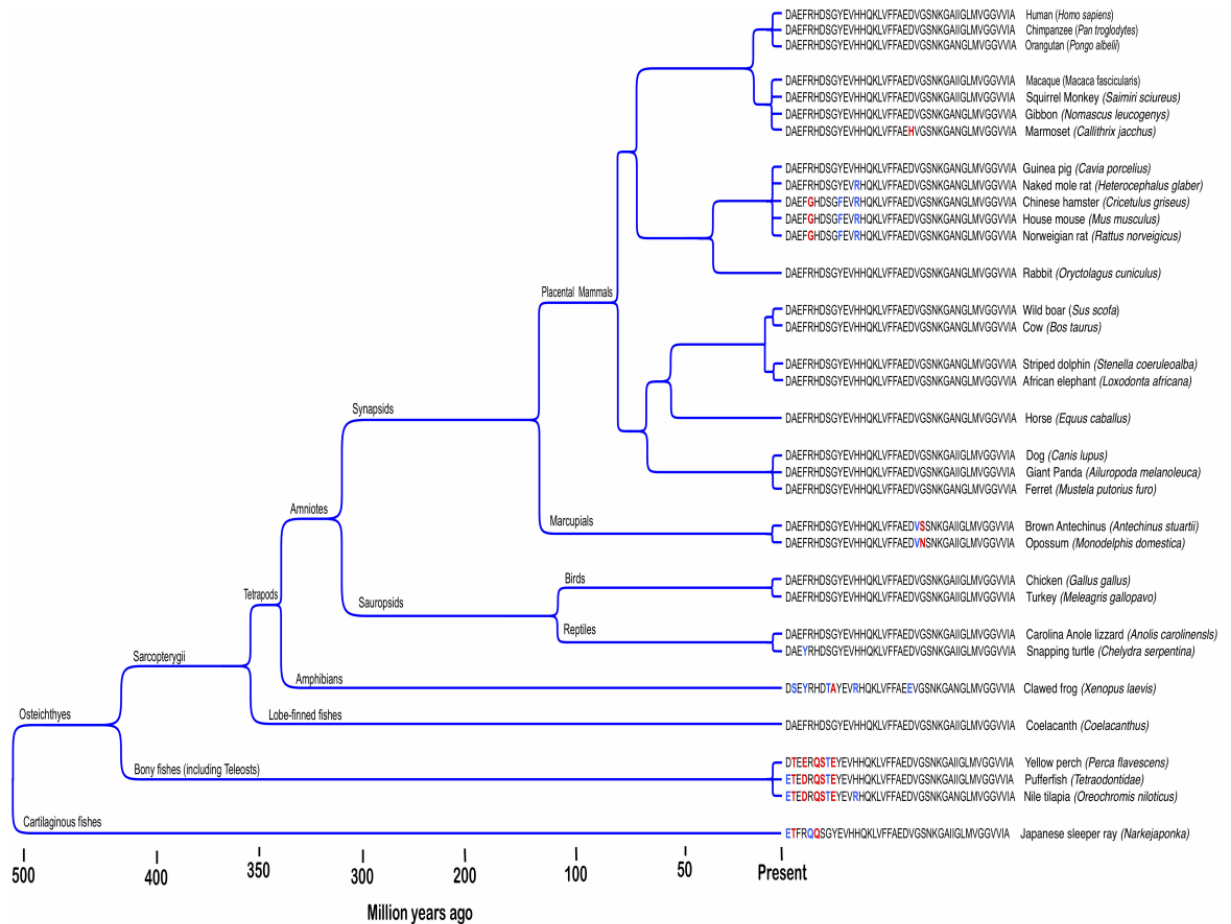
## 1.6 Mudança de paradigma na Doença de Alzheimer

Existem atualmente várias teorias que tentam explicar a origem da DA, embora nos últimos anos uma enorme quantidade de evidências aponte para uma mudança de paradigma no estudo da doença. A mais antiga e prevalente é a teoria chamada de “Teoria da Cascata Amilóide” (TCA), tendo influenciado os rumos da pesquisa científica nas últimas três décadas (revisado extensivamente por 58). Esta hipótese originalmente propunha que a placa A $\beta$  era a causadora inicial de todos os eventos patológicos da DA, incluindo a formação de NFTs e neurodegeneração do Sistema Nervoso Central (SNC)(64). Presumia-se que a geração de A $\beta$  era exclusivamente resultado de atividade proteolítica associada à patologia e sem função fisiológica, uma vez que clivagens intramembrana eram consideradas anômalas (46). Graças a evidências acumuladas nos últimos anos, atualizações no modelo foram realizadas, propondo o protagonismo dos eventos patológicos à forma oligomérica solúvel de A $\beta$  (32,65). Os estudos das formas familiares da DA auxiliaram no desenvolvimento da teoria, com abordagens genéticas e geração de modelos animais. Para a TCA, um desequilíbrio entre produção e remoção de A $\beta$  leva à DA, porém não é capaz de explicar a função fisiológica de A $\beta$ .

No entanto, um peptídeo supostamente sem função e intrinsecamente patogênico como postulado inicialmente para A $\beta$ , teria desaparecido rapidamente da população. O argumento utilizado para justificar evolutivamente a existência do A $\beta$  é conhecido por “Baixa pressão seletiva na senescência”. Esta hipótese afirma que o A $\beta$  não foi eliminado ou modificado no genoma humano por que a DA se manifesta principalmente indivíduos idosos que já passaram de seu período reprodutivo, o que resultaria na ausência de pressão seletiva (66). No entanto, uma série de evidências demonstram que A $\beta$  é um neuropeptídeo constitutivo e conservado em vertebrados (Figura 7), com mais de 95% de conservação entre membros do grupo dos mamíferos (67). Existe também a “Hipótese da Avó”, na qual o *fitness* evolutivo humano é aumentado graças ao auxílio nos cuidados da prole pelos indivíduos em período pós-

reprodutivo (66). Estas evidências indicam, portanto, que a persistência do Aβ no genoma humano e de outros vertebrados se deve a uma forte pressão seletiva positiva (66).

**Figura 7. Aβ é um neuropeptídeo antigo e conservado em vertebrados.**



Nota: Relações filogenéticas de Aβ entre os vertebrados. Letras em azul representam conservação entre grupos não-humanos. Vermelho representa não-conservação. Adaptado de (66).

Outra hipótese para a conservação e agregação de Aβ, surgida nos anos 90 e até recentemente sem receber muita atenção, é de que a origem da DA seriam infecções por patógenos microbianos. Esses patógenos podem invadir o SNC através da barreira hematoencefalica (do inglês blood-brain barrier, BBB), Barreira cérebro-CSF, nervo trigêmeo, trato intestinal ou ainda liberar toxinas que iniciariam a doença. Em 2010, Soscia *et al.* demonstraram que peptídeos Aβ<sub>40</sub> e Aβ<sub>42</sub> inibem o crescimento de bactérias e fungos *in vitro* (68). Os autores propõem uma função fisiológica de proteção para o peptídeo. Outros grupos também demonstraram atividade antiviral contra vírus influenza A, Herpes simplex vírus 1 (HSV-1) (69), com sobrevida maior em camundongos 5xFAD em relação ao controle quando expostos a patógenos intestinais, e sobrevida menor em camundongos APP *knockout* (70). Estes

resultados *in vitro* e *in vivo* dão suporte para uma função de A $\beta$  no sistema imune inato do cérebro, onde teria a função antimicrobiana em seu sítio ligador de heparina, aprisionando patógenos (69,71).

Esses estudos começam a alterar o paradigma estabelecido, permitindo novas abordagens para o entendimento e o planejamento de estratégias terapêuticas (72). A aceitação praticamente dogmática da TCA gerou uma busca por resultados que a corroborassem e, assim, muitos dados foram deixados de lado (73). É necessário aceitar as evidências para que o estudo de A $\beta$ , Tau e da DA possa explorar outras perspectivas, visto que as projeções indicam um aumento de casos no futuro e os medicamentos atuais não são capazes de conter efetivamente os danos causados por essa doença. A seguir exploramos as tentativas de desenvolvimento de tratamentos, tanto em fase de testes quanto disponíveis.

### 1.7 Tratamentos e Desenvolvimento de Fármacos

No início de 2020 o site americano ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov/>) possuía em seu banco de dados 2251 testes clínicos para a DA. Deste número, 1574 foram encerrados, cancelados ou não informaram o desfecho. Existem ainda 677 testes em andamento. Mais de 200 desses testes tinham A $\beta$  como alvo e nenhum deles resultou em uma melhora dos sintomas dos pacientes, havendo relatos de efeitos negativos, como psicose aguda e piora de memória e cognição (72). Os resultados negativos obtidos até hoje podem refletir uma falha na abordagem do estudo da DA, uma vez que se utiliza a TCA como modelo e evidências vem se acumulando há mais de uma década mostrando os efeitos positivos do APP e A $\beta$  no metabolismo de vertebrados. Diversos grupos tem proposto novas formas de planejamento de fármacos e estratégias para tratamentos, como por exemplo uso de antivirais e controle dos eventos que levam à deposição de A $\beta$  (72).

Existem alguns medicamentos disponíveis que funcionam como redutores dos sintomas da DA, porém não são capazes de conter ou parar sua progressão efetivamente. Donepezila, Rivastigmina e Galantamina, que são inibidores de acetilcolinesterase e exemplos de drogas atenuantes dos sintomas da DA, uma vez que elas aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica e este neurotransmissor está relacionado com memória (74). Além do mais, sabe-se que a deposição de A $\beta$  tem efeitos negativos em sinapses colinérgicas causados pela redução da transcrição de colina-acetiltransferase (enzima responsável pela síntese de acetilcolina) e interação entre A $\beta$  e colinesterase, promovendo formação de agregados (75). Outro fármaco que vem sendo utilizado para tratamento dos sintomas da DA é a Memantina. Esta molécula é um antagonista de receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) de baixa à moderada

afinidade (76). Estudos clínicos demonstram que ela tem efeitos mais pronunciados em pacientes com DA moderada à severa. Além disso, fármacos como antipsicóticos, ansiolíticos e antidepressivos são comumente receitados para controle de comportamento e humor.

O estudo da DA, seus mecanismos e interações em humanos é complexo, dado o longo tempo de início de deposição de A $\beta$  e Tau até a fase prodromal. O uso de modelos animais é um grande aliado na pesquisa de doenças, tanto para compreensão de função de genes e proteínas quanto pra teste de possíveis candidatos a fármacos.

### 1.8 *Zebrafish*

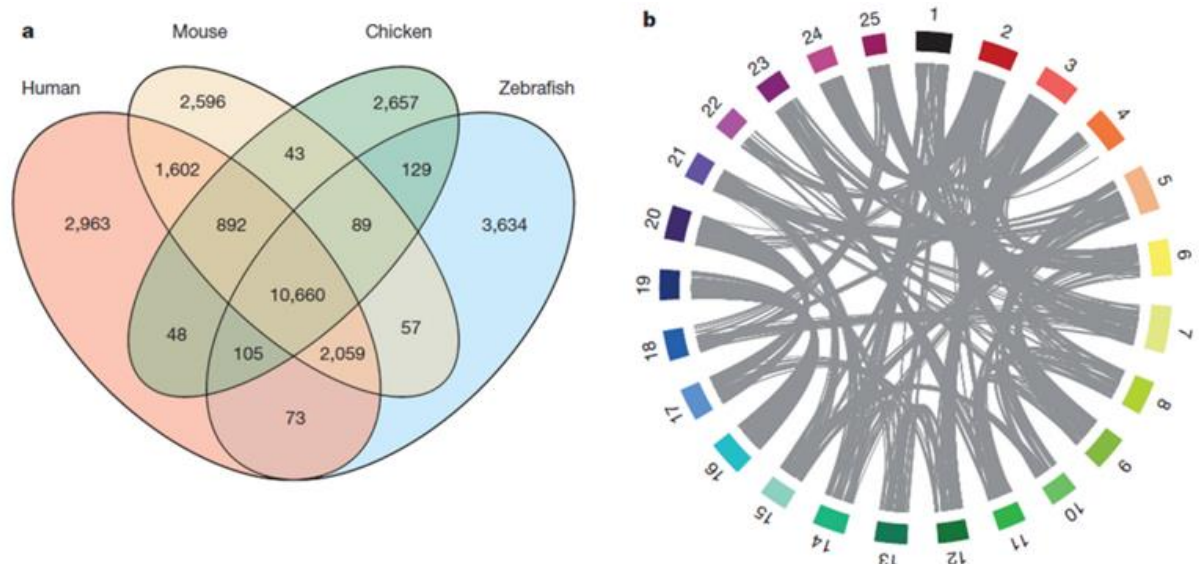
O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe teleosteo de água doce, pequeno e nativo da Índia, apreciado por aquaríofilos. Inicialmente foi utilizado como organismo modelo em estudos de desenvolvimento de vertebrados, porém, na última década o interesse neste pequeno animal aumentou significativamente e seu uso como modelo passou a ser empregado em diversos estudos de doenças humanas (77).

Proposto primeiramente como animal modelo para estudos de genética do desenvolvimento por George Streissinger, o *zebrafish* tem sido utilizado para pesquisas em biologia do desenvolvimento por muitos anos, e é um dos principais modelos para estudos em genética, neurofisiologia e biomedicina (78). Embora não apresente, em uma análise superficial, comportamentos cognitivos complexos e evidentes como os roedores, o *zebrafish* apresenta características que o torna extremamente atraente para os pesquisadores, como, por exemplo, embriões transparentes, desenvolvimento externo rápido e alta capacidade reprodutiva (58). Além disso, é um vertebrado, evolutivamente mais próximo de humanos que modelos invertebrados estabelecidos, como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, apresentando maior similaridade de estruturas morfológicas e fisiologia (58).

A fertilização e o desenvolvimento exclusivamente externos de ovos relativamente grandes (cerca de 0,7 milímetros de diâmetro) e transparentes tornam a observação e a manipulação mais fácil do que nos demais modelos vertebrados. Seu desenvolvimento embrionário completa-se em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando o ovo eclode dando origem a uma larva (78), o que facilita o acompanhamento dos processos em tempo real, além da administração de fármacos e manipulações genéticas. Inúmeros trabalhos demonstram com sucesso a aplicação de técnicas de biologia molecular para estudos genéticos, como sondas morfolino anti-senso, RNAm, transgenes e sistemas de engenharia de genomas.

O genoma do *zebrafish* está anotado e é periodicamente atualizado, possuindo 25 pares de cromossomos (79). Sua linhagem evolutiva (Teleósteos) separou-se dos Tetrapodas há aproximadamente 450 milhões de anos (80). Os teleósteos sofreram um processo de duplicação genômica completa, seguido da perda de muitos desses genes (79,81). Porém, observa-se que na maior parte dos casos, genes de *zebrafish* podem ser identificados como ortólogos de genes humanos. As sequências de genes de *zebrafish* apresentam aproximadamente 70% de homologia com genes humanos e 84% de genes associados com doenças humanas estão presentes neste animal (82) Além disso, o *zebrafish* possui os principais genes relacionados com a DA como APP, PSEN1, PSEN2, MAPT, Gsk3B, ApoE. A. A Figura 8a apresenta um diagrama de Venn com os genes humanos e seus ortólogos em *zebrafish*, camundongo e galinha. Na Figura 8b observa-se as relações de ohnologia (genes duplicados através de um evento de duplicação gênica) entre os cromossomos do *zebrafish*. Estes genes duplicados podem ter assumido uma nova função, se transformado em pseudogenes, ou ainda assumindo padrões de expressão em diferentes tecidos, sendo necessária sua compreensão para o correto estudo genético de alvos selecionados.

**Figura 8. Aspectos evolucionários do genoma de *zebrafish*.**



**Nota:** a) Genes ortólogos compartilhados entre genomas de humanos, zebrafish, camundongo e galinha. Genes duplicados em uma espécie, porém em outra existe apenas uma cópia são contados apenas uma vez nas interseções. b) Relações de ohnologia entre os cromossomos *zebrafish*. Ohnologia é o nome dado a genes duplicados em um evento de duplicação genômica. As linhas cinzas relacionam genes e suas cópias entre cromossomos (79).

Embora seja um animal relativamente simples, o *zebrafish* faz parte do grupo dos cordados, tendo um encéfalo e espinha dorsal e algumas estruturas podem ser relacionadas em



relação a sua função com o encéfalo humano, como o pallium medial, dorsal lateral, correspondendo a amígdala, isocórtex e hipocampo em vertebrados superiores (83). É tema de discussão a ausência de um telencéfalo expandido, córtex pré-frontal e sua relação com comportamentos complexos como tomada de decisão, algo que tem sido observado em pequenos animais (84). Neste contexto, o *zebrafish* vem sendo usado com sucesso como um animal modelo para estudos moleculares, genéticos e farmacológicos da DA (83,85).

Graças a vantagens como a possibilidade de estudos genéticos em grande escala enquanto mantém a complexidade típica de um vertebrado, somadas à fácil manipulação e manutenção quando comparado aos modelos de vertebrados tradicionais, o *zebrafish* estabeleceu-se como vantajoso modelo animal. Neste trabalho, duas abordagens foram utilizadas usando este pequeno peixe como modelo experimental. O Capítulo 2 apresenta, em formato de artigo, os resultados de comportamento e proteômica de injeção intracerebroventricular de A $\beta$ <sub>42</sub> em diferentes conformações quaternárias. O Capítulo 3 apresenta os resultados parciais obtidos na utilização de CRISPR-Cas9 para a produção de *zebrafish knockout* para genes relacionados com a DA.

# CAPÍTULO 2

Injeção intracerebroventricular de peptídeo humano A $\beta$ <sub>42</sub> em diferentes conformações oligoméricas em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos jovens e idosos: efeitos cognitivos e proteômicos

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

### 2.2 Objetivos Específicos

## 3. Artigo Científico

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos comportamentais e proteômicos da injeção intracerebroventricular de soluções de A $\beta$ <sub>42</sub> humano em diferentes conformações oligoméricas em *zebrafish* adultos jovens e velhos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o protocolo de injeção de A $\beta$ <sub>42</sub> humano em conformações oligoméricas diferentes (monomérica, oligomérica e proto-fibrilar) no espaço cerebroventricular de *zebrafish* adultos jovens (6 meses) e velhos (>36 meses);
- Avaliar mortalidade e possíveis alterações comportamentais e morfológicas durante o período após a injeção;
- Avaliar o impacto da injeção CV na capacidade locomotora e ansiedade em animais jovens adultos e velhos e seus respectivos controles;
- Avaliar o impacto da injeção CV na capacidade cognitiva nas tarefas de Y-Maze e Esquiva Inibitória de animais jovens adultos e velhos e seus respectivos controles;
- Analisar de forma comparativa o conteúdo proteico das amostras de encéfalo dos diferentes grupos usando Espectrometria de Massa.

## 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos para os experimentos propostos neste capítulo foram compilados e são apresentados em formato de artigo. Uma vez que os resultados completos de proteômica estiverem disponíveis e as recomendações e sugestões da banca avaliadora executadas, o artigo será submetido para o periódico científico que melhor se adequar ao escopo da pesquisa.

1 *Cerebroventricular A $\beta$ <sub>42</sub> in specific oligomeric conformations*  
2 *impacts cognition and brain proteomics of young adults and old*  
3 *zebrafish*

4

5

6 **Abstract**

7

8 Alzheimer Disease (AD) is the most common form of dementia and affects around  
9 50 million people worldwide. A $\beta$  peptide is toxic, causes damage to brain cells when  
10 overproduced and/or inefficiently cleared and aggregates in senile plaques one of the  
11 hallmarks of AD. While A $\beta$  physiological roles are being elucidated, the differential  
12 impact of soluble and insoluble forms on brain function remains less clear. Studies on AD  
13 mechanisms often use animal models to investigate the effect of A $\beta$ <sub>42</sub> (being the most  
14 aggregation-prone peptide) administration *in vivo*, but very few looked at the effects of  
15 different states of A $\beta$ <sub>42</sub> oligomeric conformation. We evaluated the effects of  
16 cerebroventricular injection of monomeric (A $\beta$ <sub>42</sub>M), oligomeric (A $\beta$ <sub>42</sub>O) and protofibril-  
17 enriched (A $\beta$ <sub>42</sub>P) human A $\beta$ <sub>42</sub> solutions on behavioral parameters and proteomics of  
18 young adults (YA, 6 months age) and old adults (OA, 36 months age) zebrafish. After  
19 injection, animals locomotory behavior was analyzed after 7 days post injection (dpi) and  
20 cognitive experiments as Y-Maze and Inhibitory avoidance were performed 14 and 21  
21 dpi respectively. We found that, different from YA, OA fish present locomotory  
22 impairment at 7 days. After 21 dpi, both YA and OA fish injected with A $\beta$ <sub>42</sub>O and A $\beta$ <sub>42</sub>P  
23 presented memory impairment as they were unable to learn on the Inhibitory avoidance  
24 (shock stimulus) when compared to control and A $\beta$ <sub>42</sub>M. Proteomic analyses the  
25 experimental groups vs vehicle presented a diverse array of proteins up or down  
26 regulated. Those proteins were mostly related to neurotransmission, mitochondrial  
27 metabolism, immune response.

28

29 **Keywords:** A $\beta$ <sub>42</sub>, oligomers, zebrafish, cerebroventricular injection, aggregation, proteomics, cognition

---

30

## 31 **Introduction**

32 Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, considered the  
33 greatest global challenge for health and social care in the 21st century, affecting an  
34 estimate of 50 million people worldwide (1,2). It is a disease most prevalent in elderly  
35 people, and as the life expectancy grows, so do the number of cases (1). Even as an  
36 emergent major health issue, there is no effective treatment, with almost all phase III drug  
37 clinical trials failing to ameliorate the symptoms or even worsening patients conditions  
38 (3,4). The hallmarks of AD are the intracellular neurofibrillary tangles (NTFs) and the  
39 extracellular amyloid senile plaques, composed mainly by Tau protein and  $\beta$ -amyloid  
40 ( $A\beta$ ) peptide, respectively, along with neuronal loss in various brain regions that leads to  
41 progressive learning impairment and cognitive deficits (5). The  $A\beta$  peptide is produced  
42 by sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$  and  $\gamma$  secretases and  
43 may vary in number of peptides from 39 to 43 aminoacids (aa) (6), being 40 aa ( $A\beta_{40}$ ) the  
44 most abundant in plaques of AD patients and the 42 aa ( $A\beta_{42}$ ) the less soluble and more  
45 aggregation prone (7). The prevalent theory used to explain AD, known as the Amyloid  
46 Cascade Hypothesis (ACH), postulates that  $A\beta$  is an aberrant peptide that initiates the  
47 pathological events when it accumulates in the brain. Originally it was believed that the  
48 insoluble plaques were responsible for the damage, but more recent studies changed that  
49 perspective as the  $A\beta$  burden does not correlate directly with AD (5,8,9). Independent  
50 evidences gathered in recent years show that soluble oligomers, intermediary to  
51 monomers and insoluble plaques, are the most active cause of neurotoxicity and synaptic  
52 dysfunction in AD (3,9–12). ACH was adapted to propose that the soluble oligomers are  
53 the most pathological forms (9,13). The term 'soluble' refers to any form of  $A\beta$  that is  
54 soluble in aqueous buffer and remains in solution after high-speed centrifugation,  
55 indicating that it is not insoluble fibrillar  $A\beta$  (9). The ACH is being revisited to propose  
56  $A\beta$  as a constitutive peptide in human physiology, possessing direct or indirect roles in  
57 supporting the innate immune system (14), as an antimicrobial (15), sealing leaks in the  
58 blood-brain barrier (16), recovering from brain injury (17), regulating synaptic activity  
59 (18) and having anticancer properties (19). All these evidences point towards a new  
60 paradigm, posing a different perspective on  $A\beta$  as an integral part of human physiology  
61 and not just as a nocive byproduct.

62 The understanding of AD progression and its cellular and molecular mechanisms  
63 depends on animal models to emulate the disease conditions. Transgenic and knockout  
64 mice have brought many insights to  $A\beta$  metabolism and genetics (20–22), as well as long

65 term observations of the effects of A $\beta$ <sub>42</sub> on marmoset monkeys, in which A $\beta$  plaques were  
66 found years after the injection (23). Zebrafish also has been used to study AD by the  
67 generation of mutants (24), morpholinos (25), cerebroventricular (CV) injection (26) or  
68 a combination of these approaches (27,28). This small freshwater fish has consolidated  
69 its place as animal model in the last decade, emerging as a competitive and insightful tool  
70 for a wide range of studies due to its fast and transparent initial development and genetic  
71 resemblance to humans, sharing 84% of genes related to human diseases (29).

72 CV injection has been used in larval and adult zebrafish as a method of deploying  
73 molecules to the brain (26,30). Our group has previously demonstrated cognitive  
74 impairment and increased tau phosphorylation in 7 day old zebrafish larvae when A $\beta$ <sub>42</sub> is  
75 injected on the hindbrain ventricle on 24h post fertilization embryos (30). Cognitive  
76 impairment of adult zebrafish as a result of A $\beta$ <sub>42</sub> CV injection was observed in other  
77 studies (27,31). However, effects of the different oligomeric states of A $\beta$ <sub>42</sub> were not tested  
78 on those previous studies, which is now critical considering the updated perspective on  
79 A $\beta$  and the need to characterize these conformations' effects. Recent data led us to  
80 interrogate if the A $\beta$ <sub>42</sub> in different soluble oligomeric states would cause different  
81 outcomes in terms of behavioral and cognitive effects and on the brain proteome, which  
82 could shed light into how these differences relate to the AD pathology.

83 Here we describe the effects of CV injection of human A $\beta$ <sub>42</sub> on different  
84 conformation-forming solutions in young and old adult (YA and OA, respectively)  
85 zebrafish. We show that oligomeric and protofibril enriched solutions cause memory  
86 impairment in both YA and OA animals. LCMS Mass spectrometer analysis of brain  
87 samples of A $\beta$  CV injected animals was compared to their respective age-matched control  
88 and proteins with a significant 1.5-fold variation were classified according to their  
89 biological role in the following categories: neurotransmission, metabolism, immune  
90 system and mitochondrial function. This approach serves as a complementary model to  
91 further dissect the effects of different A $\beta$ <sub>42</sub> conformation and the physiological and  
92 behavioral changes it causes.

93

## 94 **Materials & Methods**

95

## 96 **Ethics Statement**

97 All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-  
98 PUCRS, permit number 15/00485), followed the Brazilian legislation (no.11.794/08) and

99 were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the use  
100 of fish in research (32).

### 101 **Animals and Maintenance**

102 YA (6 months, 0.2–0.4 g) and OA (+36 months, 1.5–2.0 g) wild-type AB zebrafish  
103 (*Danio rerio*) were maintained in an automated recirculating system (Zebtec, Tecniplast,  
104 Italy) at a density of 1.5 fish per liter with reverse osmosis-filtered water equilibrated to  
105 reach the species standard temperature ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pH (7.5), ammonia, nitrite, nitrate  
106 and chlorine levels. Animals were subjected to a light/dark cycle of 14/10 h and fed  
107 commercial flakes (TetraMin Tropical Flake Fish®) three times a day supplemented with  
108 live brine shrimp (*Artemia salina*) (33). Male and female individuals were used  
109 irrespective of their gender. Fish from each experimental group were randomly chosen  
110 for behavioral tests and transferred from the growing tanks to glass tanks (13 x 15 x 10  
111 cm) in which they were kept during behavioral analyses. Glass tank maintenance included  
112 a 2/3 water change three times a week after removal of the excess of food or fish waste  
113 from the bottom using a siphon. To obtain brain samples, zebrafish were euthanized by  
114 hypothermal shock and the brains were rapidly removed by dissection, stored on PBS 1X  
115 at  $-20^{\circ}\text{C}$  (34).

116

### 117 **Experimental design**

118 The experimental approaches were designed to answer our scientific questions avoiding  
119 interference from each behavioral manipulation on following tests outcomes and to  
120 maximize the use of animals (Fig. 1). YA and OA individuals were assigned to groups  
121 according to the solutions to be CV injected, as follows: Control groups received the  $\text{A}\beta_{42}$   
122 solution vehicle (Veh), which was 0.25% dymethylsufoxide (DMSO) in water, while  $\text{A}\beta_{42}$   
123 10 $\mu\text{M}$  solutions were freshly prepared to be mostly enriched in Monomers ( $\text{A}\beta_{42}\text{M}$ ),  
124 Oligomers ( $\text{A}\beta_{42}\text{O}$ ) and Protofibrills ( $\text{A}\beta_{42}\text{P}$ ). To each experimental group, 20 YA and 20  
125 OA fish were CV injected. All injections were performed on the same day. Animals were  
126 routinely inspected for abnormal behavior. After 7 days post injection (dpi), the Novel  
127 tank test was performed. Animals were then returned to their glass tanks until 14 dpi,  
128 when the Y-maze test was performed. Finally, at 21 dpi, animals were tested for long-  
129 term aversive memory on the inhibitory avoidance task. At the end of the behavioral  
130 procedures, all animals were euthanized and brains were stored for later proteomic  
131 analysis.

132

133

#### 134 **A $\beta$ <sub>42</sub> preparation**

135 The A $\beta$ <sub>42</sub> peptide (Sigma Aldrich) was prepared following manufacturer  
136 instructions in DMSO to a final concentration of 1mM and diluted with water to 10 $\mu$ M  
137 (0.25% DMSO in MilliQ H<sub>2</sub>O) according to Cunvong et al. (35). To prevent A $\beta$ <sub>42</sub>  
138 aggregation into the protofibrillary form, the solution was maintained at a maximum  
139 temperature of 28°C and the pH was adjusted to 7.0. To prepare a solution composed  
140 mainly by oligomers, we incubated the previous solution for 5 days at 37°C as described  
141 by Cameron et al. (36) then frozen it in liquid nitrogen and stored at -20°C. To prepare  
142 the protofibril enriched solution the original preparation was incubated on an agitating  
143 shaker (800 rpm) at 23°C for 36 hours, then centrifuged (10 min X 15 000g), frozen in  
144 liquid nitrogen and stored at -20°C (37). It is known that freshly prepared monomeric  
145 A $\beta$ <sub>42</sub> readily aggregates into soluble oligomers in a concentration and temperature  
146 dependent mode (9,36,38), so it was imperative to prepare the solutions with utmost care.

147

#### 148 **Cerebroventricular Injection**

149 To deliver the A $\beta$ <sub>42</sub> to the brain, a protocol of CV injection was adapted from  
150 previous studies (27,39). Briefly, fish were anesthetized in Tricaine MS-222 (0.01% in  
151 water) and placed on a wet slited sponge. They were gently held while ICV was  
152 performed using a 1 $\mu$ L Hamilton glass syringe. The solution (1 $\mu$ L, 10 $\mu$ M final  
153 concentration) was injected between the right and left telencephalon lobes and the needle  
154 did not enter more than 1mm. The syringe was washed twice with 70% Etoh and 1x PBS  
155 after every injection. After injection, that lasted no more than 30s for each individual,  
156 animals were placed back on their original tanks to recover. After around 10 minutes,  
157 their movement and breathing were visually normalized. Around 3% of animals,  
158 irrespective of their experimental groups, have shown aberrant swimming behavior in the  
159 first 24h and were euthanized.

160

#### 161 **Novel tank test**

162 The novel tank test, or novel tank diving test, was used to evaluate animals  
163 swimming parameters 7 days after the injection (40). Animals were placed individually  
164 in experimental tanks (30 cm long  $\times$  15 cm high  $\times$  10 cm wide) and were recorded during  
165 6 min. Locomotion and exploratory patterns of the fish were analyzed after the first



166 minute of habituation using EthoVision XT software (Version 11.5, Noldus) at a rate of  
167 30 positions per second (41). The following behavioral parameters were parametric and  
168 analyzed by ANOVA followed by Tuckey's test of multiple comparisons: distance  
169 traveled (m) of YA and OA, mean speed of mobile time (m/s) of YA and OA. Percentile  
170 of mobile time (%) of YA and OA and percentile of time spent in the bottom zone (%) of  
171 YA and OA were non-parametric and analyzed by Kruskal-Wallis followed by Tuckey's  
172 test multiple comparisons.

173

#### 174 **Y-Maze Test**

175 The Y-Maze test was used to evaluate spatial short-term memory of animals after  
176 14 dpi. Those animals were submitted to two trial sessions, training and test, separated by  
177 1 hour (42). Animals were individually tested in a 3 L Y-shaped glass aquarium with three  
178 equally sized arms (25 cm long, 8 cm wide and 15 cm high each) connected by a center  
179 zone and externally enclosed with black self-adhesive plastic film. The bottom surface of  
180 the apparatus was covered in white, to contrast with the fish and enable the automated  
181 analysis of the video. White visual cues of different geometric shapes were attached on  
182 the external walls of the apparatus to support visual discrimination between arms. The  
183 arms were designated as: the start arm, in which fish was initially placed and started  
184 exploration (always open), the novel arm, which was blocked during the first trial, but  
185 open during the second trial, and the other arm (always open). The center of the maze  
186 (neutral zone) was not computed in the preference analysis. On the first trial, fish were  
187 allowed to explore only two arms (start and other arm) for 5 minutes, while the third arm  
188 (novel arm) remained closed. One hour later, on the second trial, fish were placed back  
189 in the same starting arm, with free access to all three arms for 5 min. Training and test  
190 sessions were recorded using Logitech Quikcam PRO 9000 and analyzed using the  
191 EthoVision XT software (Version 11.5, Noldus). The time spent in each arm was  
192 determined, along with measures of locomotion (such as total distance, mean speed, turn  
193 angle and number of line crossings). Animals that are able to learn and consolidate  
194 memory spend more time exploring the Novel Arm in the test session, while memory  
195 impairment can be detected by the lack of preference.

196

197

198 **Inhibitory avoidance test**

199           To ascertain if the different A $\beta$ <sub>42</sub> solutions caused cognitive deficits in an aversive  
200 long-term memory experiment, an inhibitory avoidance task was performed as described  
201 by Blank *et al.* (43). Twenty-one dpi, animals were submitted to training and test sessions  
202 separated by 24h at the inhibitory avoidance apparatus, a glass tank (18 cm length  $\times$  9 cm  
203 width  $\times$  7 cm height) with two equally sized compartments divided by a sliding glass  
204 guillotine-type partition (9 cm  $\times$  7 cm). Compartments were defined by opaque plastic  
205 self-adhesive films in black or white colors externally covering all surfaces and the  
206 corresponding sides. Two electrodes extending through the wall height and placed on  
207 each far side of the opposing walls of the dark compartment were attached to an 8 V  
208 stimulator and administered a final  $3 \pm 0.2$  V AC shock (intensity measured between  
209 electrodes and the center of the dark compartment) when manually activated. Animals  
210 were gently placed in the white side of the task tank while the partition between  
211 compartments was closed. After 1 min of habituation, the partition was raised 1cm,  
212 allowing fish to cross to the dark side of the tank.

213           On the training session, when animals entered to the dark side with their entire  
214 body, the sliding partition was closed and a pulsed electric shock was administered for  
215 5 s. After this session, the fish was removed from the apparatus and placed in a temporary  
216 housing tank until all animals were tested, when all were returned to their original glass  
217 tank. Animals were tested for long-term memory retention 24 h after training. The test  
218 session repeated the training protocol, except that the shock was not administered and  
219 immediately after animals crossed to the dark compartment, they were removed from the  
220 apparatus. The latencies to cross from the white to the dark side were recorded in both  
221 sessions. While no ceiling time was used at the training learning session to unbiasedly  
222 evaluate the possible effects of age and treatment, during testing, once animals  
223 exploratory profile was determined, the maximum time animals were allowed to spend in  
224 the white compartment was 180 s (ceiling time). If that happened, animals were gently  
225 removed and their latency was considered to be 180 s. The data was nonparametric and  
226 analyzed by Mann-Whitney (each experimental group vs Veh).

227

228

229 **Statistical analysis of behavioral data**

230           Statistical analyses of behavioral tests were performed using Graphpad Prism 8  
231 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality and lognormality of data

232 were analyzed by Kolmogorov–Smirnov. To all statistical analysis the level of  
233 significance was set as  $p < 0.05$ . Statistical analyses are described in detail on each  
234 specific methodology.

235

### 236 **Protein digestion and LC-MS/MS analysis**

237 To evaluate age and A $\beta$ <sub>42</sub> states on YA and OA, samples were analyzed in  
238 biological triplicates via liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).  
239 Proteins were precipitated by a Chloroform/methanol method (44). Pellets were  
240 resuspended in 100 mM Tris HCl pH 7.0 containing 8 M urea and submitted to a tryptic  
241 digestion. Briefly, disulfide bonds were reduced in 5 mM dithiothreitol (DTT) for 20 min  
242 at 37 °C and then cysteines were alkylated in 25 mM iodoacetamide (IAM) for 20 min at  
243 room temperature in the dark. Urea was diluted to 2 M with 100 mM Tris HCl pH 7.0,  
244 trypsin was added at mass ratio of 1:100 enzyme/protein with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and the sample  
245 was incubated overnight at 37 °C, 5 % v/v of formic acid was added to stop the reaction.  
246 Peptide separation was performed on an in-house made 20 cm reverse-phase column (5  
247  $\mu$ m ODSAQ C18, Yamamura Chemical Lab, Japan) using a nanoUPLC (nanoLC Ultra  
248 1D plus, Eksigent, USA). Mobile phase A consisted of water/acetonitrile/formic acid  
249 (95:5:0.1) and mobile phase B consisted of water/acetonitrile/formic acid (10:90:0.1).  
250 Approximately 2  $\mu$ g were injected in technical triplicates through the autosampler. The  
251 flow rate was set to 300 nL and a 360-min reversed-phase gradient. The LC system was  
252 coupled to a hybrid mass spectrometer (LTQ-XL and LTQ Orbitrap Discovery, Thermo,  
253 USA) by a nano-electrospray ion source (Thermo Fischer Scientific, EUA). The mass  
254 spectrometer was operated in a data-dependent mode and data was collected with one  
255 MS1 full-scan in the Orbitrap (400-1600 m/z range; 30,000 resolution). The eight most  
256 abundant ions per scan were selected to CID MS2 in the ion trap.

### 257 **Proteomics Data Analysis**

258 The MS/MS spectra acquired from precursor ions were searched with comet (45)  
259 in the PatternLab for Proteomics platform (46) against a database contained a non-  
260 redundant *Danio rerio* proteome (ID UP000000374, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) and reverse  
261 sequences. The validity of the peptide-spectra matches (PSMs) generated was assessed  
262 using Patternlab's Search Engine Processor (SEPro) with a false discovery rate of 1%  
263 based on the number of decoys.

264 Proteins were grouped by maximum parsimony and the presence of proteins in all  
265 replicates was required for each condition. Venn diagrams were generated using  
266 PatternLab for Proteomics platform module. Proteins identified in both treatment and  
267 control samples were compared using TFold module in PatternLab for Proteomics  
268 platform. Benjamini-Hochberg (BH) q-value was set at 0.05. A variable fold-change  
269 cutoff for each individual protein was calculated according to the t-test *p*-value using an  
270 F-Stringency automatically optimized by the TFold software. Low abundant proteins  
271 were removed using an L-stringency value of 0.6.

272

## 273 **Results and Discussion**

274

### 275 **Novel Tank**

276 After 7 dpi, animals were submitted to the Novel Tank Test to access the following  
277 exploratory and locomotory parameters: mean speed ( $\text{m s}^{-1}$ ), distance travelled (m) and  
278 mobile time (%). No differences were observed between YA groups in mean speed (Fig.  
279 2a), distance travelled (Fig. 2b) and mobile time (Fig. 2c). The absence of effect suggests  
280 that YA were not sensitive to any of the  $\text{A}\beta_{42}$  forms injected within the first 7 dpi on the  
281 concentration ( $10 \mu\text{M}$ ) used. These results differ from other work in which authors found  
282 significant impairment of locomotory activity on animals of ages close to YA on the first  
283 7 dpi. Javed and colleagues (27) reported a change in swimming activity of 10 month old  
284 zebrafish one week post injection. However the concentration used was 5x ( $50 \mu\text{M}$ )  
285 higher than ours. Bhattarai reported also slower swimming speed 3 days after injecting  
286  $20 \mu\text{M}$  of  $\text{A}\beta_{42}$  (31).

287 On the other hand, OA zebrafish presented significant reduction on locomotory  
288 activity. Mean speed (Fig. 2d), despite no significant differences between OA  $\text{A}\beta_{42}$   
289 groups and their age-matched control, was reduced when  $\text{A}\beta_{42}\text{M}$  vs O ( $p= 0.0124$ ) and  
290  $\text{A}\beta_{42}\text{M}$  vs  $\text{A}\beta_{42}\text{P}$  ( $p=0.0468$ ) were compared. The total distance travelled (Fig. 2e) also  
291 differed between Veh vs  $\text{A}\beta_{42}\text{O}$  ( $p= 0.0468$ ) and  $\text{A}\beta_{42}\text{M}$  vs  $\text{A}\beta_{42}\text{O}$  ( $p=0.0443$ ). No  
292 significant changes in mobile time were observed (Fig. 2f). Additionally, when we  
293 analyze the overall exploratory pattern of YA and OA controls differences are evident.  
294 OA Veh animals tend to be faster and therefore to explore longer distances which could  
295 be attributed to their larger size.

296 Taken together, those results suggest that at 10 $\mu$ M concentration YA zebrafish are  
297 resistant to positive or negative effects caused by A $\beta$ <sub>42</sub> on any form. Also, results from  
298 OA animals regarding main exploratory parameters such total distance travelled and  
299 mean speed indicate that Oligomers are more impactful at 7 dpi. It is known that  
300 Oligomers cause overstimulation of extrasynaptic NMDA receptors, leading to Ca<sup>2+</sup>  
301 upregulation, triggering a cascade of pathological events leading to synaptic disruption  
302 and neuronal loss (11). Plaques exist apart from or in equilibrium with oligomeric forms  
303 of A $\beta$  and protofibrils, at this stage, may be decomposing into smaller particles or  
304 triggering inflammatory processes (13). O'Hare discuss that, when injecting fibrillar  
305 solution on rats that most of the behavioral deficits observed were not apparent during the  
306 first days following injection (47). Another hypothesis for the absence of effects on YA  
307 and their presence on OA might be related with clearance, as aging reduces de ability to  
308 clear A $\beta$  from extracellular interstitial fluid of the brain (48). For example, half-life of A $\beta$   
309 in aged mice is doubled in comparison to young (49).

310  
311

### 312 **Y-Maze**

313 The Y-Maze test was performed to check animals spatial short-term memory. This  
314 paradigm is based on the assumption that animals, upon a training session with only Start  
315 and Other arms available, would tend to explore the Novel arm presented on the test  
316 session for a longer period due to its novelty (40). Time spend on each arm during the test  
317 session is shown on Figure 3 for YA (Fig. 3A) and OA animals (Fig. 3B). Vehicle-  
318 injected control groups from both ages show a scaled increased of time spent on the Novel  
319 arm in relation Other and Start, despite the lack of statistical significance within arms.  
320 These profile is not seen in the A $\beta$ <sub>42</sub> injected animals of both ages, in which time spent  
321 on the Novel arm tends to be shorter than that spent on both other arms, except for the  
322 OA A $\beta$ <sub>42</sub>M group. These results cannot be compared to other studies since this task was  
323 not used by the limited number of previous efforts to characterize the effects of CV A $\beta$ <sub>42</sub>  
324 administration.

325

### 326 **Inhibitory avoidance**

327 We then asked if A $\beta$ <sub>42</sub> injection would elicit long-term memory deficits in YA and  
328 OA animals after 21 dpi. First, we analyzed overall performance to ensure training  
329 sessions of animals from all groups and ages were not different, sugestive of equivalent  
330 learning capacities, as supported by the exploratory paramenters from the Novel tank Test

331 (Figure 2). Moreover, training session latencies from vehicle-injected control groups of  
332 both ages were also equivalent. Memory retention, represented by the significant increase  
333 in latencies from training to test session was evident in YA Veh and A $\beta_{42}$ M (p= 0,0343  
334 and 0,0033, respectively), while A $\beta_{42}$ O and A $\beta_{42}$ P did not show long-term memory  
335 retention (Fig 4a). Similar results were observed for OA zebrafish: only A $\beta_{42}$  Veh and  
336 A $\beta_{42}$ M showed retention (p= 0.0082 and 0.0082, respectively) while A $\beta_{42}$ O and A $\beta_{42}$ P  
337 were not (Fig 4b). Overall, despite the lack of statistical significance, older animals tend  
338 to have higher latencies to enter the dark zone in both sessions, which could be attributed  
339 to general physiology and orientation aspects. It is known that their overall fitness is  
340 decreased (50), and the apparatus might represent a smaller space for an animal with an  
341 increased size than YA fish. Our group has previously shown that intrabrain injection of  
342 A $\beta_{42}$  in 24hpf embryos induces cognitive deficits in 7dpf larvae (30). Results show  
343 learning deficits in both YA and OA when injected with 1  $\mu$ L A $\beta_{42}$ O or A $\beta_{42}$ P solution  
344 (Fig. 4a,b), similar to what other groups have found (27,31). However those groups  
345 performed a passive avoidance test, which is a much longer learning paradigm.  
346 Surprisingly, when injected with M solution YA and OA zebrafish demonstrated learning  
347 ability akin to Veh group. It is now known that monomers are indeed neuroprotective  
348 (51) and related to various physiological roles (extensively reviewed in (52)).

349

### 350 **Mass spectrometry**

351

352 The Mass Spectrometry analysis of OA found between 682 and 859 proteins on  
353 each experimental group. To be counted, the same protein needed to be found in all  
354 replicates from each group. The Venn diagram on Figure 5 shows the number of total  
355 proteins detected in A $\beta_{42}$ M (Fig. 5a), A $\beta_{42}$ O (Fig. 5b), A $\beta_{42}$ P (Fig. 5c.) and in Veh. The  
356 proteins present in both experimental and Veh groups were classified according to the  
357 cut-off criteria (TFold and pValue) and only those proteins that satisfied both were  
358 selected to evaluation. Next, we analyzed which proteins showed an increase or reduction  
359 in A $\beta_{42}$  injected experimental groups in relation to their aged-matched controls. The  
360 identified proteins were grouped according to their molecular functions in main  
361 categories as follow: Metabolism; Neurotransmission; Immune system/ROS and  
362 Mitochondrial function. The number of increased or reduced proteins of each categories  
363 found on the experimental groups is summarized on Table 1.

364           When A $\beta$ <sub>42</sub>M and Veh were compared, the following neurotransmission related  
365 proteins were found to be reduced in brains from A $\beta$ <sub>42</sub>M animals: Synaptophysin a  
366 (Uniprot: B0S5B9) (6.5-fold reduction) related to exocytosis, synaptic plasticity and  
367 reduced in AD (53), Peptidylprolyl Isomerase (Uniprot: Q642J1) (4.7-fold), related to tau  
368 oligomerization and A $\beta$  processing (54), and N-ethylmaleimide-sensitive factor  
369 attachment protein, beta a (Uniprot: E7FE03) (1.8-fold), a protein from SNARE complex.  
370 Interestingly, these changes along with the reduction of 10 proteins related to metabolism  
371 were not sufficient to cause cognitive deficits, as observed in experiments described early  
372 on this paper.

373           The A $\beta$ <sub>42</sub>O CV injected brains had a total of 12 proteins altered when compared  
374 to Veh. Regarding the Neurotransmission category, we found a 1.5-fold increase of  
375 Synuclein gamma b (Uniprot: A0A2R8RP85), a protein known to accumulate in Familial  
376 AD (55) and Peptidylprolyl isomerase (Uniprot: A0A0G2KNY9) (1.9-fold), related to  
377 amyloid processing and tau oligomerization (54) in A $\beta$ <sub>42</sub>O. F-actin-capping protein  
378 subunit alpha (Uniprot: A0A0R4IEP3) was 1.9-fold decreased in relation to controls. In  
379 the Mitochondria/ATP synthesis category we found Cytochrome c oxidase (COX)  
380 subunit 6b (Uniprot: Q6DH63) increased 1.8-fold and ATP synthase (Uniprot: Q6DRD1)  
381 increased 1.7-fold in relation to control levels. This differences were not observed on the  
382 A $\beta$ <sub>42</sub>M group. AD progression is known to be associated mitochondrial dysfunction, and  
383 previous reports found the COX complex altered in AD patients brains (56,57).

384           The A $\beta$ <sub>42</sub>P group had 39 proteins altered when compared to Veh. The  
385 Neurotransmission category was the most affected, including 12 proteins showing a  
386 reduction and 6 an increase in A $\beta$ <sub>42</sub>P. The proteins showing reduced levels in A $\beta$ <sub>42</sub>P were  
387 Peptidylprolyl isomerase (2.1-fold reduction), an enzyme related to Tau oligomerization  
388 and A $\beta$  processing in AD (54) and Synaptophysin a (13-fold), a presynaptic vesicle  
389 protein related to A $\beta$  modulation (58,59). Transferrin, reduced 2.8-fold in A $\beta$ <sub>42</sub>P, was  
390 previously found to be desaturated in AD and associated to decreased plasma iron (60).  
391 N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (Uniprot: E7FE03), related to  
392 synaptogenesis and decreased in Down and AD patients, was also 2.2-fold reduced in  
393 A $\beta$ <sub>42</sub>P (53). It is interesting to observe that the only protein that appeared increased on  
394 both A $\beta$ <sub>42</sub>O and A $\beta$ <sub>42</sub>P was Synuclein gamma b (Uniprot: A0A2R8RP85).

395

396

397

398 **Conclusions**

399 Here we present a comparison between the effects of different oligomeric soluble  
400 A $\beta$ <sub>42</sub> solutions injected into the cerebroventricular space of YA and OA zebrafish. As A $\beta$   
401 has several oligomeric forms between the monomeric and fibrillar presentations, the  
402 different outcomes found in animals injected with A $\beta$ <sub>42</sub>M, A $\beta$ <sub>42</sub>O and A $\beta$ <sub>42</sub>P are of  
403 significance. YA did not present any locomotor impairment 7 dpi when injected with 10  
404  $\mu$ M solutions, while OA animals injected with A $\beta$ <sub>42</sub>O demonstrated decreased mean  
405 speed and distance travelled and A $\beta$ <sub>42</sub>P had their travelled distance impacted.  
406 Interestingly, we also found that A $\beta$ <sub>42</sub>M caused no locomotor or cognitive deficits in the  
407 timeframe of our experiments (21 days), despite significant alterations in  
408 neurotransmission components detected on LC-MS/MS experiments. The LC-MS/MS  
409 results indicate that proteins related to neurotransmission, immune system, general  
410 metabolism and mitochondrial function are altered in A $\beta$ <sub>42</sub> O and A $\beta$ <sub>42</sub> P in relation to  
411 their control. Those effects are also observed on AD animal models and human brains  
412 (57,61,62).

413 Taken together, our results indicated that YA and OA injected with A $\beta$ <sub>42</sub> O and  
414 A $\beta$ <sub>42</sub>P show cognitive impairment and effects are observed as early as 7 dpi at this age.  
415 The brain is a complex structure and our findings of increased and reduced proteins might  
416 be underestimated as we used full brain homogenates and the A $\beta$ <sub>42</sub> CV injection may have  
417 slight different impacts on specific neuroanatomical areas. In addition to characterizing  
418 the different oligomeric presentations of A $\beta$ <sub>42</sub> simultaneously, to ensure a proper  
419 comparison between all groups, we were especially attentive to the preparation and use  
420 of fresh A $\beta$  solution. This is a critical methodological aspect, as findings may be masked  
421 by the dynamic changes in oligomeric forms that may occur spontaneously on A $\beta$   
422 solutions over time and may impede the comparison of results from different studies  
423 available on the literature until now. Further research is required to understand the  
424 signaling and inflammatory responses caused by A $\beta$  CV.

425

426

427

428

429



430 **References**

- 431 1. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al.  
432 Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017;390(10113):2673–734.
- 433 2. International Alzheimer's Disease. World Alzheimer Report 2019. Alzheimer's  
434 Disease International. 2019.
- 435 3. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau  
436 hypothesis in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2018;12(JAN).
- 437 4. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R,  
438 et al. Disease : an Appraisal From 1984 To 2014. 2015;275(3):251–83.
- 439 5. Li H, Liu CC, Zheng H, Huang TY. Amyloid, tau, pathogen infection and  
440 antimicrobial protection in Alzheimer's disease -conformist, nonconformist, and  
441 realistic prospects for AD pathogenesis. *Transl Neurodegener*. 2018;7(1):1–16.
- 442 6. Chen Y, Tang BL. The amyloid precursor protein and postnatal  
443 neurogenesis/neuroregeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(1):1–  
444 5.
- 445 7. Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fa M. The  
446 aggregation kinetics of Alzheimer ' s  $\beta$ -amyloid peptide is controlled by stochastic  
447 nucleation. 2005;1753–9.
- 448 8. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Maria M, Weigand SD, Knopman DS, et al.  
449 Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol*.  
450 2009;63(2):204–12.
- 451 9. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A $\beta$  oligomers.  
452 *FEBS J*. 2010;277(6):1348–58.
- 453 10. Washington PM, Morffy N, Parsadarian M, Zapple DN, Burns MP. Experimental  
454 traumatic brain injury induces rapid aggregation and oligomerization of amyloid-  
455 beta in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurotrauma*. 2014;31(1):125–34.
- 456 11. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A $\beta$ -induced synaptic dysfunction  
457 in Alzheimer ' s disease. 2014;1–12.
- 458 12. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. Calcium  
459 dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of  
460 soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*. 2005;280(17):17294–300.
- 461 13. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's  
462 disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(3):349–  
463 57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3028>
- 464 14. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al.  
465 The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide.  
466 *PLoS One*. 2010;5(3):1–10.
- 467 15. Moir RD, Lathe R, Tanzi RE. The antimicrobial protection hypothesis of  
468 Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2018;14(12):1602–14.

469 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.3040>

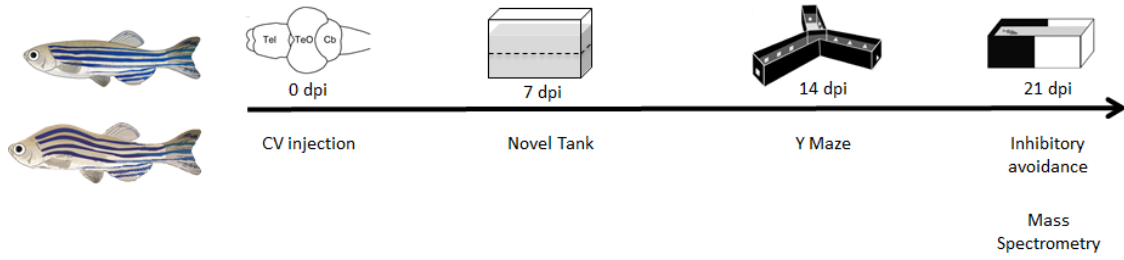
- 470 16. Ravi LB, Mohanty JG, Chrest FJ, Jayakumar R, Nagababu E, Usatyuk P V., et al.  
471 Influence of beta-amyloid fibrils on the interactions between red blood cells and  
472 endothelial cells. *Neurol Res.* 2004;26(5):579–85.
- 473 17. Magnoni S, Esparza TJ, Conte V, Carbonara M, Carrabba G, Holtzman DM, et al.  
474 Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid- $\beta$   
475 levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury.  
476 *Brain.* 2012;135(4):1268–80.
- 477 18. Morley JE, Farr SA. The role of amyloid-beta in the regulation of memory.  
478 *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;88(4):479–85. Available from:  
479 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>
- 480 19. Yarchoan M, James BD, Shah RC, Arvanitakis Z, Wilson RS, Schneider J, et al.  
481 Association of Cancer History with Alzheimer’s Disease Dementia and  
482 Neuropathology. *J Alzheimer’s Dis.* 2017 Jan 1;56(2):699–706.
- 483 20. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, et al. Mice with  
484 combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of  
485 amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* 2000 Nov 1;20(21):7951–  
486 63.
- 487 21. Luo Y, Bolon B, Damore M a., Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, et al. BACE1 ( $\beta$ -  
488 secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes  
489 or develop neural lesions over time. *Neurobiol Dis.* 2003;14(1):81–8.
- 490 22. Nicolas W. Cortes-Penfield, Barbara W. Trautner RJ. Amyloid- $\beta$  Peptide Protects  
491 Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer’s Disease.  
492 *Sci Transl Med.* 2016;8(340):139–48.
- 493 23. Ridley RM, Baker HF, Windle CP, Cummings RM. Very long term studies of the  
494 seeding of  $\beta$ -amyloidosis in primates. *J Neural Transm.* 2006;113(9):1243–51.
- 495 24. Pu Y-Z, Liang L, Fu A-L, Liu Y, Sun L, Li Q, et al. Generation of Alzheimer’s  
496 Disease Transgenic Zebrafish Expressing Human APP Mutation Under Control of  
497 Zebrafish appb Promotor. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2016 Dec 30 [cited 2020  
498 Feb 17];14(6):668–79. Available from:  
499 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27978793>
- 500 25. Stainier DYR, Raz E, Lawson ND, Ekker SC, Burdine RD, Eisen JS, et al.  
501 Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet* [Internet]. 2017 Oct 1  
502 [cited 2020 Feb 17];13(10):e1007000. Available from:  
503 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049395>
- 504 26. Bhattarai P, Thomas AK, Cosacak MI, Papadimitriou C, Mashkaryan V, Zhang Y,  
505 et al. Modeling amyloid- $\beta$ 42 toxicity and neurodegeneration in adult zebrafish  
506 brain. *J Vis Exp.* 2017 Oct 25;2017(128).
- 507 27. Javed I, Peng G, Xing Y, Yu T, Zhao M, Kakinen A, et al. Inhibition of amyloid  
508 beta toxicity in zebrafish with a chaperone-gold nanoparticle dual strategy. *Nat*  
509 *Commun* [Internet]. 2019;10(1). Available from:  
510 <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11762-0>

- 511 28. Kizil C, Iltzsche A, Kaslin J, Brand M. Micromanipulation of gene expression in  
512 the adult zebrafish brain using cerebroventricular microinjection of morpholino  
513 oligonucleotides. *J Vis Exp*. 2013;(75):1–6.
- 514 29. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The  
515 zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome are  
516 involved in the ongoing improvement of the zebrafish genome assembly. Manual  
517 annotation was produced by G The generation of maps used in the initial  
518 assemblies and the production of clone tiling paths were carried out by. *Nature*.  
519 2013;496(7446):498–503.
- 520 30. Nery LR oesler, Eltz NS ilva, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN  
521 oriega, et al. Brain intraventricular injection of amyloid- $\beta$  in zebrafish embryo  
522 impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium.  
523 *PLoS One*. 2014;9(9):e105862.
- 524 31. Bhattarai P, Thomas AK, Cosacak MI, Papadimitriou C, Mashkaryan V, Froc C,  
525 et al. IL4/STAT6 Signaling Activates Neural Stem Cell Proliferation and  
526 Neurogenesis upon Amyloid- $\beta$ 42 Aggregation in Adult Zebrafish Brain. *Cell Rep*  
527 [Internet]. 2016;17(4):941–8. Available from:  
528 <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.075>
- 529 32. Canadian Council on Animal Care. Canadian Council on Animal Care guidelines  
530 on: the care and use of fish in research, teaching and testing. *Can Counc Anim*  
531 *Care* [Internet]. 2005;1–94. Available from:  
532 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- 533 33. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*  
534 (Danio Rerio). Eugene: University of Oregon Press; 2007.
- 535 34. Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR J*  
536 [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2020 Feb 9];53(2):192–204. Available from:  
537 <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-lookup/doi/10.1093/ilar.53.2.192>
- 538 35. Cunvong K, Huffmire D, Ethell DW, Joshua Cameron D. Amyloid- $\beta$  increases  
539 capillary bed density in the adult zebrafish retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci*.  
540 2013;54(2):1516–21.
- 541 36. Cameron DJ, Galvin C, Alkam T, Sidhu H, Ellison J, Luna S, et al. Alzheimer’s-  
542 related peptide amyloid-?? plays a conserved role in angiogenesis. *PLoS One*.  
543 2012;7(7):1–8.
- 544 37. O’Hare E, Weldon DT, Manyth PW, Ghiraldi JR, Finke MP, Kuskowski MA, et  
545 al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated  
546 A $\beta$ (1-42). *Brain Res*. 1999;(815):1–10.
- 547 38. Novo M, Freire S, Al-Soufi W. Critical aggregation concentration for the  
548 formation of early Amyloid- $\beta$  (1-42) oligomers. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):3–  
549 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19961-3>
- 550 39. Thomas PK, Cosacak AK, Papadimitriou MI, Mashkaryan C, Zhang V, Kizil Y.  
551 Modeling Amyloid- $\beta$ 42 Toxicity and Neurodegeneration in Adult Zebrafish Brain.  
552 *J Vis Exp* [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 10];(128):56014. Available from:

- 553 [www.jove.com/url=https://www.jove.com/video/56014](http://www.jove.com/url=https://www.jove.com/video/56014)
- 554 40. Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, et al. Analyzing  
555 habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010  
556 Apr 2;208(2):450–7.
- 557 41. Altenhofen S, Wiprich MT, Nery LR, Leite CE, Vianna MRMR, Bonan CD.  
558 Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae  
559 and adult zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2017 Jan;182:172–83.
- 560 42. Cognato G de P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR,  
561 et al. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic  
562 and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol*  
563 *Learn Mem* [Internet]. 2012;98(4):321–8. Available from:  
564 <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2012.09.008>
- 565 43. Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MRM. A one-trial inhibitory  
566 avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term  
567 memory. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2009;92(4):529–34. Available from:  
568 <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.07.001>
- 569 44. WESSEL D m, FLÜGGE UI. A method for the quantitative recovery of protein in  
570 dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*.  
571 1984;138(1):141–3.
- 572 45. ENG JK, JAHAN TA, HOOPMANN MR. Comet: an open-source MS/MS  
573 sequence database search tool. *Proteomics*. 2013;13(1):22–4.
- 574 46. Carvalho PC, Lima DB, Santos FVLMDM, Barbosa VC. Integrated analysis of  
575 shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*.  
576 2016;11(1):102.
- 577 47. O’Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, Ghilardi JR, Finke MP, Kuskowski MA, et  
578 al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated  
579 A $\beta$ ((1-42)). *Brain Res*. 1999;815(1):1–10.
- 580 48. Wildsmith KR, Holley M, Savage JC, Skerrett R, Landreth GE. Evidence for  
581 impaired amyloid  $\beta$  clearance in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s resea*.  
582 2013;5(3).
- 583 49. Cirrito JR, May PC, O’Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, et al. In  
584 vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-  
585 associated changes in amyloid- $\beta$  metabolism and half-life. *J Neurosci*.  
586 2003;23(26):8844–53.
- 587 50. Gilbert MJH, Zerulla TC, Tierney KB. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the  
588 study of aging and exercise: Physical ability and trainability decrease with age.  
589 *Exp Gerontol* [Internet]. 2013;50(1):106–13. Available from:  
590 <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.013>
- 591 51. Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, et al. Beta-  
592 amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*. 2009;29(34):10582–7.
- 593 52. Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR. The physiological roles of amyloid- $\beta$

- 594 peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.*  
595 2018;10(APR):1–16.
- 596 53. Yoo BC, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Synaptosomal proteins, beta-soluble  
597 N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (Beta-SNAP), gamma-  
598 SNAP and synaptotagmin I in brain of patients with Down syndrome and  
599 Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001;12(3):219–25.
- 600 54. Blair LJ, Baker JD, Sabbagh JJ, Dickey CA. The emerging role of peptidyl-prolyl  
601 isomerase chaperones in tau oligomerization, amyloid processing and Alzheimer's  
602 disease. *J Neurochem.* 2015;133(1):1–13.
- 603 55. Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M, Masliah E. Role of synucleins in Alzheimer's  
604 disease. *Neurotox Res.* 2009;16(3):306–17.
- 605 56. Bi R, Zhang W, Zhang D. Genetic association of the cytochrome c oxidase-related  
606 genes with Alzheimer ' s disease in Han Chinese. *Neuropsychopharmacology*  
607 [Internet]. 2018;(July). Available from: [http://dx.doi.org/10.1038/s41386-018-](http://dx.doi.org/10.1038/s41386-018-0144-3)  
608 0144-3
- 609 57. Parker WD, Parks JK. Cytochrome c oxidase in alzheimer's disease brain:  
610 Purification and characterization. *Neurology.* 1995;45(3):482–6.
- 611 58. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. Loss of the  
612 presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with  
613 cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 1997  
614 Aug [cited 2020 Mar 6];56(8):933–44. Available from:  
615 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9258263>
- 616 59. Tampellini D, Capetillo-Zarate E, Dumont M, Huang Z, Yu F, Lin MT, et al.  
617 Effects of synaptic modulation on  $\beta$ -amyloid, synaptophysin, and memory  
618 performance in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci.*  
619 2010;30(43):14299–304.
- 620 60. Hare DJ, Doecke JD, Faux NG, Rembach A, Volitakis I, Fowler CJ, et al.  
621 Decreased plasma iron in Alzheimer's disease is due to transferrin desaturation.  
622 *ACS Chem Neurosci.* 2015;6(3):398–402.
- 623 61. Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease  
624 pathogenesis. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):505–8.
- 625 62. Sun J, Xu J, Ling Y, Wang F, Gong T, Yang C, et al. Fecal microbiota  
626 transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1  
627 transgenic mice. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2019;9(1). Available from:  
628 <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0525-3>
- 629
- 630
- 631
- 632

633 **Figure 1**



634

635

Fig 1.

636

Experimental design timeline. Young and old adults (YA and OA) were divided in groups and CV injected with Veh, 10  $\mu$ M of A $\beta$ <sub>42</sub>M,

637

A $\beta$ <sub>42</sub>O or A $\beta$ <sub>42</sub>P and kept on glass tanks. After 7 dpi, animals were exposed to the novel tank test for 5 minutes to access their

638

exploratory behavior. The Y-Maze test was performed at 14 dpi to access the animals' short-term memory. The inhibitory avoidance

639

was performed at 21dpi to evaluate animals' long-term memory. At 21 dpi animals were euthanised and brains' proteomic profiles

640

were analyzed by Mass Spectrometry.

641

642

643

644

645

646

647

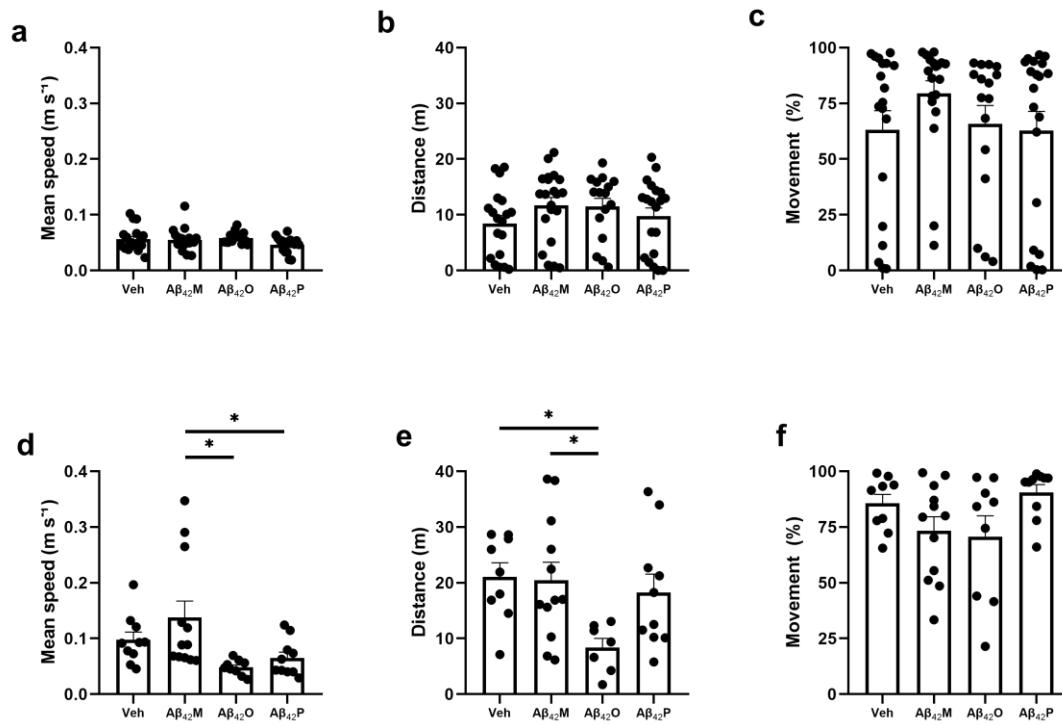
648

649

650

651

652



654

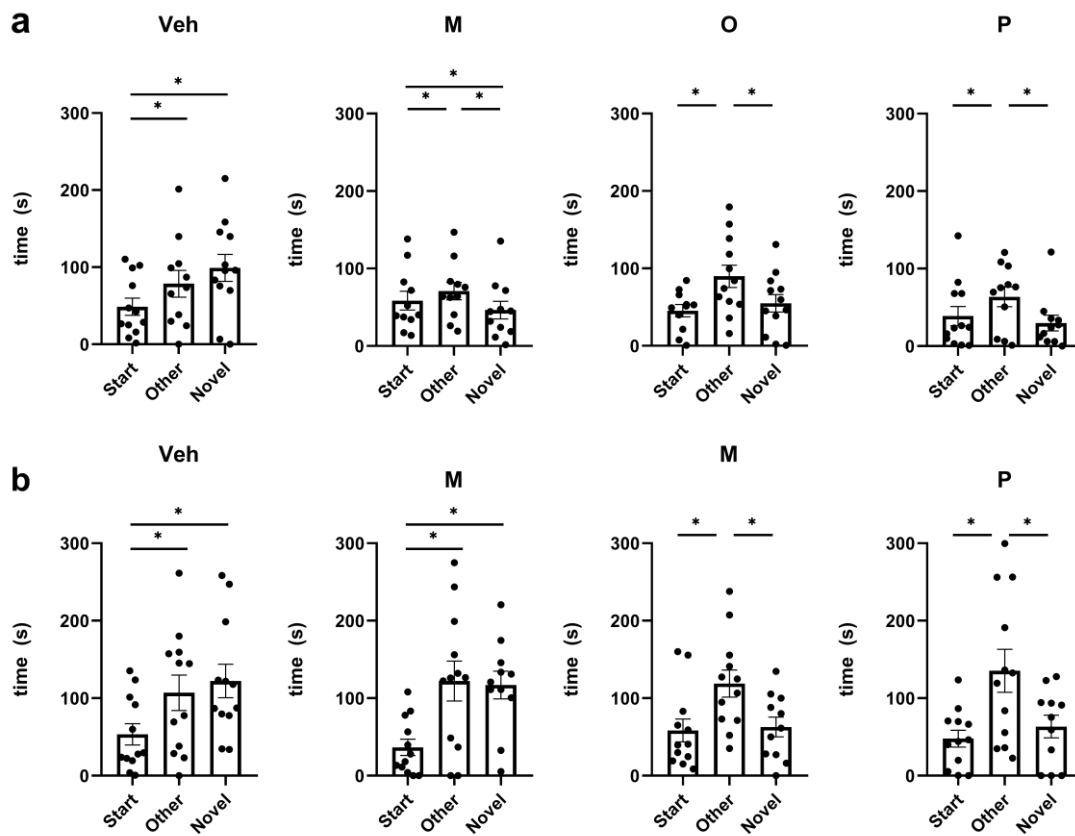
655 Figure 2. Novel Tank Test (n=20). Mean speed of mobile time (m s<sup>-1</sup>) of YA (a) and OA (d), Distance travelled (cm) of YA (b) and  
 656 OA (e), Movement (%) of YA (c) and OA(f). Mean speed and Distance travelled were analyzed by One-way ANOVA, followed by  
 657 Tukey test. Movement was analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn test. For all graphics, values are presented as Mean ± SEM.  
 658 Dots represent single values. Asterisks express differences when compared to control; p < 0.05.

659

660

661

662



664

665 Figure 3. Y-Maze Test. A single animal was placed on a Y shaped tank with one of its arms closed and let swim for 5 minutes. One  
 666 hour later the animal was returned to the tank, this time with access to three arms. The time spent on each arm was plotted.  
 667

668

669

670

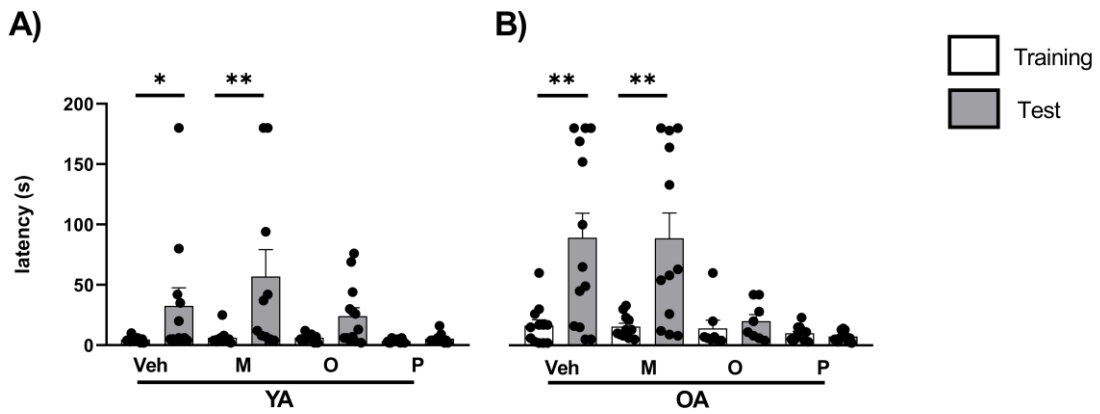
671

672

673



674 **Figure 4**



675

676 Figure 4. Comparison of memory latencies to enter the dark compartment for animals trained on the inhibitory avoidance. Columns  
677 show mean latencies + SEM to cross from white to dark compartment (in seconds) in training (clear) and test (shaded) sessions for  
678 animals submitted to training with shock (n = 12). (a) represents the YA groups and (b) the OA groups. No differences were found  
679 between training performances among all groups as evaluated by Kruskal–Wallis test. Retention was assessed by Mann-Whitney test.  
680 Dots represent single values. Asterisks express differences when compared to control (n = 8–12 animals per group; \* p < 0.05; \*\* p <  
681 0.01).

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

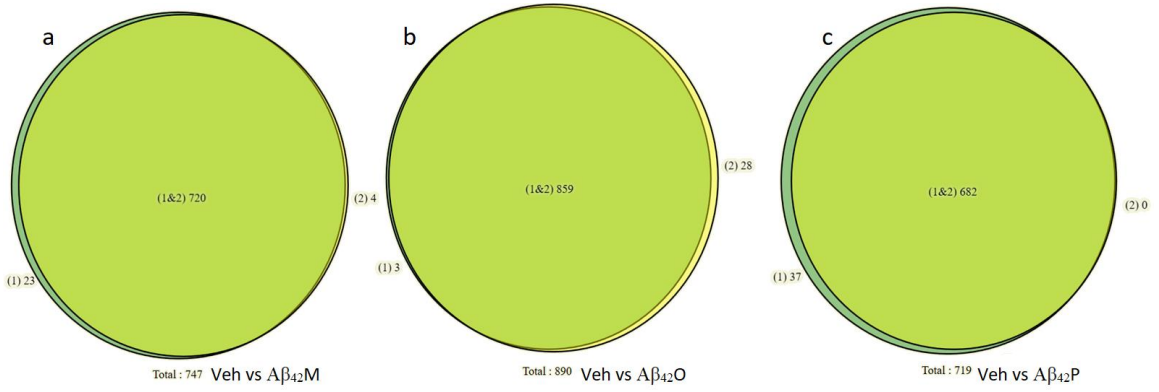
694

695

696

697

698 **Figure 5**



699

700

701 Figure 5. Venn diagram representing protein counts from experimental groups and Veh. (a) represent M vs Veh, (b) O vs Veh and (c)

702 P vs Veh. Green (1) represent Veh and Yellow (2) the experimental.

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721 **Table 1**

Number of Proteins increased / reduced vs Veh				
		A $\beta$ <sub>42</sub> M	A $\beta$ <sub>42</sub> O	A $\beta$ <sub>42</sub> P
Metabolism	Increased	4	0	5
	Reduced	10	1	9
Neurotransmission	Increased	1	2	6
	Reduced	12	4	12
Immune System / ROS	Increased	3	3	0
	Reduced	2	0	2
Mitochondria / ATP synthesis	Increased	3	2	4
	Reduced	0	0	1

722 Table 1: Proteins up or downregulated on experimental groups

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

# CAPÍTULO 3

CRISPR-Cas9 em *zebrafish* (*Danio rerio*): Aplicação da técnica e validação de modelos para a Doença de Alzheimer

## 4. CRISPR-Cas9 em *zebrafish*

4.1 Objetivo Geral

4.2 Objetivos Específicos

4.3 Resultados Obtidos

#### 4. CRISPR-CAS9 EM ZEBRAFISH:

A Técnica de edição gênica CRISPR-Cas9 surgiu em 2012 como uma ferramenta inovadora e de fácil utilização para modificação de genomas quando comparada às até então disponíveis (86). A facilidade do uso está na proteína Cas9, que liga uma curta sequência de RNA molde para clivar regiões específicas de DNA. Os métodos anteriores, como TALENs, requeriam um lento processo de desenho de proteínas quiméricas para interagir com a região de interesse no DNA. A técnica CRISPR-Cas9 foi executada com sucesso em diversas espécies de plantas, animais, bactérias e leveduras, com eficiências de até 80% (87).

Vários grupos propuseram estratégias diferentes de aplicação de CRISPR-Cas9 em *zebrafish* (88–91). A combinação desta técnica de alta eficiência para produção de animais *knockout* ou transgênicos com as ferramentas moleculares e farmacológicas já utilizadas em *zebrafish*, como, por exemplo, morfolidos ou injeção de RNAm, pode permitir o estudo de função de genes e a compreensão de seu papel fisiológico.

A proposta deste capítulo é apresentar de forma breve os resultados parciais obtidos através do estabelecimento da técnica, partindo da seleção de alvos e desenho de primers até a manutenção das diferentes linhagens e gerações produzidas. Este grupo de experimentos consistia no projeto original de doutoramento, mas ainda não foi concluído devido a inúmeras dificuldades técnicas enfrentadas que impediram o estabelecimento de linhagem homocigótica e sua caracterização fenotípica.

##### 4.1 Objetivo Geral

Estabelecer e aplicar a técnica de edição gênica CRISPR-Cas9 em *zebrafish* para criação de novos modelos para o estudo da Doença de Alzheimer e estudos de função de genes envolvidos com esta doença.

##### 4.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a existência dos alvos selecionados a nível de proteína através de espectrometria de massa;
- Aplicar e validar a técnica CRISPR-Cas9 em *zebrafish* (*Danio rerio*);
- Estabelecer linhagens *knockout* para os genes *GSK3B*, *MAPTA*, *MAPTB*, *PSEN1*, *PSEN2*, *APPA*, *APPB* e *TYR*;

- Avaliar as alterações fenotípicas, incluindo morfologia, neuroanatomia e comportamento nas linhagens *GSK3B*, *PSEN1*, *APPA* e *APPB*;

#### 4.3 Métodos utilizados e Resultados Obtidos

A técnica CRISPR-Cas9 necessita de dois componentes para sua atividade: a proteína Cas9, uma endonuclease, e o *single guide* RNA (sgRNA), um fragmento de RNA complementar à região de interesse na sequência do gene de interesse. A produção de ambos os componentes foi efetuada como descrita por Vejnar *et al.*(90). Considerando o ineditismo da técnica e a então não caracterizada eficiência do protocolo, inicialmente foram escolhidos como alvos de interesse genes considerados centrais na DA, como presenilina (*PSEN1* e 2), Tau (*MAPT*), *APP* e *GSK3B*. Devido à duplicação genômica adicional ocorrida em teleósteos, em *zebrafish*, como descrito no capítulo 1, muitos dos genes de interesse possuem parálogos, que foram incluídos na abordagem inicial. Adicionalmente, para avaliar a eficiência das etapas iniciais, foi incluído como alvo adicional o gene da enzima tirosinase (*TYR*).

A Tabela 2 mostra os alvos selecionados e os *primers* desenhados para produção de sgRNA. As regiões foram selecionadas utilizando o software online CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (92) e conferidas manualmente no repositório de sequências ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Para a síntese de sgRNA, o Primer Base e um alvo foram incubados em Termocilador e Taq DNA polimerase (Thermo) foi utilizada para preenchimento das extremidades e após esta etapa, utilizou-se o Kit MEGAscript T7 (Ambion).

Tabela 2: *Primers* utilizados para produção de sgRNA dos alvos

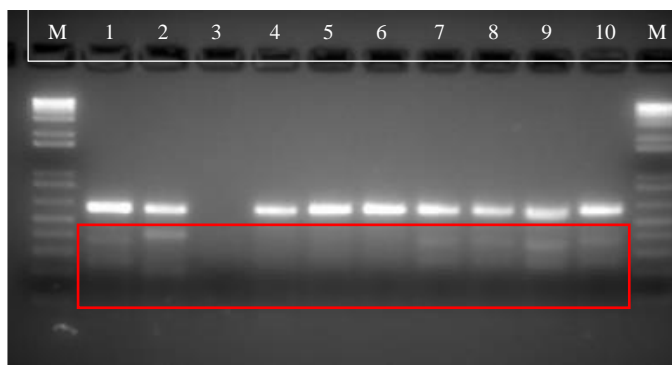
Nome	Sequência
Primer Base	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
<i>GSK3B</i>	TAATACGACTCACTATAGGAGGTGGTTCTGGGCCGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>MAPTA</i>	TAATACGACTCACTATAGGAAGAAGCCATGTTATCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>MAPTB</i>	TAATACGACTCACTATAGGACCACATGAATTCTGGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>PSEN1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTCACATCACAGTCCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
<i>PSEN2</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTCTGGAGATGCCGGGCGTTTTAGAGCTAGAA
<i>APPA</i>	TAATACGACTCACTATAGGAGGAGGTGGTGGCAGGTGGTTTTAGAGCTAGAA
<i>APPB</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTTGTGGCGGAGCCTCGTTTTAGAGCTAGAA
<i>TYR</i>	TAATACGACTCACTATAGGACTGGAGGACTTCTGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

Para a obtenção do segundo componente da técnica, o RNAm de Cas9, o vetor pT3TS-nls-zCas9-nls (93)(Addgene #46757) foi linearizado com a enzima XbaI (Thermo), purificado

e submetido à transcrição *in vitro* com o Kit mMESSAGE mMACHINE T3 (Ambion). Uma vez preparados os componentes as concentrações foram ajustadas em uma solução de uso contendo 100 ng/μL Cas9 RNAm e 20 ng/μL de sgRNA (100 e 20 pg de Cas9 e sgRNA respectivamente). Nos dias de injeção, os embriões recolhidos foram higienizados e preparados em placa de Petri com água. A injeção foi efetuada utilizando-se um equipamento de microinjeção com capilar de vidro (Narishige) acoplado a estereomicroscópio (Nikon, SMZ 1500) utilizando a solução de uso contendo os componentes da técnica. Após este procedimento, os embriões foram mantidos em incubadora com temperatura e iluminação controladas. Estes embriões são considerados a linhagem fundadora (F0).

Para a confirmação da eficiência da técnica foram utilizadas duas estratégias. A primeira foi a enzima T7 endonuclease I (T7EI), uma enzima que cliva DNA heteroduplex. O heteroduplex se forma quando o DNA é re-hibridizado e o anelamento não é completo, no caso de eventos de mutação aleatórios causados pela clivagem do DNA através da Cas9. É importante ressaltar que a T7 subestima os eventos de mutação, uma vez que ela é incapaz de detectar SNPs e pequenas modificações. O DNA foi extraído de embriões com 24h pós fertilização. A Figura 9 apresenta um exemplo do resultado obtido em gel de Agarose 1%. Uma vez que o DNA foi incubado com T7EI, na presença de heteroduplex haverá uma clivagem total ou parcial em fragmentos menores. Isso pode ser observado nas canaletas 1,2,7,8,9 e 10.

**Figura 9. Gel demonstrativo da clivagem por T7 Endonuclease I**

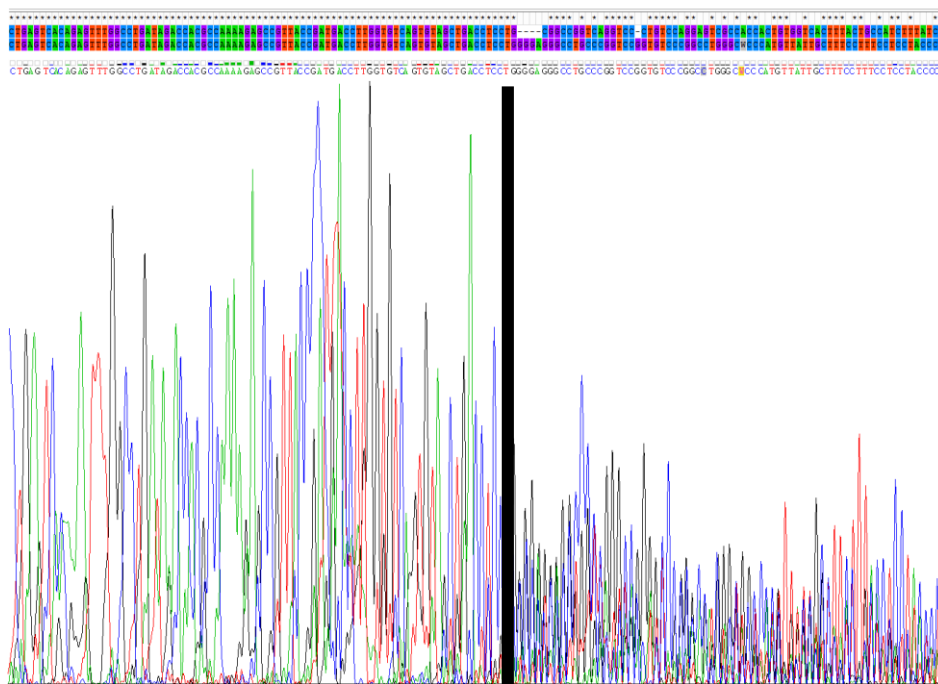


Nota: M: Marcador 1kb Plus (canaleta 1 e 12) flanqueando amostras de embriões injetados com mix para *GSK3β*. Pode-se perceber a digestão parcial e formação de fragmentos menores onde houveram eventos de reparo de DNA causado pela técnica.

A segunda estratégia utilizada foi sequenciamento genômico. As amostras de DNA extraído de embriões foram preparadas e encaminhadas com um *primer* para a empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, Rio Grande do Sul). A Figura 10 mostra um resultado de

sequenciamento de uma amostra de embrião injetado com mix para o alvo *GSK3β*. Os animais injetados são geralmente mosaicos devido ao reparo de DNA induzido pela quebra ser inespecífico. Os animais mosaico apresentam “ruído” no sequenciamento a partir da região alvo que pode ser explicado como dificuldade na leitura no nucleotídeo anexado na posição, visto que os eventos de reparo de DNA na técnica são aleatórios e podem gerar mutações variadas.

**Figura 10. Resultado representativo de sequenciamento de DNA**



**Nota:** Resultado de sequenciamento de embrião injetado com mix para o alvo *GSK3β*. Na parte superior encontra-se a sequência anotada e logo abaixo o resultado do sequenciamento. Os asteriscos indicam identidade entre os nucleotídeos. A barra preta indica a região exata onde a Cas9 causa a quebra na dupla fita. Portanto pode-se observar uma diminuição na identidade e no sinal (parte inferior) resultante do sequenciamento.

Os resultados do sequenciamento de 10 animais F0 de cada grupo permitiram a estimativa da eficiência da técnica para as injeções dos diferentes alvos estão compiladas na Tabela 3.

Tabela 3: Eficiência da técnica CRISPR-Cas9 em embriões sequenciados

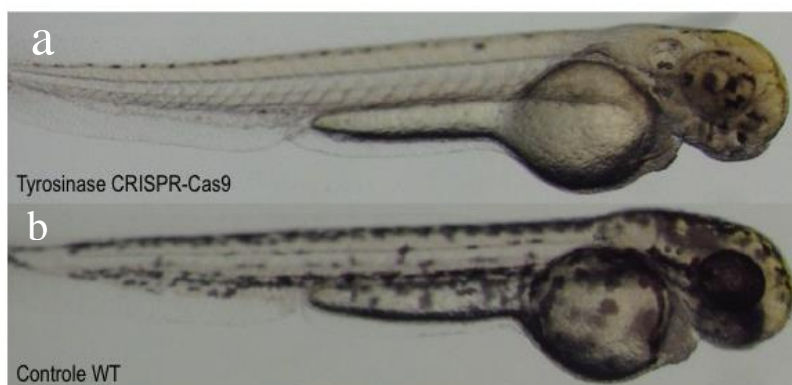
Alvo	Exon alvo	Eficiência	Data
<i>GSK3B</i>	Exon 2	6/10	20/12/2016
<i>MAPT A</i>	Exon 2	4/10	21/12/2016
<i>MAPT B</i>	Exon 1	5/10	27/12/2016
<i>PSEN1</i>	Exon 1	6/10	27/12/2016
<i>PSEN2</i>	Exon 3	3/10	06/06/2017
<i>APPA</i>	Exon 1	3/10	06/09/2017
<i>APPB</i>	Exon 2	5/10	07/10/2017
<i>TYR</i>	Exon 1	8/10	20/12/2016

**Nota:** Eficiência representa número de animais sequenciados (n=10) contendo mutações.



Durante o desenvolvimento das linhagens, um controle adicional para a especificidade da solução de Cas9 RNAm e eficiência das etapas de síntese de sgRNA foi a escolha do gene *TYR*. Este gene codifica para a proteína tirosinase, que é responsável pela produção do pigmento melanina que dá ao zebrafish as listras pretas típicas. Portanto, um fenótipo esperado de um animal *knockout* para *TYR* seria albinismo, ou ausência de pigmentação. A Figura 11 ilustra o efeito da técnica para este alvo em larvas de 48h pós fertilização e confirma a especificidade. Na Figura 11a pode-se ver um animal com fenótipo albino, possuindo algumas pequenas manchas escuras, contendo melanina, no olho e ao longo de sua parte dorsal. Estas manchas indicam células onde o evento de modificação do DNA não causou o fenótipo esperado, gerando animais mosaico. A Figura 11b apresenta um animal controle com deposição de melanina ao longo do corpo.

**Figura 11. Comparação entre controle e CRISPR-Cas9 para *TYR***



**Nota:** Comparação entre larvas de *zebrafish* de 48 hpf. O animal em (a) foi injetado com componentes de CRISPR-Cas9 para o gene *TYR*, resultando em um fenótipo albino. Pequenas manchas podem ser vistas ao redor dos olhos e ao longo da parte superior do corpo, indicando mosaicismo. Animal (b) representa um controle não injetado.

Os animais injetados com preparações para geração das diferentes linhagens foram mantidos em aquários com recirculação de água (Zebtec) até a maturidade sexual. Os animais F0 foram novamente sequenciados utilizando-se dessa vez um corte na nadadeira caudal para coleta de amostra. Aqueles animais cujo resultado do sequenciamento indicou a existência de mutações nos genes alvo foram isolados e classificados individualmente. Após este período, eles foram reproduzidos com animais selvagens (WT, do inglês *wild-type*) para a obtenção da linhagem F1 heterozigótica de cada alvo. A prole F1 também foi sequenciada e analisada. Até esta etapa, não foram observadas alterações de desenvolvimento, morfológicas e

comportamentais em nenhuma das linhagens. Os animais F1 também foram sequenciados através da nadadeira caudal para coleta de amostra. Foram selecionados para esta etapa os animais F1 para *GSK3B*, *PSENI*, *APPA* e *APPB*. Ao sequenciar 10 animais de cada grupo F1, verificamos a presença de mutação em aproximadamente 30%. Estes animais foram isolados e classificados individualmente para atingir a maioridade sexual.

Este projeto encontrou dificuldades repetidas na identificação dos animais que apresentavam mutações na F1 e no posterior cruzamento entre F1 x F1, quando a prole resultante (F2) repetidamente não apresentou mutações identificáveis. Uma vez que a mortalidade dos embriões estava dentro da normalidade para a espécie, supomos que as mutações não eram letais e estariam eliminando a população de embriões homozigóticos. Pretende-se retomar o processo de cruzamentos e sequenciamentos destes animais para a obtenção das linhagens homozigóticas nulas para os genes propostos.

# CAPÍTULO 4

## **5. Considerações Finais**

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Doença de Alzheimer (DA), mesmo identificada há mais de cem anos, permanece como um complexo mistério. Na última década, os esforços em compreender a biologia básica da doença, bem como uma abordagem multidisciplinar envolvendo áreas como evolução, biologia molecular, imunologia e até microbiologia permitiram o surgimento de novas compreensões acerca dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Desvendar a função biológica de genes presentes e altamente conservados em espécies com histórias evolutivas tão distintas deve ser a prioridade no estudo de doenças complexas humanas. Este projeto se propôs a contribuir com o entendimento da DA e seus mecanismos moleculares através do estudo de formas oligoméricas de  $A\beta_{42}$  injetadas no cérebro de *zebrafish* de diferentes idades e da utilização da técnica CRISPR-Cas9 para geração de animais homozigóticos nulos para genes relacionados com a doença.

A injeção CV de diferentes soluções  $A\beta_{42}$  em animais adultos jovens e velhos impactou de forma específica o comportamento dos animais em relação a seus respectivos controles. Animais velhos injetados com O e P apresentaram déficit de locomoção no experimento de tanque novo em relação a M e controle 7 dias pós injeção (dpi), enquanto os jovens não demonstraram nenhuma alteração nesta tarefa. No experimento Y-Maze, realizado 14 dpi, não se foram observadas alterações estatisticamente significantes na memória de curta-duração entre os grupos de diferentes idades e seus respectivos controles. Porém, nesta tarefa percebe-se uma alteração no padrão exploratório de animais velhos e jovens injetados com O e P. Aos 21 dpi, os animais tiveram sua capacidade de aprendizado e formação de memórias de longa-duração avaliados na tarefa de esQUIVA inibitória e ambos os grupos de diferentes idades (adultos jovens e velhos) demonstraram aprendizado reduzido quando injetados com O e P, mas não M, em relação aos seus controles. Estes resultados indicam que monômeros  $A\beta_{42}$  não induzem déficit cognitivo, enquanto as formas oligoméricas e protofibrilares causam efeitos, evidentes aos 7dpi em animais velhos, o que está de acordo com a literatura que sugere que monômeros possuam função fisiológica e neuroprotetora. A resistência dos animais adultos jovens ao prejuízo observado em animais idosos pode decorrer da eficiência de efetuar *clearance* de  $A\beta$ , uma vez que animais velhos tem esta capacidade reduzida (94). Além disso, é interessante observar que as formas de  $A\beta_{42}$  testadas enriquecidas em oligômero e protofibrilas tem efeitos deletérios sobre o comportamento e cognição, em tempos específicos. Nesse contexto, a solução oligomérica induziu déficits a partir de 7 dpi, enquanto a solução

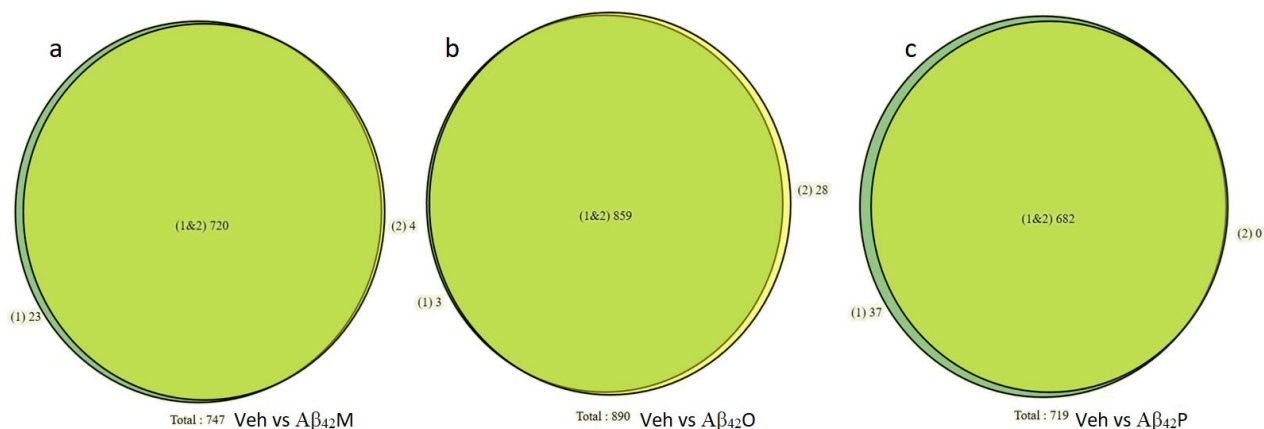
protofibrilar teve efeitos evidentes a partir de 14dpi. Este tipo de padrão de atraso de efeito causado por injeção CV de solução protofibrilar já foi observado também em ratos (95).

A análise proteômica de amostras de tecido encefálico dos animais já demonstram resultados significativos, que serão ampliados já que as corridas de amostras de animais jovens estão em andamento. Por este motivo, este trabalho e o artigo no capítulo 2 contém atualmente apenas dados relativos aos grupos velhos, que serão discutidos de forma ampla a seguir, bem como os desafios técnicos encontrados nesta análise.

Para os animais velhos, foram encontradas aproximadamente 900 proteínas para o grupo Veículo seguindo o critério estabelecido de presença em três das três amostragens experimentais. Este critério foi escolhido para que se diminuísse a chance de resultados espúrios. Outros trabalhos encontraram até 4000 proteínas (96). Esta discrepância pode decorrer de diferenças entre protocolos e aparelho utilizado. Além disso, um obstáculo encontrado e que já foi contornado é a identificação correta de peptídeos que receberam adição de grupamentos fosfato e modificações pós-traducionas. Esta modificação permite que proteínas que são notoriamente alteradas, como a Tau, sejam corretamente identificadas nas corridas.

As comparações do perfil de proteínas encontrado nos encéfalos de animais injetados geraram resultados comparativos interessantes e que sustentam a qualidade da análise realizada, com 720 proteínas compartilhadas pelos grupos monômero e veículo (Figura 12a), 859 por oligômero e veículo (Figura 12b) e 682 por protofibrila e veículo (Figura 12c).

**Figura 12. Diagrama de Venn de proteínas encontradas**



Nota: Número total de proteínas, quando comparadas com Veh. Em verde as proteínas encontradas no veículo, em amarelo as proteínas encontradas em comum nos grupos experimentais.

Não foram detectadas as proteínas PSEN1, PSEN2 e APP nas amostras testadas. Isso provavelmente deve-se ao fato de serem proteínas de membrana que são reconhecidas desafiadoras para estudo em espectrometria de massa (97). As proteínas GSK3 $\beta$  e Tau não passaram no critério de presença nas três corridas realizadas no Veículo, e, por consequência, não foram incluídas nas comparações. O peptídeo A $\beta$ <sub>42</sub> também não foi detectado em nenhum dos grupos injetados, o que pode estar ocorrendo devido à sua propensão a agregar em formas insolúveis (98) e associar-se à membrana (99), tendo possivelmente sido eliminado no processo de preparação de amostras para os experimentos.

Embora estas proteínas classicamente associadas à DA não tenham sido detectadas, várias proteínas relacionadas com um cenário neurodegenerativo e processos celulares que sugerem alterações importantes foram identificadas. Estas proteínas foram organizadas em categorias, baseando-se na sua função e relevância para este modelo, como neurotransmissão; metabolismo, incluindo proteínas com função de síntese e transporte de moléculas; Função mitocondrial; Sistema imune e espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS). Para isso ordenamos aquelas proteínas cujos grupos tratados apresentavam modificações em maiores proporções em relação ao controle, tanto quando a quantidade observada era reduzida quanto aumentada pela injeção de A $\beta$ <sub>42</sub> e discutimos sua relevância em detalhe a seguir. No grupo de proteínas de Neurotransmissão foram incluídas proteínas com função associada à manutenção da estrutura do neurônio e suas projeções sinápticas, processamento e exocitose de vesículas. Adicionalmente, considerando que a inflamação tem sido tratada como um aspecto chave no estudo da DA (100,101), proteínas com funções no sistema imune e na resposta inflamatória foram agrupadas.

A discussão dos resultados de Espectrometria de Massa é complexa, visto que as proteínas não estão presentes em todos os grupos e a não detecção não significa necessariamente ausência completa no tecido amostrado e sim limitações da técnica e análise desenvolvida. Um desafio encontrado ao se trabalhar com os resultados proteômicos obtidos foi o banco de dados de proteínas de *zebrafish* (ID UP000000374, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Este banco possui muitas anotações incorretas e duplicadas, além de proteínas hipotéticas sem função definida, o que torna o processo de análise mais demorado, uma vez que cada proteína precisa ser verificada manualmente, a fim de se evitar duplicações e estimativas de variação incorretas. Além disso, estes resultados devem ser analisados de forma integrada, utilizando-se de ferramentas *on-line* para relacionar a função gênica, por exemplo.

Como perspectivas, acreditamos que o prosseguimento das análises proteômicas para avaliação global dos níveis de proteínas marcadoras e relacionadas com inflamação, morte

neuronal, perda sináptica e ciclo celular seja fundamental. A utilização de outro protocolo de extração de proteínas, que favoreça as proteínas de membrana e um tempo maior de corrida talvez permita a detecção de mais alvos de interesse, uma vez que o tecido encefálico é uma amostra complexa. A realização de histologia do tecido cerebral também poderia vir a corroborar as diferenças comportamentais encontradas, com a identificação do conteúdo de A $\beta$  nos tecidos. Para tal, pretendemos utilizar o corante Vermelho Congo, conhecido corante com alta especificidade por A $\beta$  (102) em cortes histológicos já prontos de animais de todos os grupos experimentais avaliados neste estudo. A microscopia eletrônica de transmissão também poderia contribuir para caracterização das soluções em estados oligoméricos *in vitro* e em encéfalos injetados. A injeção CV de peptídeos de mais de um tamanho simultaneamente ou marcados com um fluoróforo, como A $\beta$ <sub>40</sub>, também poderia ajudar a elucidar como este peptídeo pode estar sendo metabolizado ou transportado, uma vez que o processo de *clearance* também parece ser chave para determinar a progressão da DA.

Como perspectiva para a técnica de CRISPR-Cas9, uma vez que é extremamente recente e constantemente atualizada, uma nova versão da Cas9 com maior especificidade e eficiência (89) poderia ser utilizada para os alvos aqui apresentados ou até mesmo novos alvos. Estes modelos, quando associados com outras técnicas, como CV de A $\beta$ , morfolidos ou exposição a fármacos, podem permitir um entendimento da função e relação entre os genes e este peptídeo.

## REFERÊNCIAS

1. Dementia - World Health Organization [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Voisin T, Vellas B. Diagnosis and treatment of patients with severe Alzheimer's disease. Vol. 26, *Drugs and Aging*. 2009. p. 135–44.
3. Li H, Liu CC, Zheng H, Huang TY. Amyloid, tau, pathogen infection and antimicrobial protection in Alzheimer's disease -conformist, nonconformist, and realistic prospects for AD pathogenesis. *Transl Neurodegener*. 2018;7(1):1–16.
4. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017;390(10113):2673–734.
5. Blennow K, Leon MJ de, Zetterberg H. Alzheimer 's Disease. *Lancet*. 2006;(368):387–403.
6. International Alzheimer's Disease. World Alzheimer Report 2019. Alzheimer's Disease International. 2019.
7. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*. 2012;148(6):1204–22.
8. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer ' s Disease : The Challenge of the Second Century. *Sci Transl Med*. 2011;3(77):1–35.
9. Cummings J, Reiber C, Kumar P. The price of progress: Funding and financing Alzheimer's disease drug development. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2018;4:330–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.04.008>
10. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, et al. Disease : an Appraisal From 1984 To 2014. 2015;275(3):251–83.
11. Torti FM, Gwyther LP, Reed SD, Friedman JY, Schulman KA. A multinational review of recent trends and reports in dementia caregiver burden. Vol. 18, *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 2004. p. 99–109.
12. Liu S, Li C, Shi Z, Wang X, Zhou Y, Liu S, et al. Caregiver burden and prevalence of depression, anxiety and sleep disturbances in Alzheimer's disease caregivers in China. *J Clin Nurs*. 2017;26(9–10):1291–300.
13. Regeur L, Jensen GB, Pakkenberg H, Evans SM, Pakkenberg B. No global neocortical nerve cell loss in brains from patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Neurobiol Aging*. 1994;15(3):347–52.
14. Raskin J, Cummings J, Hardy J, Schuh K, Dean R. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(8):712–22.
15. Lagarde J, Sarazin M, Bottlaender M. In vivo PET imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2018;125(5):847–67.
16. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med*. 2018;284(6):643–63.
17. Paraskevasidi M, Morais CLM, Freitas DLD, Lima KMG, Mann DMA, Allsop D, et al. Blood-based near-infrared spectroscopy for the rapid low-cost detection of Alzheimer's disease. *Analyst*. 2018;143(24):5959–64.
18. Gomez W, Morales R, Maracaja-Coutinho V, Parra V, Nassif M. Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(1):1011–33.
19. Nie R, Wu Z, Ni J, Zeng F, Yu W, Zhang Y, et al. Porphyromonas gingivalis Infection Induces Amyloid- $\beta$  Accumulation in Monocytes/Macrophages. *J Alzheimer's Dis*. 2019 Oct 1;1–16.
20. Snider BJ, Norton J, Coats MA, Chakraverty S, Hou CE, Jervis R, et al. Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with lewy bodies in the third decade of



- life. *Arch Neurol*. 2005;62(12):1821–30.
21. Alzheimer's Society. Alzheimer's disease and genes [Internet]. [cited 2019 Dec 12]. Available from: <https://www.alzheimers.org.uk/about-dementia/risk-factors-and-prevention/alzheimers-disease-and-genes>
  22. Wallon D, Rovelet-lecrux A, Richard A, Pasquier F, Lacour M, Rollin-sillaire A, et al. APP , PSEN1 , and PSEN2 mutations in early- onset Alzheimer disease : A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017;1:1–16.
  23. Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10):1–10.
  24. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of Ab oligomers. *FEBS J*. 2010;277(6):1348–58.
  25. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T. Neprilysin and A $\beta$  clearance: Impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2013;5(DEC):1–27.
  26. Luo Y, Bolon B, Damore M a., Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, et al. BACE1 ( $\beta$ -secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol Dis*. 2003;14(1):81–8.
  27. Urbanc B, Cruz L, Yun S, Buldyrev S V., Bitan G, Teplow DB, et al. In silico study of amyloid  $\beta$ -protein folding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50):17345–50.
  28. Nirmalraj PN, List J, Battacharya S, Howe G, Xu L, Thompson D, et al. Complete aggregation pathway of amyloid  $\beta$  (1-40) and (1-42) resolved on an atomically clean interface. *Sci Adv*. 2020;6(15).
  29. Qiu T, Liu Q, Chen YX, Zhao YF, Li YM. A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40: similarities and differences. *J Pept Sci*. 2015;21(7):522–9.
  30. Sarroukh R, Cerf E, Derclaye S, Dufrêne YF, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, et al. Transformation of amyloid  $\beta$ (1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(8):1429–38.
  31. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2018;12(JAN).
  32. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(3):349–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3028>
  33. Acx H, Serneels L, Radaelli E, Muylldermans S, Vincke C, Pepermans E, et al. Inactivation of  $\gamma$ -secretases leads to accumulation of substrates and non-Alzheimer neurodegeneration. *EMBO Mol Med*. 2017;9(8):1088–99.
  34. Kummer MP, Heneka MT. Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Res Ther*. 2014;6(3):1–9.
  35. Glenner, G. and Wong WC. Alzheimer's disease and Down's syndrome sharing a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122(3):1131–5.
  36. Li ZW, Stark G, Götz J, Rüllicke T, Müller U, Weissmann C. Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):6158–62.
  37. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, et al. B-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity. *Cell*. 1995;81(4):525–31.
  38. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, et al. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid

- precursor protein family members. *J Neurosci*. 2000 Nov 1;20(21):7951–63.
39. Lingala SM, Ghany MGMMhs. Somatic APP gene recombination and mutations occur mosaically in normal and Alzheimer's disease neurons. *Nature*. 2018;25(3):289–313.
  40. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*. 2005;280(17):17294–300.
  41. Paula-lima AC, Hidalgo C. Amyloid B-peptide oligomers, ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release, and Wnt-5a/Ca<sup>2+</sup> signaling: opposing roles in neural mitochondrial dynamics? *Front Mol Neurosci*. 2013;7(July).
  42. Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA. Amyloid- $\beta$  peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2010;30(27):9166–71. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/30/27/9166>
  43. Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM. A $\beta$  inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging*. 2008;29(11):1607–18.
  44. Ferreira ST, Klein WL. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. Vol. 96, *Neurobiology of Learning and Memory*. 2011. p. 529–43.
  45. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499–509.
  46. Moir RD, Lathe R, Tanzi RE. The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2018;14(12):1602–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.3040>
  47. Arboleda-Velasquez JF, Lopera F, O'Hare M, Delgado-Tirado S, Marino C, Chmielewska N, et al. Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nat Med*. 2019 Nov 1;25(11):1680–3.
  48. Castello F, Paredes JM, Ruedas-Rama MJ, Martin M, Roldan M, Casares S, et al. Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40065>
  49. Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fa M. The aggregation kinetics of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. 2005;1753–9.
  50. Novo M, Freire S, Al-Soufi W. Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- $\beta$  (1-42) oligomers. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):3–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19961-3>
  51. Zhang X, Fu Z, Meng L, He M, Zhang Z. The Early Events That Initiate  $\beta$ -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10(November):1–13.
  52. G B. OLIGOMER PROTEINS RESPONSIBLE FOR ALZHEIMER'S DISEASE, SAYS RESEARCH GROUP [Internet]. Putnam Ridge. 2018. Available from: <https://putnamridge.com/oligomer-proteins-responsible-alzheimers/>
  53. Chen Y, Tang BL. The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(1):1–5.
  54. Kobayashi N, Masuda J, Kudoh J, Shimizu N, Yoshida T. Binding sites on tau proteins as components for antimicrobial peptides. *Biocontrol Sci*. 2008;13(2):49–56.
  55. Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimer's Dis*. 2013;33(SUPPL. 1).
  56. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, et al. Inhibition of glycogen

- synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 [cited 2016 Aug 17];102(19):6990–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867159>
57. Bai Q, Burton EA. Zebrafish models of Tauopathy. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011. p. 353–63.
  58. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. Vol. 5, *Frontiers in Genetics*. 2014.
  59. Zhang F, Gannon M, Chen Y, Yan S, Zhang S, Feng W, et al.  $\beta$ -amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 $\beta$ /tau cascade. *Sci Transl Med*. 2020;6931(January):1–11.
  60. Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014;71(4):505–8.
  61. Seward ME, Swanson E, Norambuena A, Reimann A, Nicholas Cochran J, Li R, et al. Amyloid- $\beta$  signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in alzheimer's disease. *J Cell Sci*. 2013;126(5):1278–86.
  62. Götz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils. *Science* (80- ). 2001;293(5534):1491–5.
  63. Nery LR oesler, Eltz NS ilva, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN oriega, et al. Brain intraventricular injection of amyloid- $\beta$  in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PLoS One*. 2014;9(9):e105862.
  64. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* (80- ). 1992;256:184–5.
  65. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A  $\beta$  -induced synaptic dysfunction in Alzheimer ' s disease. 2014;1–12.
  66. Moir RD, Tanzi RE. Low Evolutionary Selection Pressure in Senescence Does Not Explain the Persistence of A $\beta$  in the Vertebrate Genome. *Front Aging Neurosci*. 2019 Mar 28;11.
  67. Tharp WG, Sarkar IN. Origins of amyloid- $\beta$ . *BCM Genomics*. 2013;34(10):779–81.
  68. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):1–10.
  69. Eimer WA, Kumar D, Kumar V, Kumar N, Shanmugam N, Rodriguez AS, et al. Alzheimer's Disease-Associated  $\beta$ -Amyloid Is Rapidly Seeded by Herpesviridae to Protect against Brain Infection. *Neuron* [Internet]. 2018;99(1):56–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6075814/pdf/nihms-982565.pdf>
  70. Kumar DKV, Choi HS, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, et al. Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(340).
  71. Nicolas W. Cortes-Penfield, Barbara W. Trautner RJ. Amyloid- $\beta$  Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(340):139–48.
  72. Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR. The physiological roles of amyloid- $\beta$  peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10(APR):1–16.
  73. Bishop GM, Robinson SR. The amyloid hypothesis: Let sleeping dogmas lie? *Neurobiol Aging*. 2002;23(6):1101–5.
  74. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(1):101–15.
  75. Mohammad D, Chan P, Bradley J, Lanctôt K, Herrmann N. Acetylcholinesterase

- inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf* [Internet]. 2017;16(9):1009–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14740338.2017.1351540>
76. Van Marum RJ. Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2009;5(1):237–47.
  77. Graham J, Lieschke, Peter D. Currie. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat Rev*. 2007;8.
  78. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*. 2008;83(1):13–34.
  79. Howe K, Clark MDM, Torroja CFC, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 17 [cited 2016 Aug 14];496(7446):498–503. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12111>
  80. Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*. 1998;392:919.
  81. Catchen JM, Braasch I, Postlethwait JH. Conserved synteny and the zebrafish genome [Internet]. Third Edit. Vol. 104, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc.; 2011. 259–285 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00015-X>
  82. Koehler D, Williams FE. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. Vol. 13, *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 1538–41.
  83. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov*. 2018;4(1).
  84. Parker MO, Brock AJ, Walton RT, Brennan CH. The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. *Front Neural Circuits*. 2013;7(MAR).
  85. Kizil C, Iltzsche A, Kaslin J, Brand M. Micromanipulation of gene expression in the adult zebrafish brain using cerebroventricular microinjection of morpholino oligonucleotides. *J Vis Exp*. 2013;(75):1–6.
  86. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
  87. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing , regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014;32(4):347–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842>
  88. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Shengdar Q, Sander JD, et al. Efficient In Vivo Genome Editing Using RNA-Guided Nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):227–9.
  89. Bai H, Liu L, An K, Lu X, Harrison M, Zhao Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish. *BMC Genomics*. 2020;21(1):1–12.
  90. Vejnar CE, Moreno-Mateos MA, Cifuentes D, Bazzini AA, Giraldez AJ. Optimized CRISPR-Cas9 system for genome editing in zebrafish. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(10):856–70.
  91. Jao L-E, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(34):13904–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3752207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  92. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res* [Internet].

- 2016;44(May):W272–W276. Available from:  
<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkw398>
93. Jao L-E, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(34):13904–9.
  94. Wildsmith KR, Holley M, Savage JC, Skerrett R, Landreth GE. Evidence for impaired amyloid  $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimer's resea*. 2013;5(3).
  95. O'Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, Ghilardi JR, Finke MP, Kuskowski MA, et al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A $\beta$ ((1-42)). *Brain Res*. 1999;815(1):1–10.
  96. Hogl S, Van Bebber F, Dislich B, Kuhn PH, Haass C, Schmid B, et al. Label-free quantitative analysis of the membrane proteome of Bace1 protease knock-out zebrafish brains. *Proteomics*. 2013;13(9):1519–27.
  97. Schey KL, Grey AC, Nicklay JJ. Mass Spectrometry of Membrane Proteins: A Focus on Aquaporins. *Biochemistry*. 2015;176(3):139–48.
  98. Rangachari V, Moore BD, Reed DK, Sonoda LK, Bridges AW, Conboy E, et al. Amyloid- $\beta$ (1-42) rapidly forms protofibrils and oligomers by distinct pathways in low concentrations of sodium dodecylsulfate. *Biochemistry*. 2007;46(43):12451–62.
  99. Fabiani C, Antollini SS. Alzheimer's disease as a membrane disorder: Spatial cross-talk among beta-amyloid peptides, nicotinic acetylcholine receptors and lipid rafts. *Front Cell Neurosci*. 2019;13(July):1–28.
  100. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2018;4:575–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
  101. Lee CYD, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm*. 2010;117(8):949–60.
  102. Frid P, Anisimov S V., Popovic N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007;53(1):135–60.

## ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



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

Ofício 106/2015 - CEUA

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

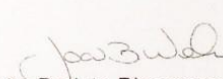
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00485 intitulado **“Sistema de edição genômica CRISPR-Cas9 em zebrafish para desenvolvimento de modelos complementares da doença de Alzheimer: identificação de mecanismos e envolvimento da via Wnt”**.

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
9.000	Danio rerio	12/2015 – 12/2018

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  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## **ANEXO B – RESULTADOS BRUTOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA**

# A $\beta$ <sub>42</sub>M vs Veh

## Downregulated

Name	Metabolism	Uniprot	Fold
Glutamine synthetase	glutamine biosynthetic process	Q7ZVF2	3,076
Glutathione S-transferase pi	glutathione metabolic process	Q9DDU5	1,493
Creatine kinase, brain a (Fragment)	phosphocreatine biosynthetic process	B8JJ23	1,885
Ckmt1 protein	phosphocreatine biosynthetic process	Q7ZUN7	1,867
Glutathione S-transferase pi	glutathione metabolic process	Q50LC6	1,827
S100 calcium-binding protein, beta (neural)	calcium / zinc ion binding	Q6DGT8	1,724
Phosphoglycerate mutase	glycolytic process	Q7SZR4	3,697
Triosephosphate isomerase	gluconeogenesis	A0A0R4IGG3	1,56
Inorganic pyrophosphatase 1b	phosphate-containing compound metabolic process	B7ZD39	2,652
Glutamine synthetase	glutamine biosynthetic process	A0A2R8QG82	2,593

Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
Peptidylprolyl isomerase	motor neuron axon guidance / regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	Q642J1	4,758
Dihydropyrimidinase-like 4	neuron projection guidance	A0A0R4IYX8	1,506
Coactosin-like 1	regulation of actin filament polymerization	Q6PFT7	2,208
Dihydropyrimidinase-like 5a	axon guidance	A0A2R8Q5K7	2,196
RAB3A, member RAS oncogene family, b	regulation of exocytosis	Q5RGB5	2,006
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, beta a	synaptic transmission, glutamatergic	E7FE03	1,864
Dynein light chain	microtubule-based process	Q6PBH4	2,657
Synaptophysin a	exocitose / regulation of short-term neuronal synaptic plasticity	B0S5B9	6,583
Rho-related GTP-binding protein RhoA-A	actin filament organization / shape / migration	Q6NUX8	3,227
F-actin-capping protein subunit alpha	actin cytoskeleton organization	A0A0R4IEP3	1,92
Tubulin alpha chain		Q6PC95	1,743
Transferrin-a	Since the transferrin receptor can be considered a marker of neuronal metabolism	X1WE71	2,13

Name	Immune System/ ROS	Uniprot	Fold
Gnb11 protein	positive regulation of neutrophil migration	Q803H5	2,772



Guanine nucleotide-binding  
protein G(I)/G(S)/G(T)  
subunit beta-1  
A0A2R8RKX9

positive regulation of neutrophil  
migration

Q6PH57 2,715

## Upregulated

Name	Metabolism	Uniprot	Fold
Visinin-like 1b Si:dkey- 30j22.11	calcium ion binding	Q5TZ35	1,47
Fatty acid- binding protein 7	calcium ion binding	F6NI63	1,58
Brain-type fatty acid- binding protein	lipid binding	F8W3N3	1,51
			-
	lipid binding	Q9I8N9	1,52

Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a	pos sinapse	A2ATX5	1,45

Name	Mitochondria	Uniprot	Fold
ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein Cox5aa protein	Mitochondria	Q6DRD1	2,48
ATP synthase F1 subunit delta	Mitochondria	Q4VBU7	2,52
			-
	Mitochondria	Q1LVG7	2,97

Name	Immune System/ ROS	Uniprot	Fold
Apolipoprotein C	lipoprotein metabolic process	E9QDI1	-3,2
NSFL1 (p97) cofactor (p47	autophagosome assembly	F1Q8D2	2,35
Peroxioredoxin 1	removal of superoxide radicals / response to oxidative stress	A2AWE1	1,64

# A $\beta$ <sub>42</sub>O vs Veh

## Downregulated

Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
F-actin-capping protein subunit alpha A0A0R4IEP3	actin cytoskeleton organization vesicle-mediated transport	A0A0R4IEP3	1,982
Dynein light chain	microtubule-based process	Q6PBH4	2,029
Profilin	positive regulation of actin filament bundle assembly	Q7ZVJ0	2,347
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	regulation of apoptotic process / cerebellar development and synaptogenesis neurofilament bundle assembly	Q6NUW5	1,856

Name	Metabolism	Uniprot	Fold
Ckmb protein	phosphocreatine biosynthetic process	Q7T306	1,508

## Upregulated

Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	motor neuron axon guidance / regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	A0A0G2KNY9	-1,97
Synuclein, gamma b (breast cancer-specific protein 1)	neurofilament network integrity. Mapk	A0A2R8RP85	-1,53

Name	Metabolism	Uniprot	Fold
High mobility group box 2b		Q66IB6	-2,51
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	contributes to the survival of cells after DNA damage	Q6PEH5	-1,66
Cellular retinoic acid-binding protein 1a	retinoic acid binding	E9QD41	-1,92

Name	Mitochondria	Uniprot	Fold
Cytochrome c oxidase subunit	Mitochondria	Q6DH63	-1,83
ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein	Mitochondria	Q6DRD1	-1,77

# A $\beta$ <sub>42</sub>P vs Veh

## Downregulated

Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
Peptidylprolyl isomerase	motor neuron axon guidance / regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	Q642J1	2,197
Tubulin beta chain		A0A0R4IXC8	1,698
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, beta a	synaptic transmission, glutamatergic excitose / regulation of short-term neuronal synaptic plasticity	E7FE03	2,255
Synaptophysin a	Since the transferrin receptor can be considered a marker of neuronal metabolism	B0S5B9	13,36
Transferrin-a (Fragment)		X1WE71	2,824
Tubulin alpha chain		Q6PC95	1,374
VAMP/synaptobrevin	vesicle fusion	Q6PBJ3	2,865
Rab GDP dissociation inhibitor	vesicle-mediated transport	A0A2R8RLZ9	1,302
4-aminobutyrate aminotransferase	gamma-aminobutyric acid catabolic process	I3IRW7	1,896
Glycoprotein M6Ab	neuron projection development	F8W2C7	3,144
Rab GDP dissociation inhibitor	vesicle-mediated transport	A2AR68	1,354
Sodium/potassium- transporting ATPase subunit beta	establishment or maintenance of transmembrane electrochemical gradient	Q9DGL2	1,533

Name	Metabolism	Uniprot	Fold
Glutamine synthetase	glutamine biosynthetic process	A0A2R8QG82	1,682
Serotransferrin	iron ion homeostasis	B8JL43	1,761
Glutathione S-transferase omega 1	oxidation-reduction process	F1QN72	4,445
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	unfolded protein binding	Q6PC53	1,835
Amino acid transporter	symporter activity	A0A0R4IGM0	1,684
Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin)	negative regulation of endopeptidase activity	Q5SPJ4	1,89
Glutamine synthetase	glutamine biosynthetic process	Q7ZVF2	1,935
Glutathione S-transferase pi	glutathione metabolic process	Q9DDU5	1,786
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1,-like	negative regulation of endopeptidase activity	Q5SPJ1	1,565

Name	Immune System/ ROS	Uniprot	Fold
Gnb11 protein	positive regulation of neutrophil migration	Q803H5	2,007
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	positive regulation of neutrophil migration	Q6PH57	1,965
Name	Mitochondria	Uniprot	Fold
Citrate synthase, mitochondrial	mitochondrial	Q7ZVY5	1,479

## Upregulated

Name	Mitochondria	Uniprot	Fold
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, Zgc:86599	metabolismo energetico mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	Q6NV33 F1RCH5	-1,83 -2,22
Acbd7 protein	Mitochondrial Fatty Acid Beta-Oxidation	Q4V8S5	-2,9
Adenylate kinase isoenzyme 1	atp	A0A2R8RXT8	-2,16
Name	Neurotransmission	Uniprot	Fold
Si:dkey-276j7.1	citoesqueleto	E7FD23	-5
RAB11B, member RAS oncogene family, b	exocytosis	Q6DGU2	-1,6
Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha a	morphogenesis of neurons. structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton	A2ATX5	-1,64
Synuclein, gamma b	neurofilament network integrity. Mapk	A0A2R8RP85	-1,77
Tubulin polymerization promoting protein	positive regulation of protein polymerization	H9GXN3	-1,52
GLI pathogenesis-related 2,-like	crecimiento/mitose	Q5XJ73	-4,38
Name	Metabolism	Uniprot	Fold
Cystatin 14a, tandem duplicate 1		E7EYW5	-3,01
Cystatin 14a, tandem duplicate 2	protease inhibitor	A7MCL7	-3,22
Creatine kinase, brain b	processo metabolico	R4GDX0	-1,65
Heat shock 10 protein 1	chaperone cofactor-dependent protein refolding	Q6IQI7	-1,55
Tagln3 protein	Platelet degranulation	A2BEV4	-1,92

