

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

LAURA ROESLER NERY

**Caracterização de Modelos de Experimentação Baseados na
Doença de Alzheimer em *Zebrafish***

Porto Alegre
2015

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

LAURA ROESLER NERY

**Caracterização de Modelos de Experimentação Baseados na
Doença de Alzheimer em *Zebrafish***

Porto Alegre

2015

LAURA ROESLER NERY

**Caracterização de Modelos de Experimentação Baseados na
Doença de Alzheimer em *Zebrafish***

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Monica Ryff M. R. Vianna

Porto Alegre

2015

*Aos meus pais que dedicaram a vida a me ensinar e educar,
E ao meu irmão, cujo amor e carinho são indescritíveis.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus peixinho, que além de serem a inspiração desta tese, me fazem companhia a sete anos e me proporcionam a cada dia mais conhecimento e respeito a vida.

Agradeço à minha orientadora, e mais do que tudo amiga, Mônica Vianna, que sempre me apoiou nos mais diversos e malucos projetos, me deu liberdade para decidir qual caminho tomar na minha formação científica e dividiu comigo momentos de felicidade e carinho.

Agradeço à minha melhor amiga e irmã do coração Aline Michalski, que a pesar de entender muito pouco do meu trabalho, escutou minhas reclamações e explicações sobre biologia do desenvolvimento, evolução e genética, principalmente nas ultimas semanas.

Agradeço também às minhas amigas e colegas do laboratório, Fernanda Zimmermann, Josiane Bortolotto e Stefani Altenhofen pelas idas ao cinema e shopping nos momentos mais críticos, por aguentarem as minhas revoltas e por terem me dado todo o apoio durante o doutorado sanduiche e terem mantido a minha sanidade. Obrigada flores, não tenho palavras para agradecer o que fizeram por mim!

As meninas Natália Eltz, Cristiana Hackmann e Raphaela Fonseca, minhas colegas de trabalho, parceiras e companheiras de finais de semana. Obrigada por terem me ajudado em todos os momentos durante estes três anos e meio.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Fabiano, que me acompanharam durante o mestrado e o doutorado, obrigada pelo companheirismo e amizade.

Mas quero agradecer principalmente a minha família, que dividiu comigo as angustias de decidir quais passos dar e me apoiou em todas as minhas decisões, principalmente no ano em que passei longe de casa. À minha mãe pelo amor dedicado a mim e pelos ensinamentos de vida que me foram passado. Ao meu pai, meu porto seguro, que dedicou a vida a dar a mim e ao meu irmão um exemplo de ética e perseverança. Meu irmão pelos abraços e beijos. E ao Otoniel, que me recebeu de coração aberto na vida dele.

Agradeço a minha Oma e meu Opa, que me apoiaram a vida toda e os quais amo mais do que tudo.

À todos que estiveram comigo durante esta caminha, meu muito muito obrigada!

What we know is a drop, what we don't know is an ocean.

Isaac Newton

RESUMO

Novos modelos para o estudo de doenças neurodegenerativas são necessários para a caracterização dos mecanismos moleculares e comportamentais envolvidos na progressão de demências como a Doença de Alzheimer (DA), além de serem importantes para a identificação de novos alvos com potencial terapêutico. Aqui caracterizamos quatro abordagens neurodegenerativas incluindo: (1) A injeção do peptídeo β -amilóide(1-42), uma dos principais peptídeos alterados em pacientes com DA. Neste modelo observamos que a injeção de oligômeros solúveis de β -amilóide no ventrículo cerebral de embriões de 24hpf causou um aumento na fosforilação da proteína tau em resíduos de estágios iniciais da DA acompanhados por déficit cognitivo aos 5dpf, ambos revertidos pelo tratamento com Lítio, inibidor da enzima GSK-3 β que fosforila tau. (2) Realizamos também a inibição do *splicing* do éxon 8 da proteína Presenilina-1, membro do complexo gama-secretase que é responsável pela clivagem da Proteína Precursora do Amilóide (APP), através do bloqueio com oligonucleotídeos Morfolinos. Esta abordagem causou uma alteração na funcionalidade da Presenilina-1, característica de pacientes com a forma familiar da DA, comprometendo a cognição dos animais e ocasionando alterações morfológicas similares às causadas pela modificação da via Notch. Também realizamos a produção de dois animais transgênicos, o primeiro (3), superexpressando a proteína β -amilóide através de um promotor *heat-shock*. Estes animais quando expostos a uma temperatura de 37°C ativam a expressão das proteínas *heat-shock* e por consequência a expressão da proteína β -amilóide, que como dito anteriormente é uma das principais alterações em pacientes com a DA. O segundo (4), inibindo a expressão da APP através da técnica de manipulação genética utilizando TALEN. Este último modelo irá fornecer informações importantes sobre a participação desta proteína durante desenvolvimento e a progressão da DA. Estes quatro modelos abrangem

características que sugerem que, quando usados separadamente ou em combinação, poderão contribuir tanto na elucidação de mecanismos celulares e moleculares associados a déficits cognitivos quanto nas interações destas vias com a DA. A possibilidade de desenvolver modelos complementares com abordagens diversas em um mesmo organismo confirma o potencial do *zebrafish* não só para o entendimento da participação destas proteínas no processo neurodegenerativo mas também em suas funções normais no sistema nervoso.

Palavras-chave: *Zebrafish*; Doença de Alzheimer; neurodegeneração; β -amilóide; APP; Presenilina-1; tau.

ABSTRACT

New animal models for neurodegenerative diseases study are necessary for the knowledge of molecular mechanisms and behavioral patterns involved on the progression of dementias as Alzheimer's Disease (AD) as well as for new therapies development. We characterized four neurodegenerative approaches including: (1) β -amyloid(1-42) peptide injection, one of the hallmark proteins of patients with AD. In this model, we observed that intra-ventricular brain injection of β -amyloid soluble oligomers in 24hpf embryos caused an increase in tau phosphorylation followed by cognitive deficits at 5dpf, both results being reversed by Lithium treatment, a tau kinase (GSK-3 β) inhibitor. (2) The inhibition of exon 8 splicing of Presenilin-1, protein responsible for the Amyloid Precursor Protein (APP) cleavage, was achieved using Morpholino oligonucleotides. This approach caused a dysfunction of Presenilin-1, characteristic of patients with the familiar form of AD, that disturbed cognitive behavior and caused morphological phenotype similar to the ones observed by modifications of Notch pathway. We also developed two transgenic animals, (3) one overexpressing through a heat-shock promoter the β -amyloid protein. These animals when exposed to a temperature of 37°C activate the heat-shock protein expression and as a consequence amyloid- β protein, one of the hallmark proteins of AD. The second transgenic animal (4) we knocked-out the Appb gene using TALEN as a genetic manipulation technic. This model will provide a better understanding of Appb function during animal development and AD progression. Those four animal models include features suggesting that, when used separately or in combination, can hereafter elucidate those pathways interactions and clarify the cellular and molecular mechanism associated with cognitive deficits during Alzheimer's disease progression. With these models we were able to characterize zebrafish as a potential animal model, not just for understanding the role of those proteins over neurodegenerative process, but also on their normal functions in the system. Besides that, zebrafish have been

used for a few years in pharmacological tests, and the development of animal models for Alzheimer's disease as ours, make this animal a robust model for development of new treatments for this and other diseases.

Keywords: Zebrafish; Alzheimer Disease; Neurodegeneration; Amyloid-beta; APP; Presenilin-1; tau.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos

APP – Proteína Precursora do Amilóide

DA – Doença de Alzheimer

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

DPF – Dias Pós-Fertilização

FAD – Doença de Alzheimer Familiar

GSK-3 β – Glicogênio Sintase Quinase 3 β

HPF – Horas Pós-Fertilização

ISF – Fluido Intersticial

LiCl – Cloreto de Lítio

MO – Oligonucleotídeos morfolidos

RNA – Acido Ribonucleico

TALEN – *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*

WNT - *Wingless*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Doença de Alzheimer, múltiplos fatores e mecanismos neurodegenerativos	19
Figura 2 Proteína β -amilóide e diferentes receptores	21
Figura 3 Proteína Precursora do Amilóide e suas vias de processamento.....	23
Figura 4 Esquema ilustrativo do sistema TALEN.....	28
Figura 5 Compilação de géis de agarose para produção do TALEN	65
Figura 6 Curva de melting para verificação das mutações	66
Figura 7 Alinhamento realizado no programa Geneious.....	67
Figura 8 Produção de linhagens de <i>zebrafish knock-in</i> e <i>knock-out</i>	68
Figura 9 Esquema contendo o promotor <i>heat-shock</i>	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Doenças Neurodegenerativas	15
1.1.1	<i>Doença de Alzheimer.....</i>	<i>16</i>
1.1.1.1	Proteínas β-amilóide e tau no contexto da DA.....	17
1.1.1.2	Proteína Precursora do Amilóide e seu processamento proteolítico	21
1.1.2	<i>Modelos Animais da Doença de Alzheimer.....</i>	<i>24</i>
1.2	O teleósteo <i>Zebrafish</i>	25
1.2.1	<i>Modelos de Neurodegeneração em Zebrafish.....</i>	<i>26</i>
1.2.1.1	Injeções de morfolidos e RNA mensageiro.....	27
1.2.1.2	Utilização de TALEN para alteração genômica	28
1.3	Fármacos Neuroprotetores.....	29
1.3.1	<i>Lítio.....</i>	<i>30</i>
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivos Gerais	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	RESULTADOS	36
4.1	Capítulo 01	37
4.1.1	<i>Artigo Científico: Brain intraventricular injection of amyloid-β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium.....</i>	<i>37</i>
4.2	Capítulo 02	45

4.2.1	<i>Artigo Científico em preparação : Splicing inhibition of Presenilin 1 exon 8 alters aversive behavior in Zebrafish larvae.....</i>	45
4.3	Capítulo 03	63
4.3.1	<i>Produção de um animal knock-out do gene Appb (TALEN).....</i>	64
4.3.2	<i>Produção de um animal knock-in com expressão da proteína Aβ regulada por heat-shock.....</i>	69
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Neurodegenerativas

O envelhecimento é o processo biológico pelo qual ocorrem as alterações das propriedades morfológicas e fisiológicas nos organismos ao longo do tempo. As características desse processo incluem a perda gradativa das funções biológicas e o aumento da probabilidade de morte podendo ou não estarem associadas à patologias. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que após a idade reprodutiva, a perda da função celular e a quantidade de células de um organismo são progressivamente diminuídas (HARPER, 1982). Em humanos, essas alterações trazem consigo reflexos no comportamento, habilidade intelectual e capacidade física na realização das atividades diárias (KLUGER *et al.*, 1997).

O aumento na expectativa de vida é um fenômeno que vem se manifestando de forma crescente em escala mundial (RICKLEFS & FINCH, 1995; ARKING, 1998; NARAYAN, EHSANI & LINDQUIST, 2014). Essa mudança no padrão de distribuição etária da população vem acarretando um aumento na prevalência de doenças associadas ao envelhecimento, entre elas, as doenças associadas ao sistema nervoso como a Doença de Parkinson (DP) e a Doença de Alzheimer (DA) (RICKLEFS & FINCH, 1995; ARKING, 1998; MACCIONE, MUNOZ & BARBEITO, 2001; NARAYAN, EHSANI & LINDQUIST, 2014).

Estas e outras doenças neurodegenerativas menos predominantes compõem um grupo de desordens progressivas típicas do envelhecimento que afetam determinadas populações neuronais do sistema nervoso central, levando à morte neuronal e à ruptura de circuitos neurais, e que vêm se tornando mais prevalentes com o envelhecimento da população

mundial. Essas características fisiológicas e morfológicas são ocasionadas, na maioria das vezes, pela alteração da capacidade funcional de proteínas, e estudos relacionados tanto ao entendimento desses processos quanto ao papel destas proteínas devem ser realizados para um melhor entendimento e caracterização dessas doenças.

1.1.1 Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, sendo a causa mais comum de demência em idosos. Em 2013 foram estimados cerca de 44.4 milhões de casos no mundo, o que tende a aumentar para cerca de 75.6 milhões de casos em 2030 (Alzheimer's Disease International, 2014). A DA é principalmente caracterizada pela perda progressiva de memória, dificuldades na fala e nas atividades motoras, depressão e alucinações (NEWMAN *et al.*, 2011), todos esses sintomas são causados pela morte neuronal excessiva durante a progressão da DA causada pelo acúmulo e formação de agregados de duas principais proteínas, a proteína β -amilóide, que forma as placas β -amilóides (extracelularmente), e a proteína tau, que forma os emaranhados neurofibrilares (intracelularmente) (ROBERSON & MUCK, 2006). Alterações nos padrões de sono também são comumente encontradas em pacientes e já foi observado que os níveis de proteína amilóide no fluido intersticial (ISF) estão intimamente relacionados com a atividade neural e o relógio biológico, adicionando mais esse sintoma como um dos característicos da doença (PETER-DEREX *et al.*, 2014; SANCHEZ-ESPINOSA *et al.*, 2014). A forma Familiar da doença de Alzheimer (FAD) é responsável pela minoria dos casos, mas teve grande importância no descobrimento da relação entre o mal processamento da Proteína Precursora do Amilóide (APP) e o desenvolvimento da patologia (ROBERSON & MUCK, 2006; TJIN *et al.*, 2011).

Apesar do avanço no entendimentos das alterações que acompanham a progressão da

DA, ambas as formas da doença seguem sem tratamentos eficazes, e apenas estratégias paliativas para melhoramento de alguns sintomas estão disponíveis (Alzheimer's Disease International, 2014). Dentre os sintomas que podem ser tratados estão as alterações no humor e nos padrões de sono, para as quais são administrados antidepressivos, ansiolíticos e anti-psicóticos (Alzheimer's Disease International, 2014). Para um dos principais sintomas observados na DA, a perda gradativa de memória e desorientação, são prescritos medicamentos inibidores de colinesterases e também a memantina (Alzheimer's Disease International, 2014), responsável por impedir que o excesso de glutamato atue sobre a molécula receptora, evitando a entrada excessiva de cálcio e consequentemente a morte neuronal. Ainda assim a efetividade dessas estratégias é reduzida e temporalmente limitada, uma vez que não agem nos mecanismos centrais da doença.

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos crônicos de neurodegeneração é crucial para o desenvolvimento racional de fármacos. Um dos obstáculos para tal entendimento é a complexidade estrutural, celular e molecular do sistema nervoso, além da falta de um modelo experimental que possa ao mesmo tempo relacionar as disfunções moleculares às alterações comportamentais típicas destas patologias.

1.1.1.1 Proteínas β -amilóide e tau no contexto da DA

A proteína β -amilóide é um peptídeo, que varia entre 38 a 43 aminoácidos (aa), produzido pela clivagem proteolítica da APP, realizada por secretases, sendo liberado no espaço extracelular. Alterações no processamento da APP pelas secretases dão origem a esses diferentes tamanhos sendo o peptídeo com 42aa (β -amilóide (1-42)) o mais tóxico para o organismo (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007). Nos pacientes com a DA, esta proteína forma agregados e acumula de forma tóxica no cérebro na forma de placas neuríticas

ou oligômeros solúveis.

Com base nas observações repetidas da presença de agregados proteicos em tecido nervoso de pacientes post-mortem, no final dos anos 80 foi elaborada a hipótese das placas amilóides, ou *amyloid cascade* (ALLSOP *et al.*, 1988; SELKOE, 1989; HARDY & HIGGINS, 1992), a qual atribui a morte neuronal às placas de proteína β -amilóide não solúveis formadas principalmente pelo peptídeo de 42aa (GLABE, 2008). Durante os últimos anos foram geradas diferentes hipóteses para o desencadeamento desta patologia, e recentemente foi comprovado que são os oligômeros de proteína β -amilóide os primeiros causadores dos efeitos tóxicos que acompanham a doença (SAKONO & ZAKO, 2010; FERREIRA & KLEIN, 2011) (FIGURA 1). Estes oligômeros estão presentes, intra- e extracelularmente (FERREIRA & KLEIN, 2011), em diferentes tamanhos (entre 10 e 100kDa) e ainda não foi comprovado qual a forma mais tóxica (GLABE, 2008; SAKONO & ZAKO, 2010; FERREIRA & KLEIN, 2011).

Ainda não se sabe ao certo a função da proteína β -amilóide no sistema nervoso. Existem estudos demonstrando que o β -amilóide estaria intimamente ligado à formação dos vasos sanguíneos e também na polarização dos axônios e na manutenção da estabilidade das sinapses durante o desenvolvimento (CHASSEIGNEAUX *et al.*, 2011; CAMERON *et al.*, 2012; KAISER *et al.*, 2012; CUVONG *et al.*, 2013; LUNA, CAMERON & ETHELL, 2013; NICOLAS & HASSAN, 2014).

Também não se conhece os mecanismos que regulam a produção e a formação dos agregados. Sabe-se que pacientes com epilepsia desenvolvem as placas amilóides cerca de 10 anos mais cedo do que os pacientes que possuem somente DA, devido às convulsões e conseqüentemente à maior atividade neural (CIRRITO *et al.* 2005). Também se sabe que as regiões mais ativas do cérebro, como partes do lobo frontal e temporal, assim como o córtex cingulado posterior, desenvolvem a maior concentração das placas amilóides. Cirrito e

colaboradores (2005) demonstraram em camundongos que o aumento da atividade neural no hipocampo está intimamente relacionada ao aumento da concentração de β -amilóide no ISF.

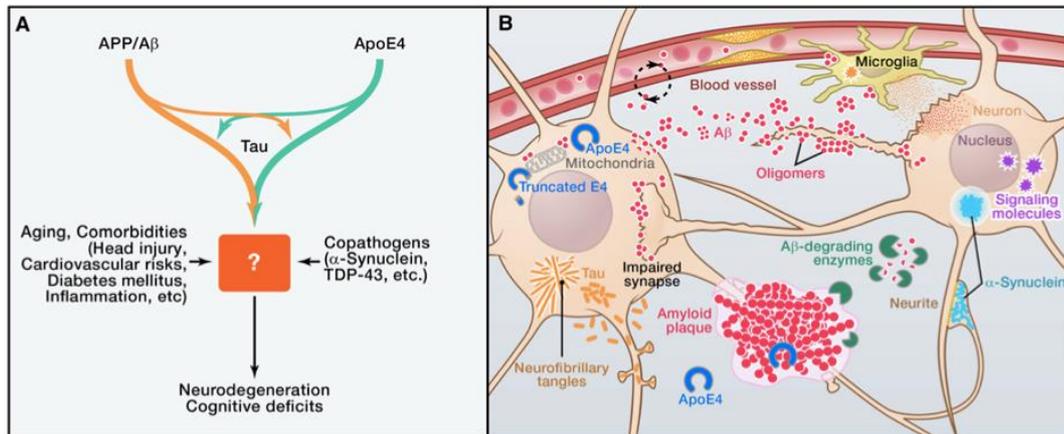


Figura 1 Doença de Alzheimer, múltiplos fatores e mecanismos neurodegenerativos Esquema envolvendo os múltiplos fatores relacionados à Doença de Alzheimer, como a proteína β -amilóide e a proteína tau e os respectivos efeitos neurodegenerativos (A). Representação de neurônios com agregados proteicos de β -amilóide (Oligômeros, do inglês, *Oligomers*) e proteína tau (emaranhados neurofibrilares, do inglês, *Neurofibrillary tangles*) (B). HUANG & MUCKE, 2012.

Outra proteína que está aumentada durante o processo neurodegenerativo desta doença, e também forma agregados, é a proteína tau. A tau é uma proteína associada ao citoesqueleto de microtúbulos, sendo responsável por auxiliar na estabilidade do citoesqueleto (NOBLE *et al.*, 2005; BAI & BURTON, 2011; NEWMAN *et al.*, 2011). Nos últimos anos foi demonstrado que esta proteína possui sítios de fosforilação para diferentes quinases, e a hiperfosforilação altera sua conformação e compromete a afinidade pelos microtúbulos, acumulando no citoplasma e desestabilizando axônios e neuritos (FIGURA 1) (NOBLE *et al.*, 2005; BAI & BURTON, 2011; NEWMAN *et al.*, 2011). Essa forma modificada assume conformações patogênicas, e em neurônios, acumula nas espinhas dendríticas e nos terminais pré- e pós-sinápticos, interferindo na eficiência da propagação dos impulsos nervosos (TAI *et al.* 2012).

Uma das principais proteínas quinases envolvidas na fosforilação de tau é a Glicogênio

Sintase Quinase 3 β (GSK-3 β), que também está envolvida na cascata de sinalização ativada pela proteína *Wingless* (Wnt) (STAMBOLIC, RUEL & WOODGETT, 1996). Estudos demonstraram que o tratamento com cloreto de lítio, inibidor da proteína GSK-3 β , reduz a hiperfosforilação de tau *in vivo*, revertendo as alterações fenotípicas de um camundongo transgênico para superexpressão de tau mutada (NOBLE *et al.*, 2005). Em outro estudo foi demonstrado que camundongos transgênicos que superexpressam GSK-3 β , apresentam hiperfosforilação de tau, ruptura dos microtúbulos e apoptose em neurônios (LUCAS *et al.*, 2001).

De Felice e colaboradores (2008) demonstraram a hiperfosforilação de tau relacionada com o acúmulo de β -amilóide. Outros estudos relacionam o aumento de β -amilóide com a desregulação da homeostase de cálcio (DEMURO *et al.*, 2005), aumento do estresse oxidativo (PAULA-LIMA *et al.*, 2011), inibição do transporte de vesículas nos axônios (DECKER *et al.*, 2010), inibição do proteassoma (TSENG *et al.*, 2008), entre outras ações neurotóxicas (FERREIRA & KLEIN, 2011). Alguns receptores de superfície celular também foram relacionados à toxicidade do β -amilóide, entre eles estão o receptor para insulina, receptores glutamatérgicos e o receptor *Frizzled*, relacionado com a ativação da via Wnt/ β -catenina que vem demonstrando grande importância na plasticidade sináptica (VARELA-NALLAR *et al.*, 2009; VARELA-NALLAR *et al.*, 2010) (FIGURA 2).

Neurônios em cultivo expostos à proteína β -amilóide apresentam um aumento na forma ativa da proteína GSK-3 β , uma das quinases responsáveis pela fosforilação da proteína tau, (TAKASHIMA *et al.*, 1996). Magdesian e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína β -amilóide se liga ao domínio rico em cisteínas da proteína *Frizzled*, próximo ao sítio de ligação da proteína Wnt, inibindo a via de sinalização canônica da Wnt e por consequência ativando a GSK-3 β .

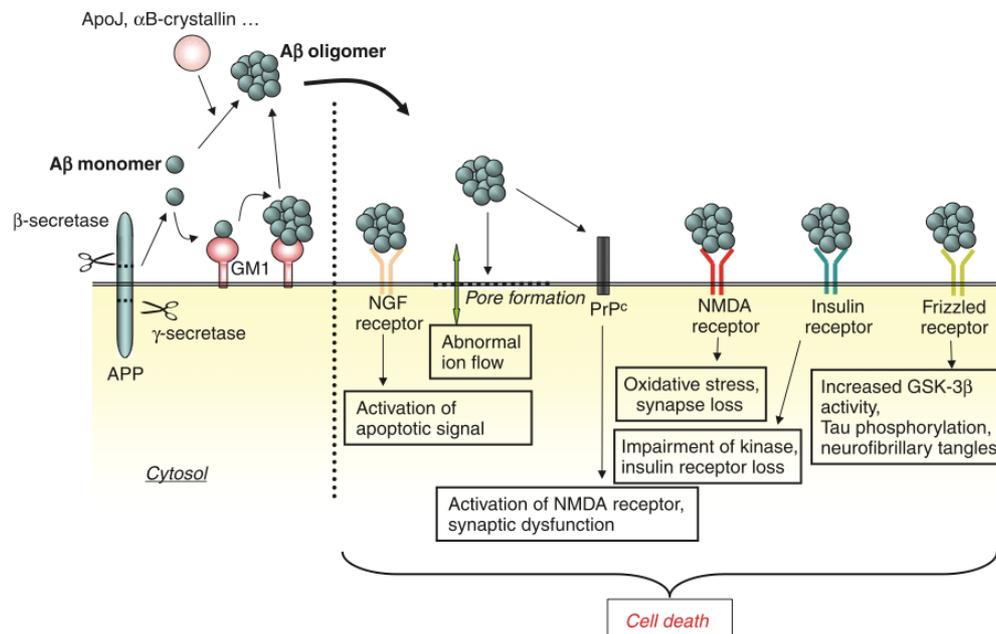


Figura 2 Proteína β-amilóide se liga a diferentes receptores de superfície celular. Representação dos oligômeros de proteína β-amilóide ativando e inibindo diferentes receptores celulares que estão envolvidos com a morte celular, incluindo o receptor Frizzled que leva a um aumento na atividade de GSK-3β e hiperfosforilação de Tau. SAKONO & ZAKO, 2010.

1.1.1.2 Proteína Precursora do Amilóide e seu processamento proteolítico

A importância da proteína β-amilóide na progressão da DA despertou interesse no estudo da função da APP, proteína que quando clivada por diferentes secretases pode formar a proteína β-amilóide, entre outros peptídeos. Após a clivagem da APP (FIGURA 3), os diferentes peptídeos gerados, estão envolvidas em uma série de processos biológicos, participando de diversas vias de sinalização, mas sua função principal, como APP, durante o desenvolvimento e no organismo adulto ainda não foi esclarecida (NICOLAS & HASSAN, 2014).

Desde a descoberta de sua participação na cascata β-amilóide e desenvolvimento da DA, vários estudos vem sendo feitos para entender o principal papel da APP. Em 2011

Chasseigneaux e colaboradores publicaram um estudo comprovando o envolvimento dos peptídeos sAPP α (produto da via não-amiloidogênica) e sAPP β (produto da via amiloidogênica) na indução do crescimento do axônio e na modulação das moléculas de adesão em cultivo celular (CHASSEIGNEAUX *et al.*, 2011). Outro grupo também demonstrou, em *zebrafish*, que a diminuição da produção de APP afeta o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e diminui a adesão entre as células (KAISER *et al.*, 2012). Também em *zebrafish*, foi observado que a diminuição da expressão do gene APP pode causar deficiências na formação dos vasos sanguíneos no cérebro (LUNA, CAMERON & ETHELL, 2013). Esses estudos demonstraram que a APP não somente está relacionada à produção de β -amilóide e à DA, mas também a processos fisiológicos durante o desenvolvimento e a vida adulta do indivíduo.

A APP é uma glicoproteína transmembrana do tipo I e possui duas outras formas tanto no organismo humano quanto em outros vertebrados como no *zebrafish*. Estas outras formas são denominadas APLP1 e APLP2 e não possuem a sequência de pares de base que codifica a proteína β -amilóide, apesar de sua funcionalidade redundante no sistema (GOLDGABER *et al.*, 1987; WASCO, BROOK & TANZI, 1993; NICOLAS & HASSAN, 2014). Esta proteína possui uma região extracelular longa, ancorada por uma pequena região citoplasmática, ambas conservadas evolutivamente em vertebrados e invertebrados (NICOLAS & HASSAN, 2014).

Existem duas vias de processamento da APP a não-amiloidogênica e a amiloidogênica (FIGURA 3). Na via não-amiloidogênica a APP é clivada primeiramente pela α -secretase e em seguida pela γ -secretase, ocasionando a ruptura da região que codifica a proteína β -amilóide dando origem a 3 peptídeos (sAPP α , p3 e AICD) (FIGURA 3). Já na via amiloidogênica a APP é clivada primeiramente pela β -secretase e posteriormente pela γ -secretase ocasionando a formação e liberação da proteína β -amilóide, entre outros fragmentos

(FIGURA 3).

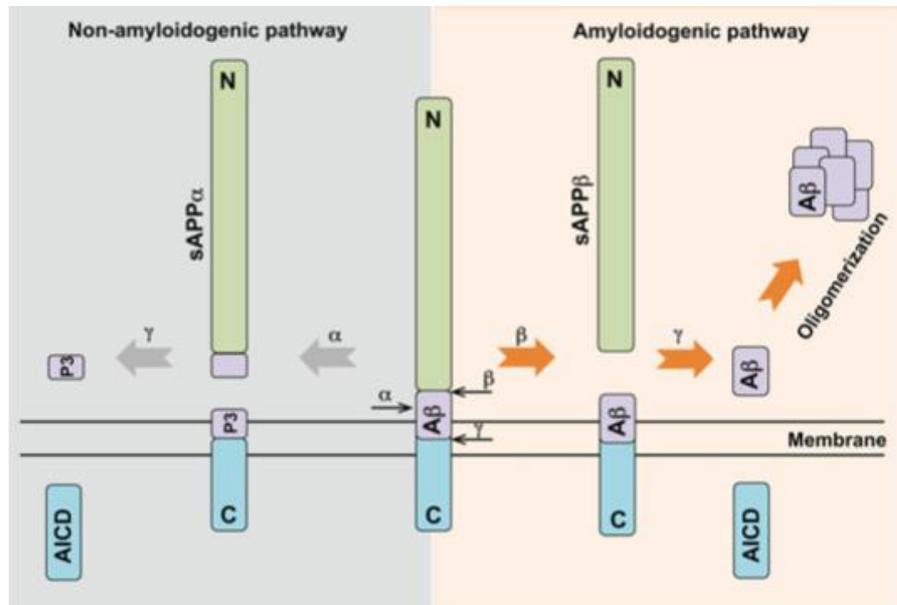


Figura 3 Proteína Precursora do Amilóide e suas vias de processamento A APP pode sofrer duas vias de processamento a via não-amiloidogênica (do inglês, *non-amyloidogenic pathway*), onde participam a α -secretase e γ -secretase, ou a via amiloidogênica (do inglês, *amyloidogenic pathway*), onde participam a β -secretase e a γ -secretase. AICD: *Amyloid Intracellular Domain*; P3: *P3 peptide*; sAPP α : *soluble APP α* ; sAPP β : *soluble APP β* ; A β : *Amyloid- β peptide* (NICOLAS & HASSAN, 2014).

A β -secretase, também conhecida como BACE, tem sido bastante estudada principalmente com a perspectiva de desenvolvimento de novos fármacos por ser a primeira secretase a gerar a proteína β -amilóide e sua inibição potencialmente diminuir a produção de β -amilóide (DE STROOPER, VASSAR & GOLDE, 2010). Apesar de uma maior heterogeneidade funcional, a γ -secretase, também vem sendo estudada com perspectivas terapêuticas. Sabe-se que a γ -secretase é formada por diferentes subunidades proteicas, entre elas a Presenilina-1 e a Presenilina-2 (DE STROOPER, VASSAR & GOLDE, 2010), e se supõe que alterações nessas diferentes subunidades poderiam auxiliar na inibição da clivagem da APP ou influenciar a formação do peptídeo β -amilóide mais tóxico (1-42). Estudos em pacientes com FAD demonstraram que estes possuíam mutações em diferentes éxons dos

genes *psen1* e *psen2*, o que poderia explicar o processamento alterado de APP e gerando aumento nos níveis de β -amilóide (DE STROOPER, VASSAR & GOLDE, 2010; FERREIRA & KLEIN, 2011).

1.1.2 Modelos Animais da Doença de Alzheimer

A proteína β -amilóide é conhecida como um dos principais agentes da DA e nas últimas décadas diferentes estratégias foram desenvolvidas para entender como essa proteína afeta o sistema nervoso (NEWMAN *et al.*, 2010). Entre essas estratégias estão alterações genéticas e nos níveis de expressão da proteína β -amilóide em camundongos (ODDO *et al.*, 2003; WOODRUFF-PAK, 2008; MORRISSETTE *et al.*, 2009). Invertebrados como o *Caenorhabditis elegans* e a *Drosophila melanogaster* também tem sido empregados no estudo de aspectos da patologia, permitindo, por exemplo, observar o acúmulo de proteína β -amilóide e a relação com déficit locomotor em moscas transgênicas (CROWTHER *et al.*, 2005; NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007; NEWMAN *et al.*, 2010).

Além das técnicas de transgenia, outros modelos são bastante úteis para o estudo de efeitos moleculares pontuais do aumento da produção da proteína β -amilóide. Uma dessas estratégias é a injeção de proteína β -amilóide (1-42) humana no cérebro de camundongos (TSUKUDA *et al.*, 2009). Apesar dos efeitos adversos dessa intervenção, ela é largamente utilizada para observar alterações em alvos moleculares específicos, efeitos dos peptídeos solúveis, oligômeros ou placas amilóides (HAN *et al.*, 2011).

Mesmo com essa variedade de modelos, ainda é difícil encontrar um que combine as características moleculares do acúmulo de β -amilóide, os efeitos comportamentais associados à doença e permita o *screening* de drogas neuroprotetoras. O *zebrafish* vem emergindo nesse

contexto, através do desenvolvimento recente de diferentes linhagens transgênicas para o estudo das alterações celulares e moleculares que mimetizam as causas de doenças.

1.2 O teleósteo *Zebrafish*

Diferentes modelos animais vêm sendo adaptados para estudos que possam, ao mesmo tempo, diminuir o custo e manter uma complexidade de sistemas que permita a extrapolação dos achados para outros animais e humanos (LIESCHKE & CURRIE, 2007; SPENCE *et al.*, 2008). O teleósteo *Danio rerio*, mundialmente conhecido como *zebrafish* foi descrito por Francis Hamilton em 1822. Pertencente à família Cyprinidae, uma das mais ricas em representantes dentre os vertebrados, esta espécie tem distribuição geográfica no sul e sudeste da Ásia (SPENCE *et al.*, 2008).

A fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos a partir 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 vertebrados modelo. Seu desenvolvimento embrionário completa-se em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando a larva eclode (SPENCE *et al.*, 2008), o que facilita o acompanhamento dos processos em tempo real, além da administração de fármacos e manipulações de diversas formas.

Proposto primeiramente como animal modelo para estudos de genética e 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 (SPENCE *et al.*, 2008). Graças a vantagens como a possibilidade de estudos genéticos e farmacológicos 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* vem se estabelecendo como vantajoso modelo animal.

1.2.1 Modelos de Neurodegeneração em *Zebrafish*

A complexidade e variedade de processos que acompanham as doenças neurodegenerativas, somados à impossibilidade de estudo do sistema nervoso de pacientes durante a progressão da doença em nível celular e molecular, resultaram na necessidade do desenvolvimento de estratégias para estudo de diferentes aspectos destas doenças fora do organismo afetado. Embora diferentes sistemas tenham sido empregados, o desenvolvimento de alterações que se assemelhem ao quadro patológico em outras espécies animais tem sido a estratégia mais efetiva em mimetizar a amplitude de características destas doenças, embora com restrições, como qualquer outro modelo.

Considerando que, com exceção de primatas e raros mamíferos, outros animais não desenvolvem doenças equivalentes às patologias neurodegenerativas humanas espontaneamente. Distintas estratégias para o desenvolvimento de patologias com aspectos neurodegenerativos em animais modelos foram desenvolvidas nas últimas décadas, especialmente em roedores. O estudo da DP, por exemplo, dispõe de modelos induzidos por toxinas, vírus e transgenia que mimetizam diferentes aspectos da patologia humana, e tem contribuído para o melhor entendimento da doença (MOORE & DAWSON, 2008), enquanto a DA foi estudada de forma equivalente (GÖTZ & ITTNER, 2008).

O desenvolvimento de novas técnicas para manipulação genética em *zebrafish* vem auxiliando o estudo de alterações no sistema nervoso, incluindo aumento ou diminuição da expressão de proteínas por um determinado período de tempo através de morfolidos, injeções

de sondas de RNA e alterações gênicas em alvos já associados à doenças humanas que podem causar neurodegeneração.

1.2.1.1 Injeções de morfolidos e RNA mensageiro

A técnica de oligonucleotídeos morfolidos (MO) é, atualmente, a mais utilizada para realização de *knock-down* anti-senso em *zebrafish* (BILL *et al.*, 2009), sendo empregada para estudar a função de genes tanto maternos quanto zigóticos. Esta técnica tem como princípio a inibição/diminuição da tradução do RNA mensageiro por meio de uma sonda de 25 pares de bases morfolidos que formam ligações complementares ao RNAm. Essas bases morfolidos se diferenciam das bases nitrogenadas por possuírem hexâmetros ao invés de pentâmeros, o que dificulta a degradação dos mesmos por nucleases (COREY & ABRAMS, 2001).

Recentemente, esta técnica foi padronizada para o desenvolvimento de modelos animais para diferentes doenças neurodegenerativas. Sabe-se que a realização de um *knock-down* do gene *pen-2* (*Presenilin enhancer*), que está relacionado com a clivagem de APP e formação de β -Amilóide na DA, induz um aumento da sinalização pró-apoptótica dependente de p53 contribuindo para a perda neural (CAMPBELL *et al.*, 2006). Também já foram observados, durante o desenvolvimento do *zebrafish*, os efeitos de MO para os genes *psen-1* e *psen-2*, que estão intimamente ligados à forma familiar desta doença. Nestes estudos foram observados aumento dos ventrículos encefálicos (NORNES *et al.*, 2008), defeitos nos somitos (NORNES *et al.*, 2003) e diminuição do número de células da crista neural (NORNES *et al.*, 2008).

1.2.1.2 Utilização de TALEN para alteração genômica

O sistema TALEN (do inglês, *transcription activator-like effector nucleases*) é formado por complexos proteicos que se ligam a regiões específicas do DNA (DENTE *et al.*, 2011; SANJANA *et al.*, 2012) com o objetivo de realizar uma quebra na dupla fita, estimulando a edição do genoma através de eventos de reparo mediados por recombinação homóloga (Figura 4D) quando há um molde ou não homóloga na ausência do mesmo (Figura 4C) (SANDER & JOUNG, 2014). Esse sistema vem sendo amplamente utilizado na geração de linhagens *knock-out* em vertebrados (SANJANA *et al.*, 2012), incluindo em *zebrafish* (BEDELL *et al.*, 2012; SANJANA *et al.*, 2012; SCHIMID & HAASS, 2013).

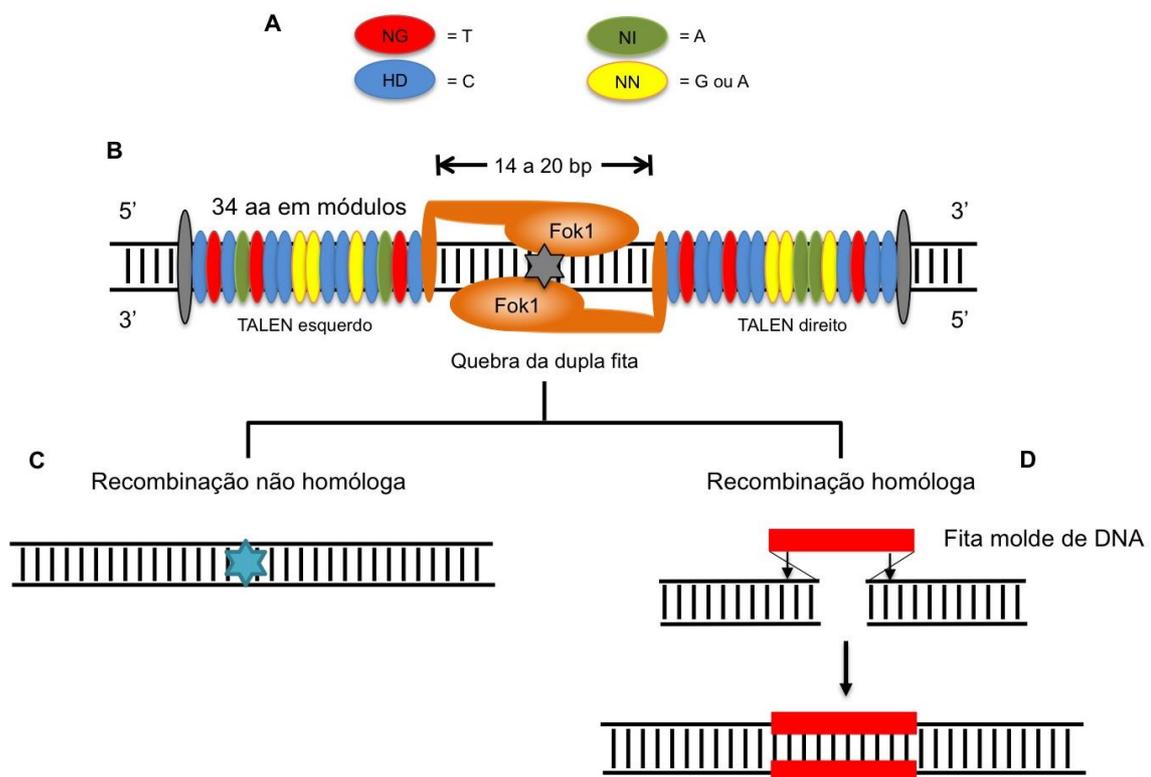


Figura 4 Esquema ilustrativo do sistema TALEN. Cada braço de ligação ao DNA consiste em 16 módulos de repetição formados por 2 aminoácidos (aa) que tem afinidade por um nucleotídeo específico (A) (NG=T; HD=C; NI=A; NN=G ou A). O braço esquerdo e o braço direito do TALEN se conectam a regiões específicas do DNA ocasionando a quebra da dupla fita através do domínio catalítico (Fok1) (B). Esta quebra pode ser reparada através da recombinação não homóloga (C) ou pela recombinação homóloga (D), quando há uma fita molde de DNA disponível. Esta última pode ser utilizada para inserção de sequências específicas o genoma.

Ao contrário dos morfolidos que geram uma diminuição temporária nos níveis do produto do gene de interesse, o sistema TALEN ocasiona mutações e deleções permanentes e estáveis no genoma. O descobrimento dos elementos de ligação ao DNA do tipo TALEN em bactérias do gênero *Xanthomonas* foi de extrema importância para estudos de manipulação genética em vertebrados (SCHIMID & HAASS, 2013).

O domínio de ligação ao DNA é constituído de 4 repetições distintas de aminoácidos, cada um sendo capaz de se ligar a um nucleotídeo específico (Figura 4A). Essa sequência de aminoácidos faz com que cada domínio TALEN seja específico à uma região do DNA, ocasionando a quebra do DNA sempre próximo a essa posição genica (Figura 4B). Este mecanismo é um dos mais aceitos e utilizados para a realização de alterações no genoma.

1.3 Fármacos Neuroprotetores

Apesar do acúmulo de informações a respeito dos mediadores moleculares associados à DA, os mecanismos desencadeadores ainda não são entendidos, e tampouco existe estratégia terapêutica capaz de prevenir, tratar ou reverter os danos decorrentes da doença (HOLTZMANN, MORRIS & GOATE, 2011; HUANG & MUCKE, 2012). Neste contexto, somado às alarmantes expectativas de aumento de incidência da DA na população mundial, a identificação de fármacos com potencial neuroprotetor ou terapêutico é extremamente atrativa. A procura por potenciais fármacos neuroprotetores para a Doença de Alzheimer tem tido como alvo principal a cascata β -amilóide, e vem tentando relacionar a inibição da produção ou agregação desta proteína com a diminuição dos sintomas (PALMER, 2011).

Vários compostos que reduzem a produção de β -amilóide vêm sendo estudados e já estão em fase de testes clínicos, incluindo inibidores de β -secretase, como pioglitazone e

rosiglitazone (DE STROOPER, VASSAR & GOLDE, 2010). Entre outros compostos que estão relacionados com a cascata β -Amilóide, mas que ainda estão sendo investigados e tem potencial para o tratamento da DA está o cloreto de Lítio (LENG *et al.*, 2008).

1.3.1 Lítio

O cloreto de Lítio (LiCl), doravante referido como Lítio, vem sendo utilizado desde os anos 50 como fármaco para o tratamento de doenças psiquiátricas como transtorno bipolar e depressão (SALINAS & HALL, 1999). Em modelos animais, existem evidências de efeitos neuroprotetores no tratamento sintomas associados a derrames, às Doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e a danos medulares e degeneração da retina, entre outros (LENG *et al.*, 2008).

Em roedores o lítio reforça a estabilidade das moléculas responsáveis pela consolidação da memória, como a β -catenina (MAGUSCHAK & RESSLER, 2008). Sabe-se que o lítio pode modular a via de sinalização Wnt agindo como um inibidor da GSK-3 β de forma equivalente ao inibidor específico desta quinase SB216763 (STAMBOLIC, RUEL & WOODGETT, 1996). A GSK-3 β é uma proteína que desempenha um papel central na via Wnt, quando a via está ativa a GSK-3 β é capturada por um complexo proteico e fica inibida, quando a via está inativa (na ausência de Wnt) a GSK-3 β fica livre no citoplasma tendo o papel de fosforilar a β -catenina, direcionando-a para degradação proteossômica. A ação inibidora do lítio sobre a GSK-3 β ocasiona um aumento na concentração de β -catenina no citoplasma, permitindo que esta se direcione ao núcleo e ative a transcrição de genes associados aos múltiplos efeitos da via Wnt, ou, próxima à membrana, e estabilize adesões celulares mediadas por caderinas (KLEIN & MELTON, 1996; STAMBOLIC, RUEL & WOODGETT, 1996; SALINAS & HALL, 1999; CHEN, DING & MCCORMICK, 2000;

STUMP *et al.*, 2006; LENG *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, a GSK-3 β é uma das principais quinases que fosforilam a proteína tau, que está intimamente relacionada com a DA. Estudos relacionaram alterações tanto da capacidade cognitiva quanto das memórias de longa duração, ocasionadas pela presença de β -amilóide juntamente com a fosforilação de resíduos específicos da GSK-3 β na proteína tau (MAZANETZ & FISCHER, 2007; SAKONO & ZACO, 2010, SHIPTON *et al.* 2011). Noble e colaboradores (2005) demonstraram que o tratamento com lítio ocasiona uma diminuição da atividade da GSK-3 β e conseqüentemente uma diminuição da fosforilação da proteína tau.

2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida, a prevalência de doenças neurodegenerativas vem aumentando rapidamente, e as terapias atuais, ainda inefetivas em sua maior parte, estão voltadas apenas para a diminuição da progressão dos sintomas e não para a prevenção ou tratamento destas doenças. Para uma melhor identificação de potenciais alvos terapêuticos tendo em foco essas doenças, como a Doença de Alzheimer, temos que entender melhor os mecanismos celulares e moleculares pelos quais essas patologias se desenvolvem.

O desenvolvimento de novas plataformas e de modelos animais mais consistentes, onde possam ser observadas tanto as características celulares e moleculares, quanto comportamentais da doença são o caminho para a identificação de fármacos e terapias com potencial neuroprotetor, além de aumentar o conhecimento específico sobre as proteínas envolvidas nesses processos patológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Esta tese teve como objetivo estabelecer e caracterizar novos modelos de neurodegeneração para o estudo da Doença de Alzheimer em *zebrafish* e avaliar o efeito do Lítio como possível droga neuroprotetora em relação aos marcadores celulares e moleculares candidatos a mediadores da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo da DA através da injeção de proteína β -amilóide no ventrículo cerebral de embriões de *zebrafish*;
 - Validar a técnica de microinjeção intracerebroventricular da proteína β -amilóide em embriões de *zebrafish*;
 - Avaliar a embriotoxicidade causada pela injeção de β -amilóide e pelo tratamento com LiCl;
 - Avaliar os efeitos neuroprotetores do LiCl nos animais injetados com β -amilóide em relação aos controles;
 - Avaliar os efeitos da injeção intracerebroventricular e do tratamento com lítio sobre o comportamento exploratório e respostas cognitivas de escape a estímulo aversivo nos diferentes grupos experimentais;

- Quantificar, através de *Western Blot*, os níveis de fosforilação da proteína tau nos diferentes grupos experimentais;
 - Quantificar, através de PCR em tempo real, a expressão dos genes p53, bax e bcl-2, relacionadas com as vias apoptóticas nos diferentes grupos experimentais;
 - Quantificar através de *Western Blot* os níveis das proteínas p53, bax e caspase-8 relacionadas com as vias apoptóticas nos diferentes grupos experimentais.
-
- Estabelecer um modelo para estudar a participação da proteína Presenilina-1 no desenvolvimento de *zebrafish* através da inibição do *splicing* do éxon 8 com oligonucleotídeos Morfolinos;
 - Padronizar a metodologia para injeção de Morfolinos em embriões de *zebrafish*;
 - Avaliar a embriotoxicidade causada nos diferentes grupos experimentais;
 - Avaliar o comportamento exploratório e aversivo nos diferentes grupos experimentais;
 - Quantificar, através de *Western Blot*, os níveis da proteína β -amilóide nos diferentes grupos experimentais;
 - Quantificar, através de *Western Blot*, os níveis das proteínas p53 e bax relacionadas com as vias apoptóticas nos diferentes grupos experimentais.
 - Quantificar, através de PCR em tempo real, alterações nos genes relacionados a via Notch e Wnt: *neurog1*, *cnnd1* e *myca*.

- Estabelecer um animal *knock-out* do gene *Appb* através do sistema TALEN;
 - Caracterizar as mutações geradas pela quebra de DNA ocasionada pelo sistema TALEN;

- Estabelecer um animal *knock-in* da proteína β -amilóide utilizando um promotor *heat-shock* para expressão temporária da proteína em *zebrafish*;

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo 01

4.1.1 Artigo Científico: Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium

Publicado no periódico PLOS ONE, 9(9):e105862.

Data de publicação: 04 de setembro de 2014

(doi:10.1371/journal.pone.0105862)



Brain Intraventricular Injection of Amyloid- β in Zebrafish Embryo Impairs Cognition and Increases Tau Phosphorylation, Effects Reversed by Lithium

Laura Roesler Nery¹, Natalia Silva Eltz¹, Cristiana Hackman¹, Raphaela Fonseca¹, Stefani Altenhofen², Heydi Noriega Guerra³, Vanessa Morais Freitas³, Carla Denise Bonan², Monica Ryff Moreira Roca Vianna^{1*}

1 ZebLab & Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** ZebLab & Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disorder with no effective treatment and commonly diagnosed only on late stages. Amyloid- β ($A\beta$) accumulation and exacerbated tau phosphorylation are molecular hallmarks of AD implicated in cognitive deficits and synaptic and neuronal loss. The $A\beta$ and tau connection is beginning to be elucidated and attributed to interaction with different components of common signaling pathways. Recent evidences suggest that non-fibrillary $A\beta$ forms bind to membrane receptors and modulate GSK-3 β activity, which in turn phosphorylates the microtubule-associated tau protein leading to axonal disruption and toxic accumulation. Available AD animal models, ranging from rodent to invertebrates, significantly contributed to our current knowledge, but complementary platforms for mechanistic and candidate drug screenings remain critical for the identification of early stage biomarkers and potential disease-modifying therapies. Here we show that $A\beta$ 1–42 injection in the hindbrain ventricle of 24 hpf zebrafish embryos results in specific cognitive deficits and increased tau phosphorylation in GSK-3 β target residues at 5dpf larvae. These effects are reversed by lithium incubation and not accompanied by apoptotic markers. We believe this may represent a straightforward platform useful to identification of cellular and molecular mechanisms of early stage AD-like symptoms and the effects of neuroactive molecules in pharmacological screenings.

Citation: Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, et al. (2014) Brain Intraventricular Injection of Amyloid- β in Zebrafish Embryo Impairs Cognition and Increases Tau Phosphorylation, Effects Reversed by Lithium. PLoS ONE 9(9): e105862. doi:10.1371/journal.pone.0105862

Editor: Jerson Laks, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Received: November 4, 2013; **Accepted:** July 29, 2014; **Published:** September 4, 2014

Copyright: © 2014 Nery et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MRV, RF, NES and CDB received CNPq fellowships, LRN and SA were supported by CAPES and CS by FAPERGS; This work was supported by CNPq(305060/2009-0, 567483/2008-8) and DECT/SCITE-MS/CNPq-FAPERGS (10/0036-5 700545/2008-PRONEX). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: monica.vianna@puers.br

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent cause of dementia currently affecting 30 million individuals and expected to quadruplicate until 2050 [1]. AD symptoms include progressive cognitive decline due to synaptic and neuronal deterioration and the lack of effective treatments results in extensive care with elevated costs for several years [1], inexorably culminating in death. Despite abundant information about altered cellular events in sporadic AD, its effective treatment depends on understanding sequential disease mechanisms in order to identify potential treatment-targets in early stages.

AD is characterized by deposition and aggregation of Amyloid- β ($A\beta$) protein on the extracellular space [1] [2] while the microtubule-associated tau protein becomes abnormally phosphorylated, disrupts cytoskeletal organization and accumulates on toxic neurofibrillary tangles in the cytosol [3].

Recent studies support new features of the non-fibrillary and soluble $A\beta$ peptide forms before aggregation that are believed to be prevalent in initial disease stages [4] [5] [6]. A correlation

between soluble $A\beta$ and increased tau protein phosphorylation has been demonstrated [7] [8] [9] [10]. Tau phosphorylation (tau-p) can be reversed by pharmacological inhibition of specific tau-kinases such as Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in rodents [11] [12] and AD patients [13]. The missing link between $A\beta$ and tau accumulation could be the $A\beta$ soluble peptide forms that bind to membrane receptors and modulate GSK-3 β activity [6] [7].

A better understanding of AD progression and its cellular and molecular mechanisms depends on animal models that mimic specific disease aspects. Intracerebral infusion of $A\beta$ protein in rodents has contributed significantly to understanding the AD underlying machinery [14] [15] [16]. Complementary models to study molecular aspects of AD include the fruit fly *Drosophila* [17] and the nematode *C. elegans* [18]. However, the need of complementary platforms for mechanistic and candidate drug screenings remains. Zebrafish has emerged in the last decade as an advantageous model organism for high-throughput pharmacological screenings of neuroactive compounds [19] [20] [21] [22] and recently shown to share 84% of the genes known to be associated with human diseases [23], including those related to AD [20].

In this context, we propose a complementary model to further dissect the pathological effects of soluble A β and simultaneously screen for potential neuroprotective molecules. Our model is based on the hindbrain ventricle injection of the A β 1-42 peptide in 24 hpf zebrafish embryos and results in specific behavioral and molecular effects that resemble early stage AD features. Specific cognitive deficits and tau-phosphorylation in residues associated to early AD stages were reversed by lithium chloride, a GSK-3 β inhibitor.

Materials and Methods

Animals

Adult wild type zebrafish were kept and bred according to standard procedures in an automated re-circulating system (Tecniplast) at a density of 1.5 fish per liter with a constant light-dark cycle (14–10 h) [24]. For breeding, females and male (1:2) placed in breeding tanks (Tecniplast) overnight were separated by a transparent barrier that was removed after lights went on in the following morning. Embryos were collected after 15 min and transferred to sterile 6-well cell culture plates (20 embryos per well) kept in incubators at 28.5°C and controlled 14:10 hours light-dark cycle. Embryos and larvae had their mortality and general morphology daily monitored under an inverted stereomicroscope (Nikon).

Ethics Statement

All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-PUCRS, permit number 0107/12), followed the Brazilian legislation (no.11.794/08) and conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the use of fish in research [25].

Treatment and Brain Ventricle Injection

Embryos were treated with system water (RO water equilibrated with Instant Ocean salts - H₂O) or 100 μ M Lithium Chloride (LiCl) (Synth) [26] diluted in system water from 1 hour post-fertilization (hpf) until 5 days post-fertilization (dpf) (Figure 1A). Medium was daily replaced and controlled for pH.

At 24 hpf all embryos had their chorion removed for the brain ventricle injection procedure according to Gutzman and Sive [27]. Embryos were anesthetized with Tricaine (Sigma Aldrich) and placed in wells on 0.75%-agar coated dishes under the stereomicroscope so that the brain ventricle was visible and the embryo unmoving (Figure 1A). The microinjection was performed using a micromanipulator (Narishige) attached to a PicoLiter injection pump (Warner Instruments). The injection needle was placed on the roof plate of the hindbrain and 5–10 nl of a 10 μ M A β 1-42 in 1% DMSO 0.5% Phenol Red Phosphate Buffered Saline (PBS) solution (A β) was injected while control group animals received the equivalent 1% DMSO 0.5% Phenol Red in PBS vehicle (veh). In less than 10 minutes each animal was returned to the incubator. In addition to the resulting H₂O-veh, LiCl-veh, H₂O-A β , LiCl-A β , additional control groups of uninjected animals treated with water (H₂O-O) or LiCl (LiCl-O) composed final 6 experimental groups.

The A β 1-42 peptide (Sigma Aldrich) was prepared following manufacturer instructions in DMSO 100% to a final concentration of 1000 μ M and diluted to the final 10 μ M according to Cunvong et al. [28]. To prevent A β aggregation into the fibrillary form, the solution was maintained at a maximum temperature of 28°C and the pH was adjusted to 7.0. Diluted A β 1-42 was “ran-true” in SDS-PAGE gel and a band of an approximately molecular weight of 40 kDa was observed [10].

Locomotor behavior

5dpf larvae from all experimental groups (N = 10 in triplicates) were individually placed in a 24-well plate filled with 3 ml of system water for locomotory performance analysis during a 5-min session following 1-min acclimation. The performance was video recorded using a digital HD webcam (Logitech) for automated analysis (ANYmaze, Stoelting). Total distance travelled, mean speed, time mobile and absolute turn angle were considered the main parameters of exploration of a new environment.

Bouncing-Ball Avoidance behavior

After the exploratory evaluation, larvae were placed in 6-well plate (5 larvae per well, N = 10 in triplicates) over a LCD monitor for cognitive ability and avoidance responses to a visual stimulus (a 1.35 cm diameter red bouncing ball) in a protocol adapted from Pelkowski et al. [29] during a 5-min session following 2-min acclimation. The red bouncing ball travelled from left to right over a straight 2 cm trajectory on half of the well area (stimuli area) (Figure 1A) which animals avoided by swimming to the other non-stimuli half of the well. The number of larvae on the non-stimuli area during the 5-min session was considered indicative of their cognitive ability.

Western Blot

Euthanized 5dpf larvae (Figure 1A) had their encephalon dissected (pool of 20 animals, N = 3 in triplicates) and stored at –80°C in protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) until homogenization with RIPA (Sigma Aldrich) and protein separation on 12% SDS-polyacrylamide gel with sample buffer (0.025% BPB). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 5% bovine serum albumin on TBST. Primary Antibodies were diluted on the blocking solution at the following concentrations: Rb- β -actin (Anaspec; 1:1000); Ms-Phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 AT8 (Pierce; 1:500); Rb-p53 (Anaspec; 1:1000); Rb-bax (Anaspec; 1:750) and Rb-caspase-8 (Anaspec; 1:750); and incubated overnight, washed three times with TBST and incubated for 1 hour with secondary antibody diluted in 5% Albumin in TBST at the concentrations of Goat-anti-Rabbit IgG (Sigma Aldrich; 1:2000) and Goat-anti-Mouse IgG (Abcam; 1:2000). Membranes were washed with TBST, incubated with ECL (Abcam) and scanned for further densitometric quantification of replicated gels using the software Carestream. After exposure, membranes were washed in TBST to remove ECL solution and antibodies were stripped out by dehybridization with (2% SDS, 50 mM Tris pH 6.8 and 100 mM β -mercaptoethanol), and incubated with other antibodies using the same actin control. Total protein levels were normalized according to each sample's β -actin levels.

Real time PCR

RNA isolation and cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's instruction. Briefly, 5dpf larvae had their encephalon dissected (Figure 1A) (pool of 20 animals, N = 6 in duplicates) placed in TRIzol (Invitrogen), frozen in liquid nitrogen and maintained at –80°C. mRNA was isolated and cDNA were synthesized with SuperScriptIII First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen).

For all genes, qRT-PCRs were performed using SYBR green dye [30]. Standard reactions were performed with a total 25 μ L per well, on an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system, and the primer final concentration were 0.1 μ M. The primers sequences were described previously by Tang [30] for constitutive genes: b-actin1 F:5'-CGAGCTGTCTTCCCATCCA-3', R:5'-

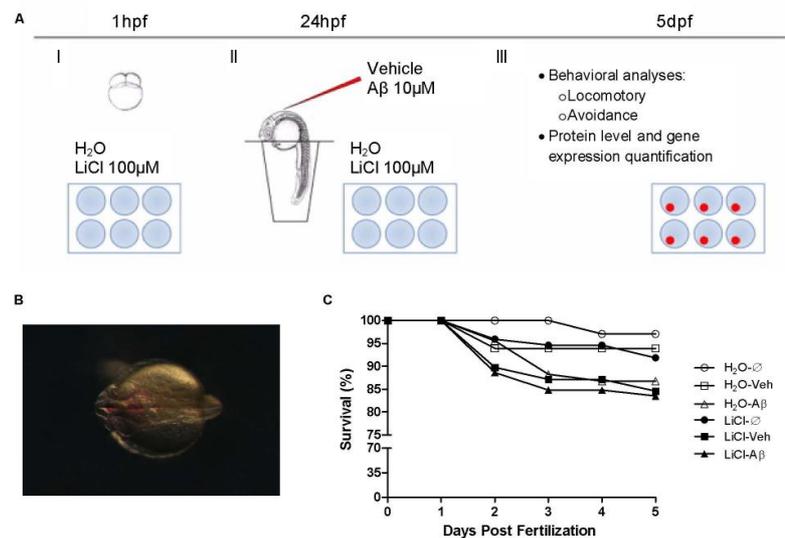


Figure 1. Experimental design and A β intraventricular injection effect on survival. A, Experimental procedures time-line, (I) at 1 hpf embryos were placed in 6-well plates and exposed to LiCl 100 μ M or H₂O; (II) at 24 hpf embryos were removed from their chorion, and injected with A β 1-42 10 μ M or its vehicle; LiCl and H₂O solutions were replaced daily throughout the experiment; (III) at 5 dpf larvae behavior were evaluated and samples for protein and gene expression quantification were obtained. B, Representative image of A β (red) injected on the brain ventricle area. C, Kaplan-Meier survival comparison for all groups throughout the experiment showed significant effects (Log-rank (Mantel-Cox) test, $p=0.0415$, $N=60$ in triplicates) that were not statistically significant when individual comparisons were performed. doi:10.1371/journal.pone.0105862.g001

TCACC-AACGTZGCTGTCTTTCTG-3'; efla F:5'-CTGG-AGGCCAGCTCAAACAT-3', R:5'-ATCAAGAAGAGTAGT-ACCGCTAGCATTAC-3'; and rpl13a F:5'-TCT-GGAGGAC-TGTAAGAGGTATGC-3', R:5'-AGAGCACAATCTTGAG-AGCAG-3'. The target genes were previously described by Jung et al. [31]: p53 F:5'-CTATAAGAAGTCCGAGCATGTGG-3', R:5'-GGTTTTGGTCTCTTGGTCTTCT-3'; bax-a F:5'-GAGCTGCACTTCTCAACAACCTT-3', R:5'-CTGGTTGAAA-TAG-CCCTTGATGAC-3' and bcl-2 F:5'-TTGTGGAGAAA-TACCTCAAGCAT-3', R:5'-GAGTCTCTCTGCTGACCG-TACAT-3'. Amplification and dissociation curves generated by the software were used for gene expression analysis.

Threshold Cycle (Ct) values were obtained for each gene. Following exclusion of non-amplifying samples, raw fluorescence data was exported to the software LinRegPCR 12.x to determine the PCR amplification efficiency of each sample. PCR efficiency of each sample, together with Ct values, was used to calculate a relative gene expression value for each transcript according to Pfaffl [32].

Statistical analyzes

Survival throughout the 5 experimental days was analyzed by Kaplan-Meier test. Data from all other approaches was parametrically analyzed using two-way ANOVA (using treatment and injection as factors) followed by Bonferroni post-hoc test. Student-t test was used to evaluate specific data when needed. The level of significance was considered $p<0.05$.

Results

First, we adapted Gutzman and Sive [27] protocol for 24 hpf zebrafish brain ventricle injection, and in addition to a dye tracer

to ensure correct injection positioning (Figure 1B), we injected animals with 10 μ M of soluble A β 1-42 in 1% DMSO (A β -injected group) or only 1% DMSO vehicle (veh-injected group) (Figure 1). To our knowledge, this is the first demonstration of ventricular brain A β injection in zebrafish in addition to the dye used for validation. No morphological alteration or injection effect was observed in any of the evaluated parameters throughout the experiments. In addition to those injection groups, we also controlled the effects of the microinjection puncture and did not find any deleterious effect on survival, deformities or behavior (data not shown).

Survival rates were analyzed by Kaplan-Meier test and results indicated a significant difference on survival rate when all groups were compared (Log-rank (Mantel-Cox) test $p=0.0415$, $N=60$). The decrease in survival on H₂O-A β (86.7%), LiCl-veh (84.5%) and LiCl-A β (83.5%) groups was not significant when individual comparisons were performed (Figure 1C). This effect is discrete and challenging to interpret since it was not homogeneously distributed among treatment or injection factors. It may be associated to the high and uniform within group survival rates from most groups (mean survival of H₂O-treated non-injected individuals was 97.06%) in comparison to commonly observed values of around 75% in these developmental stages [33].

Considering that AD behavioral symptoms in early stages include only mild cognitive deficits, which are several times misdiagnosed and confounded with normal aging even thought not accompanied by aging-characteristic motor deficits [6], we evaluated locomotion separately from cognitive behavior in 5 dpf larva. Individually locomotor evaluation and exploratory parameters showed no statistical differences between groups, including total distance travelled ($p=0.250$ $F_{(1,179)}=1.40$), mean speed

($p = 0.181$ $F_{(1,185)} = 1.72$), time spent mobile ($p = 0.70$ $F_{(1,182)} = 0.36$) and path absolute turn angle, a motor coordination parameter [34], ($p = 0.409$ $F_{(1,186)} = 0.90$) using two-way ANOVA (data not shown). However, when cognitive escaping responses from an aversive stimulus was evaluated, we observed a significant effect of A β -injection and LiCl-treatment (two-way ANOVA $p < 0.0001$ $F_{(1,166)} = 40.77$ on treatment effect, and $p < 0.0001$ $F_{(2,166)} = 21.13$ on injection effect) (Figure 2). Bonferroni posttest showed that A β -injected animals avoided the aversive stimulus less effectively than animals injected with vehicle on both treatments ($p < 0.05$). When comparing only H₂O-A β and LiCl-A β animals, LiCl significantly improved the scape response to the stimuli ($p = 0.0002$, Student-t test), suggesting protective effect from A β -induced cognitive deficits. Additionally, the lithium beneficial effect on cognition was observed in all groups when compared to their respective water-treated controls.

To investigate if the selective cognitive deficits induced by A β injection and prevented by LiCl were accompanied by tau phosphorylation, we measured the level of Ser202 and Thr205 phosphorylation (Figure 3). These residues are GSK-3 β targets [11] [35] [36] known to be increased in aged individuals and early-stage AD patients [6]. Our results showed again significant effects of A β injection and a general protective effect of the GSK-3 β inhibitor LiCl (Two-way ANOVA $p < 0.0001$; $F_{(1,42)} = 296.00$ on treatment effect, and $p < 0.0001$ $F_{(2,42)} = 11.77$ on injection effect) (Figure 3). Untreated A β -injected animals (H₂O-A β) displayed significantly higher levels of tau protein phosphorylation ($p < 0.001$, Bonferroni posttest) when compared to H₂O-veh. H₂O-veh animals also displayed increased p-tau in relation to non-injected animals (H₂O- \emptyset) ($p < 0.01$, Bonferroni posttest), which may be attributed to DMSO toxicity even at very low concentrations. Interestingly, when LiCl-treated groups were paired with their respective H₂O-treated equivalent groups, all comparisons showed a lithium significant effect decreasing tau-p levels ($p < 0.0001$ for all groups; Student-t tests), which was more prominent between H₂O-A β and LiCl-A β , in resemblance to the cognitive data (Figure 2). These protective effects of LiCl over the basal and A β -induced phosphorylation have been previously shown in other systems [37] [38] [39] but not in zebrafish.

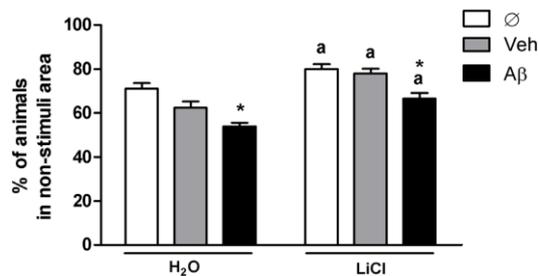


Figure 2. Intraventricular A β injection significantly impairs avoidance of an aversive stimulus. 5dpf larvae escape behavior from an aversive stimulus (charts were plotted with means and SD escape responses to a non-stimuli area). Two-way ANOVA followed by Bonferroni demonstrated a significant effect of treatment factor (H₂O and LiCl) ($p < 0.0001$; $F_{(1,166)} = 40.77$; $N = 10$ in triplicates). A β injected animals showed diminished escape responses when compared to their vehicle control group in H₂O and LiCl-treated groups (* indicates $p < 0.05$ for both comparisons). LiCl treatment increased escape responses in all groups when compared to their respective H₂O-treated equivalent (a indicates $p < 0.05$ for noninjected \emptyset groups; $p < 0.0001$ for veh-injected groups and $p < 0.001$ for A β -injected groups in Student-t test. doi:10.1371/journal.pone.0105862.g002

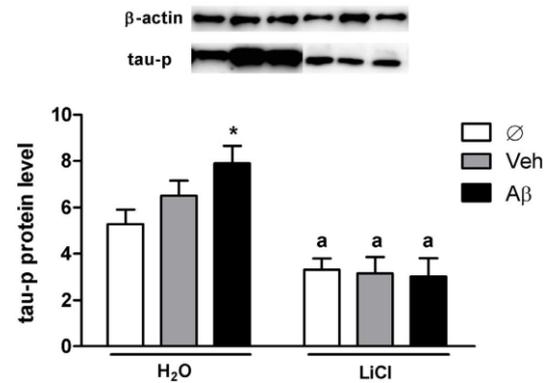


Figure 3. Intraventricular A β injection increases tau-p at Ser202 and Thr205 residues and this effect is reversed by lithium treatment. Representative Western blots showing immunoreactivity to phosphorylated tau protein normalized to β -actin and quantification of absorbance (charts were plotted with means and SD). Two-way ANOVA followed by Bonferroni demonstrated a significant effect of treatment factor ($p < 0.0001$, $F_{(1,42)} = 296.02$; $N = 3$ in triplicates). H₂O-A β injected animals showed increased levels of tau phosphorylation in relation to H₂O-veh (* $p < 0.001$). LiCl treatment decreased tau-p in all groups when compared to their respective H₂O-treated equivalent (a indicates $p < 0.0001$ in Student-t test for all comparisons). doi:10.1371/journal.pone.0105862.g003

Tau abnormal phosphorylation has been associated to AD progression, axonal disruption, synaptic loss and neuronal death (reviewed in [6]). A β -induced effects on cognition (Figure 2) and tau-phosphorylation (Figure 3) suggested that our model resembles early AD stages that were not related with cell death. We quantified protein and transcription levels of apoptosis-associated proteins that were previously suggested to be associated to A β -toxicity and neurodegeneration including p53, caspase-8, bax-a and non-apoptotic marker such as bcl-2 (Figure 4). Importantly, A β -injected (H₂O-A β) animals did not differ from their respective vehicle-injected controls (H₂O-veh) or from LiCl-A β animals in any comparison, suggesting no specific A β -induced effect on apoptosis and associated LiCl neuroprotective effect. No alterations on bax ($p = 0.3063$; $F_{(2,48)} = 1.21$ Two-way ANOVA) protein level were observed despite of significant effects on p53 ($p = 0.035$; $F_{(1,41)} = 4.758$ Two-way ANOVA) and caspase-8 ($p = 0.0114$; $F_{(1,48)} = 6.916$ Two-way ANOVA) protein levels (Figure 4B) due to both H₂O-A β and H₂O-veh higher protein levels regarding H₂O- \emptyset animals ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively; Bonferroni posttest). These effects likely result from DMSO toxic effects [40]. Surprisingly, non-injected LiCl-treated animals showed higher levels of these same proteins when compared to their H₂O- \emptyset controls ($p < 0.01$ for both comparisons, Student-t tests). Messenger RNA levels of p53, bax and bcl-2 were not altered ($p = 0.5473$ $F_{(1,88)} = 0.6069$; $p = 0.7313$ $F_{(1,48)} = 0.3149$; $p = 0.8822$ $F_{(1,50)} = 0.1257$ respectively) (Figure 4C). These results suggest a scenario with undetectable alterations on apoptotic-associated proteins that may also resemble early stages of AD.

Discussion

Early AD stages, usually misdiagnosed and confounded with aging associated symptoms, are characterized by subtle cognitive deficits, rising brain A β levels that progressively diffuse and oligomerize until aggregation in fibrils, and tau altered phosphorylation [1] [6] [41].

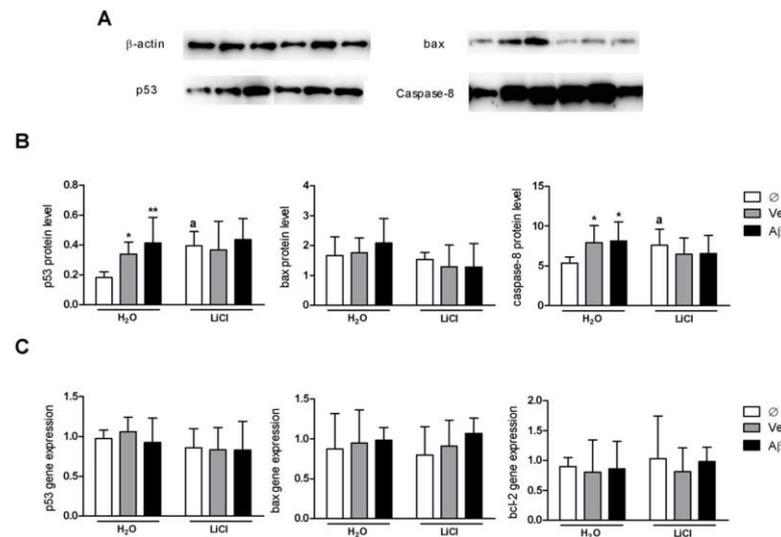


Figure 4. Intraventricular injection alters apoptotic targets. A, representative Western blots showing immunoreactivity of indicated proteins normalized to β -actin. B, Western blots quantification of absorbance (charts were plotted with means and SD). Two-way ANOVA followed by Bonferroni posttest didn't show significant differences ($p = 0.1153$, $F_{(2,41)} = 2.28$ for p53; $p = 0.3063$, $F_{(2,49)} = 1.21$ for bax; $p = 0.4420$, $F_{(2,45)} = 0.83$ for caspase-8; $N = 3$ in triplicates) in A β injected animals compared to their vehicle control group in H₂O or LiCl-treated groups. P53 and caspase-8 levels differed between H₂O-veh and H₂O-A β and noninjected H₂O- \emptyset controls ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). Among noninjected animals, LiCl treatment increased p53 and caspase-8 protein levels compared to their respective H₂O-treated equivalent (a indicates $p < 0.01$ for caspase-8 and $p < 0.0001$ for p53 in Student-t test). C, q-PCR analysis normalized to three constitutive genes (b-actin, rpl13a and e1a) (charts were plotted with means and SD). Two-way ANOVA followed by Bonferroni posttest didn't show significant differences on gene expression ($p = 0.5473$, $F_{(2,88)} = 0.61$ for p53; $p = 0.7313$, $F_{(2,48)} = 0.31$ for bax; $p = 0.8822$, $F_{(2,50)} = 0.13$ for bcl-2; $N = 6$ in duplicates). doi:10.1371/journal.pone.0105862.g004

The absence of robust biomarkers for early diagnosis of AD is a major impediment for cost-effective and successful clinical trials of potential agents that could significantly slow or even prevent disease progression.

We established a straightforward low-cost platform for both biomarker identification and high-throughput preclinical pharmacological screenings in a prominent model organism. In the last decade zebrafish has emerged as a powerful model for drug screenings, genetic studies and disease modeling [22] [42]. In addition to the significant genetic similarity to humans, homologous genes encoding several proteins related to AD were identified [20] [21] [42], including the amyloid precursor protein (APP) with 80% of conservation [20]. This is the first report of A β brain injection in zebrafish, in parallel to Cunvong et al. [28] that injected the same peptide in the retina and Cameron et al. [43] that exposed embryos to amyloid- β 1–42 in the water. The original brain ventricle microinjection protocol from Gutzman and Sive [27] for 24 hpf zebrafish embryos was adapted and proved feasible in large scale, requiring a relatively accessible setup in which trained experimenters injected one embryo every 10 minutes, with no impact on animals survival.

Our behavioral results showed specific cognitive deficits in animals injected with A β peptide, which corroborates with findings in rodent that correlate A β peptide accumulation and memory impairment [44] [45] [46]. Several studies correlate A β -induced cognitive impairments with GSK-3 β phosphorylation of tau protein residues resulting in cytoskeletal disorganization, synaptic loss and axonal disruption [8] [10]. We quantified the amount of early-phosphorylated tau protein and observed an increase on GSK-3 β target residues Ser202 and Thr205 on

animals injected with A β that was reversed by continuous 5dpf lithium exposure. Interestingly, LiCl had positive effects *per se* on cognition and tau basal phosphorylation that support its traditional view as a neuroprotective agent in low doses, with beneficial effects on memory [47] [48], long-term potentiation (LTP) [49] and tau phosphorylation [12] [50]. Those effects may be a result of basal GSK-3 β activity inhibition, as suggested by Noble et al. [50] when observing reduced markers of tauopathy in transgenic mice after lithium. Maguschak and Ressler [51] also used mice to demonstrate a lithium-induced β -catenin increase associated to improved memory formation.

Magdesian and collaborators [9] reported that A β binds to Wnt receptor Frizzled inhibiting the Wnt canonical signaling pathway and therefore permitting GSK-3 β activity. In corroboration with other studies [10] [11] [50] our results suggest that A β is associated with tau-increased phosphorylation by GSK-3 β , reinforcing the therapeutic potential of GSK-3 β inhibitors [12].

Compatible with an early AD scenario, we did not observe any specific effect of A β over protein and gene expression levels associated with apoptosis when A β -injected group was compared to its vehicle-injected controls. We found, however, an increase on p53 and caspase-8 protein levels on both injected groups (vehicle and A β) when compared to non-injected animals, which could be attributed to vehicle components [52] [53] [54]. Hanslick et al. [40] showed that DMSO has an apoptotic effect on mice developing central nervous system exposed to LiCl during the postnatal developmental stages. Surprisingly, our data also showed that lithium treated animals also have increased p53 and caspase-8 when compared to untreated non-injected animals. It is known that both apoptosis [55] and tau-phosphorylation in those residues

[56] occur naturally during development and aging. It is also known that LiCl treatment can play different roles depending on cell type, system and developmental stage [57] [58] [59] [60]. In a developmental changing scenario, where neuron pathways are being formed and connection refinement is necessary [55], opposing effects on apoptotic pathways may be observed. In summary, we showed that A β 1-42 injection in the ventricular region of 24 hpf zebrafish embryos induce cognitive deficits and an increase in tau phosphorylation, which were reversed by lithium incubation. We were not able to identify apoptosis and neurofibrillary tangles in animals submitted to this procedure at 5dpf and subsequent studies using this system should aim to

characterize other cellular processes and molecular targets. We believe our model may represent a straightforward platform useful to identify mechanisms resembling early stage AD and the effect of neuroactive molecules in pharmacological screenings.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LRN VMS CDB MRV. Performed the experiments: LRN NSE CH RF SA HNG. Analyzed the data: LRN SA VMS MRV. Contributed reagents/materials/analysis tools: VMS CDB MRV. Wrote the paper: LRN VMS CDB MRV.

References

- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011) Alzheimer's disease: The challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3: 77sr1.
- Golde TE, Eckman CB, Younkin SG (2000) Biochemical detection of Abeta isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502: 172–187.
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, et al. (2010) Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68: 1067–1081.
- Campioni S, Mannini B, Zampagni M, Pensalfini A, Parrini C, et al. (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol* 6: 140–147.
- Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, et al. (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133: 1328–1341.
- Selkoe DJ (2011) Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med* 17: 1060–1065.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 3: 349–357.
- Mazanetz MP, Fischer PM (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative disease. *Nat Rev Drug Discov* 6: 464–479.
- Magdesian MH, Carvalho MMVF, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, et al. (2008) Amyloid- β binds to the extracellular cysteine-rich domain of frizzled and inhibits wnt/ β -catenin signaling. *J Biol Chem* 283: 9359–9368.
- Sakono M, Zaco T (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J* 277: 1348–1358.
- Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CEJ, Tunbridge EM, et al. (2011) Tau protein is required for Amyloid β -induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 31: 1688–1692.
- Kramer T, Schmidt B, Lo Monte F (2012) Small-molecule inhibitors of GSK-3: Structural insights and their application to Alzheimer's Disease models. *Int J Alzheimers Dis* 2012: 381029.
- Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquin HPG, et al. (2011) Increased platelet GSK3 β activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 45: 220–224.
- Harkany T, O'Mahony S, Kelly JP, Soós K, Tóro I, et al. (1998) Amyloid (Phe(SO₃H)₂₄)_{25–35} in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunction, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav Brain Res* 90: 133–145.
- Yamada M, Chiba T, Sasabe J, Nawa M, Tajima H, et al. (2005) Implanted cannula-mediated repetitive administration of A β -25–35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. *Behav Brain Res* 474: 86–93.
- Van Dam D, De Deyn PP (2011) Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 164: 1285–1300.
- Lenz S, Karsten P, Schulz JB, Voigt A (2013) *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 127: 453–460.
- Li J, Le W (2013) Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Neurol* 250: 94–103.
- Jenkins JL, Urban L (2010) Phenotypic screening: Fishing for neuroactive compounds. *Nat Chem Biol* 6: 172–173.
- Xia W (2010) Exploring Alzheimer's disease in zebrafish. *J Alzheimers Dis* 20: 981–990.
- Newman M, Verdile G, Martins RN, Lardelli M (2011) Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochim Biophys Acta* 1812: 346–352.
- Xi Y, Noble S, Ekker M (2011) Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 274–282.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Bertelot C, et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503.
- Westerfield M (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene: University of Oregon Press.
- CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. (2005) Ottawa: Canadian Council on Animal Care 94p.
- Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E, Berg S, et al. (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119: 1382–1395.
- Gutman JH, Sive H (2009) Zebrafish Brain Ventricle Injection. *J Vis Exp* 26:e1218, doi:10.3791/1218.
- Cuvong K, Huffmire D, Ethell DW, Cameron DJ (2013) Amyloid- β increases capillary bed density in the adult zebrafish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 1516–1521.
- Pelkowski SD, Kapoor M, Richendrer HA, Wang X, Colwill RM, et al. (2011) A novel high-throughput imaging system for automater analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res* 223: 135–144.
- Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb W, Love D (2007) Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin* 38: 384–90.
- Jung H, Kim TH, Lee CR, Seok SH, Park JH, et al. (2011) Effect of fluorescent whitening agent on the transcription of cell damage-related genes in zebrafish embryos. *J Appl Toxicol* 32: 654–661.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 29: 2003–2007.
- Frayse B, Mons R, Garric J (2006) Development of a zebrafish 4-day embryonal bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 63: 253–267.
- Blazina AR, Vianna MR, Lara DR (2013) The Spinning Task: A New Protocol to Easily Assess Motor Coordination and Resistance in Zebrafish. *Zebrafish* 10: 480–485.
- Rankin CA, Sun Q, Gamblin C (2005) Pseudo-phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 affects tau filament formation. *Mol Brain Res* 138: 84–93.
- Liu F, Liang Z, Shi J, Yin D, El-Akkad E, et al. (2006) PKA modulates GSK-3 β and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett* 580: 6269–6274.
- Leng Y, Liang M, Ren M, Marinova Z, Leeds P, et al. (2008) Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 28: 2576–2588.
- Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VMY (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* 8: 783–793.
- Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, et al. (2012) Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Mitrotubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 32: 2430–2441.
- Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, et al. (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* 34: 1–10.
- Dumurgier J, Gabelle A, Vercurysse O, Boambois S, Laplanche JL, et al. (2013) Exacerbated CSF abnormalities in younger patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 54: 486–491.
- Paquet D, Schmid B, Haass C (2010) Transgenic zebrafish as a novel animal model to study tauopathies and other neurodegenerative disorders in vivo. *Neurodegener Dis* 7: 99–102.
- Cameron DJ, Galvin C, Alkam T, Sidhu H, Ellison J, et al. (2012) Alzheimer's-related peptide amyloid- β plays a conserved role in angiogenesis. *PLoS One* 7:e39598.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, et al. (2005) Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8: 79–84.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, et al. (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nat Letter* 440: 352–357.
- Shankar MG, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, et al. (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impairs synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14: 837–842.
- Nojcar C, Hammonds MD, Shim SS (2007) Chronic lithium treatment magnifies learning in rats. *Neurosci* 150: 774–788.

48. Wu YY, Wang X, Tan L, Liu D, Liu XH, et al. (2013) Lithium Attenuates Scopolamine-Induced Memory Deficits with Inhibition of GSK-3 β and Preservation of Postsynaptic Components. *J Alzheimers Dis* 37: 515–527.
49. Voytovich H, Kriváneková L, Ziemann U (2012) Lithium: A switch from LTD- to LTP-like plasticity in human cortex. *Neuropharma* 63: 274–279.
50. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, et al. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6990–6995.
51. Maguschak KA, Ressler KJ (2008) beta-catenin is required for memory consolidation. *Nat Neurosci* 11: 1319–1326.
52. Ryan JJ, Clarke MF (1994) Alteration of p53 conformation and induction of apoptosis in a murine erythroleukemia cell line by dimethylsulfoxide. *Leuk Res* 18: 617–621.
53. Liu J, Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K (2001) Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *Int Immunopharmacol* 1: 63–74.
54. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003) Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65: 1035–1041.
55. Cole LK, Ross LS (2001) Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. *Dev Biol* 240: 123–142.
56. Yu Y, Run X, Liang Z, Li Y, Liu F, et al. (2009) Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem* 108: 1480–1494.
57. D'Mello SR, Anelli R, Calissano P (1994) Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp Cell Res* 211: 332–8.
58. van Gijn ME, Snel F, Cleutjens JP, Smits JF, Blankesteijn WM (2001) Overexpression of components of the Frizzled-Dishevelled cascade results in apoptotic cell death, mediated by beta-catenin. *Exp Cell Res* 265: 46–53.
59. Zhang WV, Jüllig M, Connolly AR, Stott NS (2005) Early gene response in lithium chloride induced apoptosis. *Apoptosis* 10: 75–90.
60. Masebatlela T, Gallicchio V, Becker R (2012) Lithium modulates cancer cell growth, apoptosis, gene expression and cytokine production in HL-60 promyelocytic leukaemia cells and their drug-resistant sub-clones. *Biol Trace Elem Res* 149: 323–330.

4.2 Capítulo 02

4.2.1 Artigo Científico em preparação : Splicing inhibition of Presenilin 1 exon 8 alters aversive behavior in Zebrafish larvae.

Title: Splicing inhibition of Presenilin 1 exon 8 alters aversive behavior in Zebrafish larvae

Autors: Laura Roesler Nery ⁽¹⁾, Natalia Eltz Silva⁽¹⁾, Raphaela Fonseca⁽¹⁾, Monica Ryff
Moreira Vianna⁽¹⁾.

Affiliation: ⁽¹⁾ ZebLab & Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Prédio 12 D, sala 301, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract:

Presenilin-1 mutations are the most common genetic factor related to early onset familial Alzheimer Disease (FAD). Elucidating the molecular role of Presenilin-1 and other hallmark proteins involved in Alzheimer's disease is crucial for the development of new therapeutic treatments. In our study we used a morpholino antisense nucleotide that targets exon 8 splicing site of Presenilin-1 causing a dominant negative protein and characterized an aversive behavior phenotype in 5 dpf larvae. Considering the relation between Presenilin-1 function, Notch and Wnt pathways, we also evaluated the mRNA levels of neurog1 (Notch related gene) and *cnnd1* and *myca* (Wnt related genes). Amyloid- β protein levels and apoptotic protein as p53 and bax were also measured to establish the connection between neuronal death and Alzheimer's Disease markers. Animals with decreased Presenilin-1 function show specific deficits in escape responses to an aversive stimulus and present morphological phenotypes similar to those induced by Notch signaling pathway suppression. Exploring alterations caused by genetic modifications characteristic of FAD patients is fundamental for a better knowledge of this neurodegenerative disease.

Key-words: Presenilin-1, Alzheimer Disease, Aversive Behavior, Zebrafish

Introduction:

Alzheimer Disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease and costs with treatment and diagnosis are increasing with the population aging (HOLTZMAN, MORRIS & GOATE, 2011). Two forms of AD with different prevalence's contributed to our current understanding of the disease: the Familial Alzheimer Disease (FAD) is characterized by genetic mutations in specific target genes and manifests early in life, while the prevalent sporadic form has a later onset (ROBERSON & MUCK, 2006; HUANG & MUCK, 2012). Since the triggering mechanisms behind the sporadic form of AD are unknown, studies have focused on understanding the contribution of the altered genes and its products in FAD. . Both forms share major pathophysiological characteristics, accumulation of Amyloid- β plaques and oligomes, and tau-protein, which also accumulate and form the neurofibrillary tangles. Those aberrant proteins are involved in the causes and progression of this disease, accumulating in the nervous system and causing oxidative stress and neurodegeneration (HOOVER *et al.*, 2010; SAKONO & ZAKO, 2010; FERREIRA & KLEIN, 2011). Despite extensive studies over these two proteins, the mechanisms that trigger their malfunction and their contribution to the behavioral and physiological symptoms that accompany AD progression remain mostly unknown.

Patients with FAD show specific mutations in three different genes related with the disease, including presenilin-1, presenilin-2 and the Amyloid Precursor Protein (APP) (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007). Presenilin-1 is a key component of the γ -secretase enzymatic complex responsible for the cleavage of the APP into Amyloid- β peptide and the APP intracellular domain (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007). Recent studies showed that mutations in the Presenilin-1 gene increased the production of Amyloid- β peptide (FERNANDEZ *et al.*, 2014; NEWMAN *et al.* 2014; WANNNGREN *et al.* 2014). Since γ -secretase is not only responsible for the APP cleavage, but also interacts with the Notch and

Wnt signaling pathways, alteration in this protein also impact memory formation, cell development and differentiation (CAMPBELL *et al.*, 2006; NORNES *et al.*, 2003; NORNES *et al.*, 2008; NORNES *et al.*, 2009; TIJN *et al.*, 2011). Seventy percent of Presenilin-1 mutations observed in AD patients occur over the exon 5 and 8 (NORNES *et al.*, 2008), where the transmembrane domain is located, showing an important function of this domain in the cleavage of the APP (NORNES *et al.*, 2008).

Several animal models mimicking the genetic mutations observed in FAD patients have been established and contributed to our growing knowledge about the molecular underlying mechanisms of AD (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007; VAN DAM & DE DEYN, 2011; CAVANAUGH, PIPPIN & BARNARD, 2014). Zebrafish is a prominent animal model that emerged in the last decades due to several methodological advantages, including gene knock-out technology using TALENs or CRISPRs (HWANG *et al.*, 2013; SCHIMID & HAASS, 2013) and protein knock-down through morpholinos antisense oligonucleotides (morpholinos) (BILL *et al.*, 2009). Both approaches have been used in zebrafish aiming to understand the role of presenilin-1 during development (NORNES *et al.*, 2003; NORNES *et al.*, 2008; NORNES *et al.*, 2009; SUNDVIK, CHEN & PANULA, 2013). Our study shows that altering presenilin-1 splicing of the exon 8 in zebrafish larvae induces specific cognitive deficits.

Material and Methods:

Animals and Ethics

Adult wild types were used for mating in a ratio of 2 males for 1 female. Those animals were kept in a recirculating system with system water (Reverse Osmosis equilibrated with Instant Ocean salt) and a day-night cycle of 14/10 hours (WESTERFIELD, 2000). They were feed 3 times a day with dry food and brine shrimp and water quality parameters including

conductivity, pH and temperature (27°C) were monitored (WESTERFIELD, 2000). The night before mating males and females were separated by a transparent barrier that was removed in the following morning. After 30 min the fertilized embryos were cleaned from debris and placed in petri dishes with system water for morpholino injection. All procedures and protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-PUCRS, permit number 0107/12), followed the directions of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) for use of fish in research and the Brazilian legislation (COBEA, no.11.794/08).

Morpholino Injections

Zebrafish embryos with 30 min post fertilization were injected with 5nL inside the yolk with a solution of 1%PBS and 0.1%Pheno red. In this solution was added 12.5ng (final concentration in 5nL) of the morpholino sequence for the splicing inhibition of Presenilin-1 exon 8 (5'-GCCAGAAGATCTACACAAGAGCAGG-3') or a morpholino scrambled sequence (5'-CCTCCTACCTCAGTTACAATTTATA-3) (GeneTools). An additional group of not injected embryos was also used as an absolute control. The injections were performed with a micromanipulator (NARISHIGE) attached to a Picoliter injection pump (WARNER INSTRUMENTS) adapted to a stereomicroscope (NIKON). After the injections, animals were placed in petri dishes (50 embryos per dish) and placed in an incubator with light/dark cycle (14/10 hours) and temperature control (27°C) until 5 days post fertilization (dpf). Survival and abnormal morphological characteristics were observed every 24 hours from day 1 to day 5 when the water was changed.

Exploratory Behavior

At 5 dpf zebrafish larvae from all groups were placed in 24 well plate filled with 3mL of system water, 1 larva per well. They were left to acclimate for 2 min and after that the

exploratory behavior was registered using a digital HD webcam (LOGITEC) during 5 minutes. Recorded videos were analyzed using a video tracking software (ANYmaze) and the total distance travelled, mean speed, time spent in the outside area of the well and pathway absolute body turn angles were the main parameters examined for the analysis.

Aversive Behavior

After the exploratory behavior, larvae from the 3 experimental groups were placed in a 6 well plate, 5 larvae per well, and exposed to an aversive stimulus (protocol adapted from Pelkowski et al. 2011, following Nery et al. 2014). For that, 6 well plates were placed over a led screen were a PowerPoint presentation with an aversive stimulus consisting of a red bouncing ball on the bottom half of each well oscillated from left to right. The number of animals that efficiently avoided the stimuli hemisphere was the main parameter for cognitive escape responses in consecutive trials.

Western Blot

Protein extraction and quantification was performed according to Nery *et al.* 2014. 5dpf larvae had their encephalon dissected (pool of 20 animals, N=3 in triplicates) and stored at -80°C in protease inhibitor cocktail (SigmaAldrich). Samples were homogenized with RIPA (SigmaAldrich) and run for protein separation on 12% SDS-polyacrylamide gel with sample buffer (0.025% BPB). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 5% bovine albumen on TBST. Primary Antibodies were diluted on the blocking solution at the following concentrations: Rb- β -actin (Anaspec; 1:1000); Rb-p53 (Anaspec; 1:1000); Rb-bax (Anaspec; 1:750) and Ck-amyloid- β (Cell Signalling; 1:500); and incubated overnight, washed three time with TBST and incubated for 1 hour with secondary antibody diluted in 5% Albumin in TBST at the concentrations of Goat-anti-Rabbit IgG

(SigmaAldrich; 1:2000) and Goat-anti-Mouse IgG (Abcam; 1:2000). Membranes were washed with TBST, incubated with ECL (Abcam) and scanned for further densitometric quantification of replicated gels with an imaging software (Carestream). Total protein levels were normalized according to each sample's β -actin levels.

Real Time RT-PCR

RNA isolation and cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's instruction. Briefly, 5dpf larvae had their encephalon dissected (pool of 20 animals, N=6 in duplicates) placed in TRIzol (Invitrogen), frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C. mRNA was isolated and cDNA were synthesized with SuperScriptTMIII First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen).

For all genes, qRT-PCRs were performed using SYBR green dye. Standard reactions were performed with a total 25 μ L per well, on an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system, and the primer final concentration were 0.1 μ M. The primers sequences were described previously by Tang [24] for constitutive genes: b-actin1 F: 5'-CGAGCTGTCTTCCCATCCA-3', R: 5'-TCACC-AACGTZGCTGTCTTTCTG-3'; efla F: 5'-CTGGAGGCCAGCTCAAACAT-3', R: 5'-ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCA TTAC-3'; and rpl13a F: 5'-TCT-GGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3', R: 5'-AGACGC ACAATCTTGAGAGCAG-3'. Primers for the target genes were designed using using the program Oligos 9.6: myca F: 5'-CAACAGGCATGTGAAGCAGCGCAAG-3'; R: 5'-GCAG CTTTCTCGTTATTTGCGACCTC-3'; Ccmd1 F: 5'-GCAGGCAGTGTTGCTGCAGCGG TAC-3'; R: 5'-AGGGTCACTTCTGATGACTTGCGAGAGG-3'; neurogl F: 5' - GCGTTTCCTGACGACACAA - 3'; R: 5' - CCGGATGGTCTCCGAAAGTG - 3'. Amplification and dissociation curves generated by the software were used for gene expression analysis.

Threshold Cycle (Ct) values were obtained for each gene. Following exclusion of non-amplifying samples, raw fluorescence data was exported to the software LinRegPCR 12.x to determine the PCR amplification efficiency of each sample. PCR efficiency of each sample, together with Ct values, was used to calculate a relative gene expression value for each transcript according to Pfaffi (2001).

Statistical Analysis

Survival rate was analyzed by Kaplan-Meyer test. Behavioral analyzed were parametrically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Experimental groups were designed with 10 animals per group in triplicates (Nery et al. 2014). The level of significance was considered $p < 0.05$. Graphs are represented as average between experimental animals and standard deviation.

Results:

Animals were daily evaluated during the first 5 days of development and Kaplan-Meyer survival curve showed statistical significant differences between injected groups and absolute controls beginning at the first day (Log-rank (Mantel-Cox) test, $p < 0.0001$, $N = 20$ in triplicate) (Figure 1). When comparing the injected control (scrambled) and the Presenilin-1 morpholino injected animals, no difference was observed during the 5 days, suggesting no detrimental effect of the gene splicing alteration (Figure 1). Morphological and developmental abnormalities were also accompanied (Table 1) for comparison with other studies that used the same morpholino and reported a phenotype with lack of pigmentation, expansion of the head and yolk, and heart edema formation (Nornes et al. 2008). Our results showed an increase in those anatomical abnormalities during embryo development and also in larvae, corroborating previously described effects of Presenilin-1 morpholino on development.

At 5dpf animals were submitted to two behavioral tasks, first, their general locomotor and exploratory abilities were observed. Animals were individually evaluated in a circular arena (1 well of a 24 well plate) that was divided in two areas (outer ring and inner circle), taking in consideration the distance travelled, mean speed during the 5 minutes, time spent in the outer area (thigmotaxis) and path absolute turn angle. None of these parameters showed statistical difference when groups were compared using one-way ANOVA (Figure 2).

After the exploratory evaluation, groups of 5 larvae were placed inside a well of a 6 well plate and evaluated regarding their escape responses to an aversive stimuli, in this case a red bouncing ball on the bottom half area of the well (protocol adapted from Pelkowski et al. 2011 following Nery et al. 2014). Animals injected with Presenilin-1 morpholino showed reduced escape responses when compared to absolute control animals and scrambled injected animals (one-way ANOVA $p < 0.0001$; $F_{(2,80)} = 25.37$; $N = 10$ in triplicates) that spent significantly more time in the non-stimuli area.

(data from cellular and molecular experiments are currently being gathered and analyzed to be included in the manuscript final version)

Discussion:

Presenilin-1 is one of the key proteins responsible for APP cleavage producing the toxic AD hallmark Amyloid- β peptide and understanding how it impacts a complex scenario and interacts with other proteins to induce the disease symptoms is only feasible in a living organisms. Mutations in the Presenilin-1 gene are present in 70% of patients diagnosed with early onset of FAD (NORNES *et al.*, 2008), this make Presenilin-1 gene the most common genetic factor in these cases. The majority of conserved mutations in Presenilin-1 gene cause exon 8 or 9 lost through aberrant splicing alterations (NORNES *et al.*, 2008) and these genetic

deletions were observed to be dominant through AD population (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007). Studies reported that malfunction of this protein can cause not only Amyloid- β peptide levels increase, but also disruption of important pathways such as Notch and Wnt (NORNES *et al.*, 2003; NORNES *et al.*, 2008; NORNES *et al.*, 2009). During development, Notch pathway is responsible for cellular differentiation and migration crosstalking with several pathways and γ -secretase activity have an important role on Notch processing and activity (NORNES *et al.*, 2003; NEWMAN *et al.*, 2014). γ -secretase is responsible for Notch intracellular subunit release that will activate gene expression in the nucleus (NORNES *et al.*, 2003; NEWMAN *et al.*, 2014). Nornes and colleagues (2008) modeled different exon loss from Presenilin-1 using morpholinos directed to splicing sites producing potent dominant negative effects in this protein and as consequence, causing Notch signaling failure.

Results from two studies demonstrated that Presenilin-1 is also necessary for the degradation of β -catenin (KANG *et al.*, 2002), a protein involved in the Wnt pathway, and that deficiency of Presenilin-1 function can cause β -catenin accumulation (XIA *et al.*, 2001). In 7dpf zebrafish larvae Sundvik *et al.* (2013) observed that knocking out Presenilin-1 increased β -catenin levels and also disturbed exploratory behavior. Also in 2004, Parisiadou and colleagues revealed a relation between cell adhesion molecules like cadherins and cellular stabilization regulated by Presenilin-1.

Since β -catenin and cadherins are tightly involved with memory formation underlying synaptic plasticity and behavioral patterns (MAGUSCHAK & RESSLER, 2008) our aversive results using a morpholino that causes proteolytic cleavage activity deficits could be at least partially attributed to increased β -catenin levels and modulation of neuronal activity. Our morphological observations are very similar to those reported in the Nornes study (2008), also suggesting it could somehow be related to presenilin impact in Notch signaling.

Our results show, for the first time, that similar alterations on the exon 8 of Presenilin-1 cause cognitive deficits in zebrafish larvae, as well as abnormal morphological characteristics. These discoveries observed in an animal model that resembles genetic modifications of those found in FAD reinforces zebrafish as a potential tool for AD research.

References:

- BILL, B.R., PETZOLD, A.M., CLARK, K.J., SCHIMMENTI, L.A., EKKER, S.C. A primer for morpholino use in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 6, p. 69-77, 2009.
- CAMPBELL, W.A., YANG, H., ZETTERBERG, H., BAULAC, S., SEARS, J.A., LIU, T., WONG, S.T.C., ZHONG, T.P., XIA, W. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, p. 1423-1440, 2006.
- CAVANAUGH, S.E., PIPPIN, J.J., BARNARD, N.D. Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. **ALTEX**, v. 31, p. 279-302, 2014.
- CCAC guidelines on: **the care and use of fish in research, teaching and testing**. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 2005, 94p.
- COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Estatuto**. Available in: <<http://www.cobea.org.br>> Accessed in: December of 2014.
- FERNANDEZ, M.A., KLUTKOWSKI, J.A., FRERET, T., WOLFE, M.S. Alzheimer presenilin-1 mutations dramatically reduce trimming of long amyloid β -peptides ($A\beta$) by γ -secretase to increase 42-to-40-residue $A\beta$. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, p. 31043-31052, 2014.

- FERREIRA, S.T., KLEIN, W.L. The A β oligomer hypotesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 529-543, 2011.
- HOLTZMAN, D.M., MORRIS, J.C., GOATE, A.M. Alzheimer's disease: The challenge of the Second Century. **Science**, v.3, p.77sr1, 2011.
- HOOVER, B.R., REED, M.N., SU, J., PENROD, R.D., KOTILINEK, L.A., GRANT, M.K., PITSTICK, R., CARLSON, G.A., LANIER, L.M., YUAN, L.L., ASHE, K.H., LIAO, D. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. **Neuron**, v. 68, p. 1067-1081, 2010.
- HUANG, Y., MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v.148, p. 1204-1222, 2012.
- HWANG, W.Y., FU, Y., REYON, D., MAEDER, M.L., TSAI, S.Q., SANDER, J.D., PETERSON, R.T., YEH, J.R., JOUNG, J.K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v, 3, p.227-229, 2013.
- KANG, D.E., SORIANO, S., XIA, X., EBERHART, C.G., DE, STROOPER, B., ZHENG, H., KOO, E.H. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. **Cell**, v. 110, p. 751–762, 2002.
- MAGUSCHAK, KA., RESSLER, KJ. β -catenin is required for memory consolidation. **Neture Neuroscience**, v. 11, p.1319-1326, 2008.
- NERY, L.R., ELTZ, N.S., HACKMAN, C., FONSECA, R., ALTENHOFEN, S., GUERRA, H.N., FREITAS, V.M., BONAN, C.D., VIANNA, M.R. Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. **PLoS One**, v. 9, p. e105862, 2014.

- NEWMAN, M., MUSGRAVE, F.I., LARDELLI, M. Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 285-297, 2007.
- NEWMAN, M., WILSON, L., VERDILE, G., LIM, A., KHAN, I., NIK, S.H.M., PURSGLOVE, S., CHAPMAN, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Differential, dominant activation and inhibition of Notch signalling and APP cleavage by truncations of PSEN1 in human disease. **Human Molecular Genetics**, v.23, p. 602–617, 2014.
- NORNES, A., GROTH, C., CAMP, E., EY, P., LARDELLI, M. Developmental control of Presenilin 1 expression, endoproteolysis, and interaction in zebrafish embryos. **Experimental Cell Research**, v. 289, p. 124-132, 2003.
- NORNES, S., NEWMAN, M., VERDILE, G., WELLS, S., STOICK-COOPER, C.L., TUCKER, B., FREDERICH-SLEPTSOVA, I., MARTINS, R., LARDELLI, M. Interference with splicing of Presenilin transcripts has potent dominant negative effects on Presenilin activity. **Human Molecular Genetics**, v. 17, p. 402-412, 2008.
- NORNES, S., NEWMAN, M., WELLS, S., VERDILE, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Independent and cooperative action of Psen2 with Psen1 in zebrafish embryos. **Experimental Cell Research**, v. 315, p. 2791-2801, 2009.
- PARISIADOU, L., FASSA, A., FOTINOPOULOU, A., BETHANI, I., EFTHIMIOPOULOS, S. Presenilin 1 and cadherins: stabilization of cell-cell adhesion and proteolysis-dependent regulation of transcription. **Neurodegenerative Diseases**, v. 1, p. 184-191, 2014.
- PELKOWSKI, S.D., KAPOOR, M., RICHENDRFER, H.A., WANG, X., COLWILL, R.M., CRETON, R. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in Zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v.223, p. 135-144, 2011.

- PFAFFI, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time PT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, p. 2003–2007, 2001.
- ROBERSON, E.D., MUCK, L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*, v.314, p. 781-784, 2006.
- SAKONO, M., ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *The FEBS Journal*, v. 277, p. 1348-1358, 2010.
- SCHMID, B., HAASS, C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, p. 461-470, 2013.
- SUNDBVIK, M., CHEN, Y. C., AND PANULA, P. Presenilin1 regulates histamine neuron development and behavior in zebrafish, danio rerio. *Journal of Neuroscience*, v. 33, p. 1589-1597, 2013.
- TJIN, P.V., KAMPHUIS, W., MARLATT, M.W., HOL, E.M., LUCASSEN, P.J. Presenilin mouse and Zebrafish models for dementia: Focus on neurogenesis. *Progress in Neurobiology*, v. 93, p. 149-164, 2011.
- VAN DAM, D., DE DEYN, PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, p. 1285–1300, 2011.
- WANNGREN, J., LARA, P., OJEMALM, K., MAIOLI, S., MORADI, N., CHEN, L., TJERNBERG, L.O., LUNDKVIST, J., NILSSON, I., KARLSTRÖM, H. Changed membrane integration and catalytic site conformation are two mechanisms behind the increased A β 42/A β 40 ratio by presenilin 1 familial Alzheimer-linked mutations. *FEBS Open Bio*, v. 4, p. 393-406, 2014.
- WESTERFIELD, Monte. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene: University of Oregon Press, 2000. Available in: http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html Accessed in: December of 2014.
- XIA, X., QIAN, S., SORIANO, S., WU, Y., FLETCHER, A.M., WANG, X.J., KOO, E.H.,

WU, X., ZHENG, H. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. **Proceedures of the National Academy of Science U S A**, v. 98, p. 10863-10868, 2001.

Table and Figures:

Percentage of animals with morphological alterations									
Developmental alteration	1dpf			2dpf			3dpf		
	Control	Scrambled	Presenilin-1	Control	Scrambled	Presenilin-1	Control	Scrambled	Presenilin-1
Head size	0	5.02	10.95	0	1.00	7.76	0.5	1.00	2.86
Yolk size	0	6.53	12.86	0	4.52	5.71	2.5	2.01	6.66
Eyes size	0	1.51	3.81	0	0.50	0.48	0.5	0.50	2.38
Yolk pigmentation	0	5.53	3.81	0	2.51	2.38	0.5	0	0.48
Lack of body pigmentation	0	1.51	0.48	0	2.01	0.95	0	0.50	0
Eyes absence	0	0	0	0	0.50	0.48	0	0	0.47
Lack of eye pigmentation	0	2.51	2.86	0	0.50	0.95	0	0	0
Heart edema	0	1.00	3.33	0	2.01	3.81	2	1.51	5.71
Tail deformities	0	7.03	9.05	0	5.02	8.09	1	2.01	5.71

Percentage of animals with morphological alterations						
Developmental alteration	4dpf			5dpf		
	Control	Scrambled	Presenilin-1	Control	Scrambled	Presenilin-1
Head size	2	0.50	1.90	2.5	1.50	2.85
Yolk size	2.5	1.51	4.28	2.5	1.50	5.23
Eyes size	1.5	0.50	2.38	2	0.50	1.90
Yolk pigmentation	0.5	0	0.48	1	0	0.48
Lack of body pigmentation	0	0	0	0	0	0
Eyes absence	0	0	0	0	0	0
Lack of eye pigmentation	0	0	0	0	0	0
Heart edema	2.5	1.50	5.24	2.5	2.01	3.81
Tail deformities	0.5	3.01	5.24	3.5	2.51	4.28

Table 1: Abnormal morphological characteristics during 5 days of development.

Abnormal morphological characteristics as Head size, Yolk size and pigmentation, Eye size, absence and pigmentation, Body pigmentation, Heart edema and Tail deformities were considered and Presenilin-1 animals had an increase in those abnormalities.

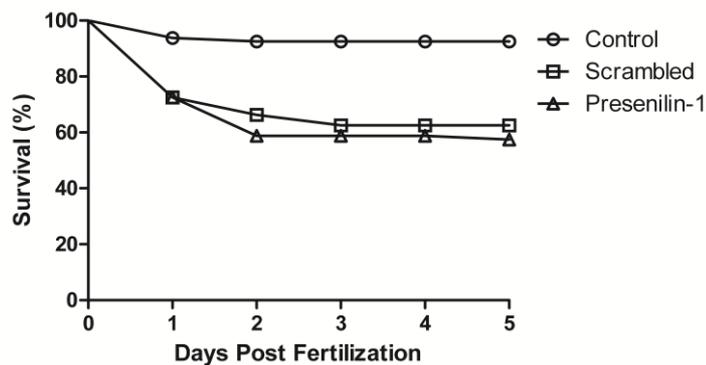


Figure 1: Kaplan-Meyer Survival Curve. All groups had their survival rate observed during the 5 days of development in intervals of 24 hours. It was observed a statistical survival

decrease when comparing injected animals (scrambled and Presenilin-1) with the absolute control using Kaplan-Meyer survival comparison (Log-rank (Mantel-Cox) test, $p < 0.0001$, $N = 20$ in triplicate).

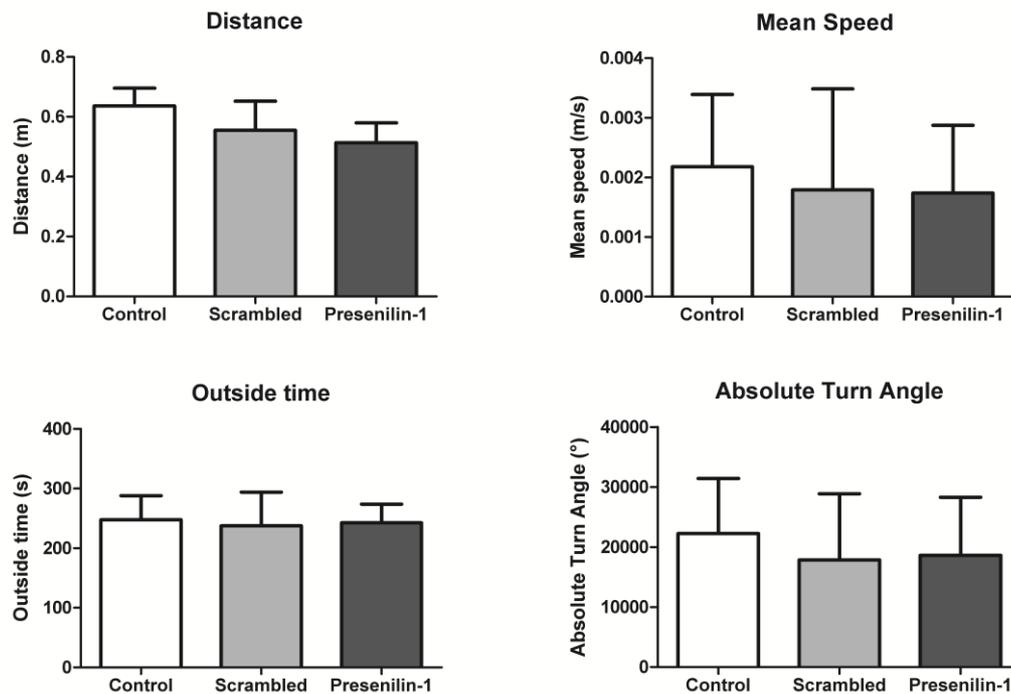


Figure 2: Exploratory behavior. At 5 dpf larvae from all three groups were submitted to an exploratory task. There were no statistical differences between groups when comparing the total distance travelled ($p = 0.4685$; $F_{(2,79)} = 0.7657$; $N = 10$ in triplicates), mean speed ($p = 0.4019$; $F_{(2,79)} = 0.9224$; $N = 10$ in triplicates), absolute turn angle ($p = 0.2067$; $F_{(2,79)} = 1.640$) and Time spent in the outside area ($p = 0.6842$; $F_{(2,79)} = 0.3813$). Charts were plotted with means and SD.

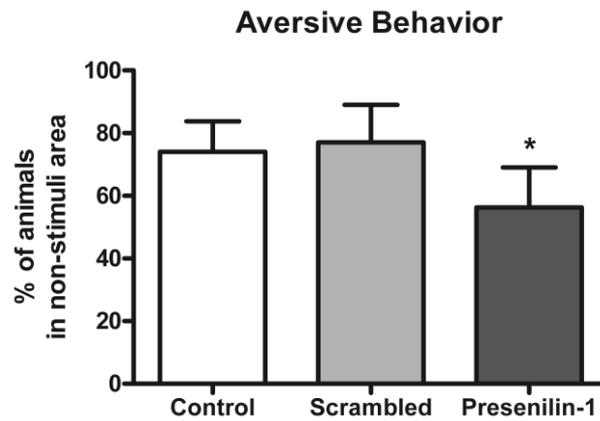


Figure 3: Aversive Behavior. Aversive behavior was measured by effective escape to the non-stimuli area. One-way ANOVA showed that Presenilin-1 Mo-injected animals showed a decreased escape from the stimuli area to the non-stimuli area when compared to the Control and Scrambled groups ($p < 0.0001$; $F_{(2,80)} = 25.37$; $N = 10$ in triplicate). Charts were plotted with means and SD escape responses to a non-stimuli area; (* indicates $p < 0.001$ different from Control and from Scrambled).

4.3 Capítulo 03

Dados produzidos durante Doutorado Sanduíche realizado na University College London, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2014, sobre a supervisão do Prof.

Dr. Stephen Wilson e Prof. Dr. Jason Rihel.

Bolsa: PDSE - CAPES

Nos últimos anos, o zebrafish vem emergindo como um modelo animal ideal para manipulações genéticas e screenings farmacológicos e morfológicos. Com este potencial para realização de knock-outs e knock-ins este modelo tem se sobressaído entre outros animais para o entendimento da presença de diferentes genes e proteínas envolvidos na DA. Durante o período de doutorado sanduíche propomos a realização de dois animais geneticamente modificados como descritos abaixo. O aprendizado das técnicas realizadas durante este período será de grande valia para a realização das mesmas no Brasil, visto que ainda são escassos os estudos e a produção de animais transgênicos e mutantes no país.

4.3.1 *Produção de um animal knock-out do gene Appb (TALEN)*

A proteína APPb possui 6 diferentes transcritos em *zebrafish*, mas através de comparações das sequencias utilizando Ensembl (Gene Appb: ENSDARG00000055 543) (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/), foi constatado que todas elas possuíam o primeiro éxon. Para tanto desenvolvemos TALENs que teriam como alvo a sequencia de pares de base do éxon 1 (5'- CCTGCTGTTAATGCTGA-3'). Zifit targeter (<http://zifit.partners.org/zifitbeta/>) foi empregado para obtenção da identidade dos plasmídeos utilizados com a sequencia de ambos os braços do TALEN para o gene Appb. Os vetores de expressão contendo a cadeia constante (*backbone*) das diferentes sequencias para produção do TALEN estão disponíveis e foram obtidos através da empresa Addgene (<http://www.addgene.org>). Para a produção do braço *foward* foi utilizado o vetor pJDS78 e para o braço *reverse* pJDS74. Esses vetores foram incubados individualmente com as sequencias específicas para ligação ao gene Appb na região do éxon 1 (*Foward*: 5'- TATGGACCGCACGGTATT-3'; *Reverse*: 5'- CGACTTTGTCCCTCGCCA-3'). Esses plasmídeos foram então clonados em células DH5a (REYON *et al.*, 2012).

Após a inserção do plasmídeo em células DH5a, essas células foram plaqueadas em meio LB acrescido de AMP e deixadas para crescer. Foram escolhidas 12 colônias por vez para realização do *screen* para a presença da sequência do TALEN através de RT-PCR utilizando os primers: oSQT34 (5'-GACGGTGGCTGTCAAATACCAAGATATG-3') e oSQT35 (5'-TCTCCTCCAGTTCACCTTTTGACTAGTTGGG-3'). As reações de RT-PCR foram observadas em gel de agarose (FIGURA 5A) e os produtos, cujo peso molecular estava correto, foram selecionados e realizada uma nova reação de RT-PCR com os mesmos *primers* para purificação utilizando o kit QIAquick nucleotide removal (QIAGEN), e envio para sequenciamento com os primers: oSQT1 (5'-AGTAACAGCGGTAGAGGCAG-3') e oSQT3 (5'-ATTGGGCTACGATGGA CTCC-3'), específicos para as sequencias dos TALENs. Essas sequencias foram comparadas com a sequencia utilizada para realização do design dos TALENs. Após obtenção dos braços *forward* e *reverse* com a sequencia correta para realização da dupla quebra de DNA foi realizada a preparação do RNAm para injeção.

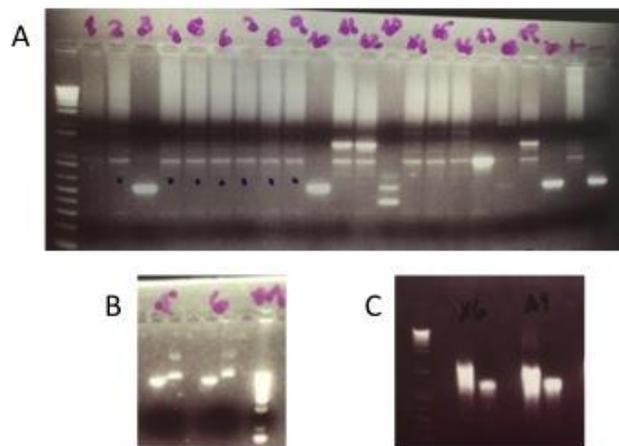


Figura 5 Compilação de géis de agarose demonstrando o tamanho da banda esperada para o número de pares de bases da sequencia do TALEN para o gene Appb (A), poços 1,2,4-9, 14-16. A linearização do plasmídeo (B) e a adição da cauda PoliA (C).

Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) e foi utilizado o kit T7 mMESSAGE mMACHINE (Ambion) para digestão do plasmídeo. Primeiramente foi realizada a sua linearização utilizando a enzima PmeI que foi checada em gel de agarose (FIGURA 5B) e a completa transcrição do DNA em mRNA foi realizada através da enzima T7 do kit mMESSAGE. Após a transcrição foi adicionada uma cauda poliA (Poly(A) Tailing Kit, Applied Biosystems) e foi confirmada a sua adição através de gel de agarose (FIGURA 5C). O RNA foi purificado utilizando RNeasy mini (QIAGEN) e o produto quantificado para injeção nos embriões.

O RNA purificado foi injetado em embriões no estágio de uma célula com cerca de 1nl (concentração de 100ng/nl). Foram injetados 110 animais para o gene Appb. Cem animais foram colocados na maternidade para se desenvolverem até a idade adulta e 10 animais obtiveram seu DNA extraído em 24hpf e foi realizada uma análise de melting utilizando o Precision Melt Supermix (BioRad) onde é medida a temperatura de dissociação da dupla fita de DNA. Como é possível observar na figura 6, os animais injetados com o TALEN (verde) obtiveram uma curva de melting diferente dos animais que não foram injetados (vermelho) indicando a ocorrência da quebra de dupla fita (FIGURA 6).

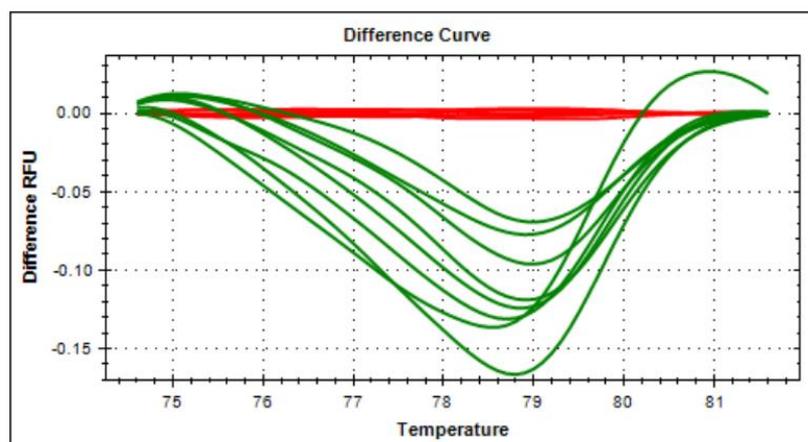


Figura 6 Curva de melting demonstrando diferentes picos de dissociação entre os animais que não foram injetados (vermelho) e animais que foram injetados (verde) com o TALEN para o gene Appb.

Quando na idade adulta (3 meses de desenvolvimento), os animais que haviam sido injetados (F0) foram analisados com relação as alterações no genoma que ocorreram decorrentes da quebra de dupla fita. Para tanto foi obtida uma amostra de DNA através da técnica de fin-clip e foi realizada a análise das sequencias do gene *Appb* através de *deep-sequencing*. Para esta análise foi utilizada uma série de reações de PCR que adicionaram braços nas sequencias alvo de DNA e após o sequenciamento foi realizada a análise das sequencias obtidas através do programa Geneious (<http://www.geneious.com>). Dentre os animais F0 foi encontrado um cuja dupla quebra de DNA ocasionou a produção de um stop-códon no éxon 1 da sequencia de DNA do gene *Appb* (FIGURA 7). Para testar se essa mutação seria passada para as linhagens seguintes, esse animal foi cruzado com um animal selvagem e 10 embriões tiveram seu DNA extraído, foi realizada uma reação de PCR utilizando *primers* que flanqueiam a região onde ocorreu a dupla quebra de DNA, o produto foi purificado utilizando duas enzimas, Exonuclease I (BioLabs) e SAP, Shrimp Alcaline Phosphatase (Affymetrics) e sequenciado.



Figura 7 Alinhamento realizado no programa Geneious mostrando a sequencia do gene *Appb* em comparação com as sequencias obtidas da analise de deep-sequencing. Em preto estão evidenciadas as sequencias de pares de base que ao serem traduzidas para aminoácidos darão origem a um stop-códon.

Após o sequenciamento do DNA genômico deste animal, foi realizada a comparação deste com o DNA genômico esperado de um animal selvagem (FIGURA 8). Observamos que o *knock-out* do gene *Appb* foi realizado com sucesso. Este animal (F0) foi cruzado com um animal Selvagem para produção de uma prole heterogênia (F1) que será utilizada futuramente para estudos comportamentais e moleculares para melhor entender o papel dessa proteína no desenvolvimento normal e na Doença de Alzheimer.

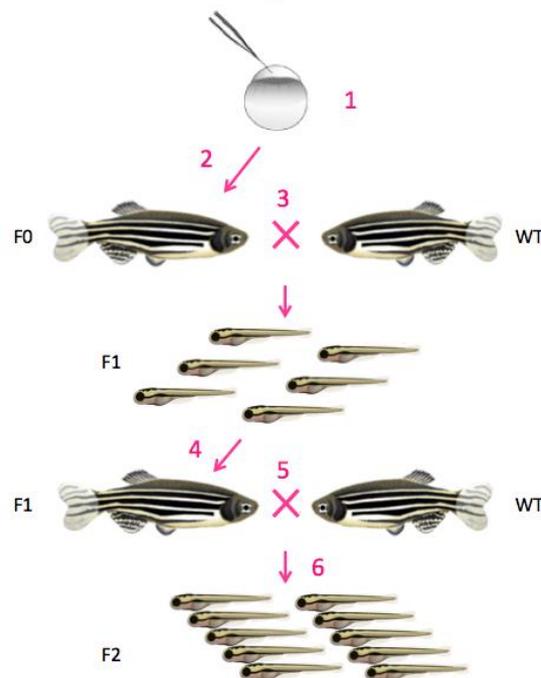


Figura 8 Produção de linhagens de zebrafish knock-in e knock-out. Para ambas as técnicas é realizado uma série de reproduções e genotipagens para estabelecer uma linhagem estável. Para tanto é necessário realizar a injeção do plasmídeo em um embrião selvagem (1); após é necessária a manutenção do animal até a idade reprodutiva (3-4 meses) (2); é realizado o cruzamento dos animais que foram sequenciados positivos para a alteração genética com outro selvagem (3); a prole (F1) é mantida até a idade adulta (3-4 meses) para genotipagem (4); é realizada a genotipagem através de amostra da nadadeira e cruzamento dos animais positivos com animais selvagens (5) que dará origem a população F2 (heterogênea) será utilizada nos experimentos (6)

4.3.2 Produção de um animal knock-in com expressão da proteína A β regulada por heat-shock

Linhagens de *zebrafish* foram geradas contendo a sequência do peptídeo APP que sinaliza a direção do peptídeo para a membrana plasmática, a sequência de 42 pares de base da proteína β -amilóide, ambas de *zebrafish*, precedida pela sequência do promotor *heat-shock* (HS-promoter) como descrito na figura 9. Para a realização da inserção desta sequência no genoma dos animais utilizamos o sistema Tol2 de transferência de vetores (KAWAKAMI, 2007). O elemento Tol2, identificado no genoma do peixe Medaka (*Oryzias latipes*), codifica um *transposon* funcional que, juntamente com uma *transposase*, tem a habilidade de catalisar a inserção de um vetor com até 11kb no genoma. Embriões no estágio de uma célula foram co-injetados com o plasmídeo contendo o vetor (desenvolvido a partir da técnica de clonagem GATEWAY) flanqueado pelas sequências do elemento Tol2 e o mRNA codificante da *transposase* formando a população F0 (FIGURA 8).

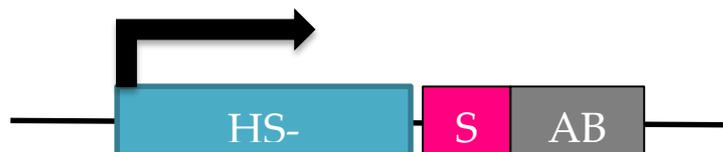


Figura 9 Esquema contendo o promotor heat-shock (HS-promoter) e a sequência do β -amilóide (AB) contendo o peptídeo sinalizador (SP).

Quando adultos foi obtida uma amostra de tecido desses animais através da técnica de *fin-clip* e o DNA genômico foi extraído (80 μ L de NaCl 100mM, 30min à 95°C e a reação foi parada adicionando 20 μ L de Tris HCl 1M pH7.5) e foi realizada uma reação de RT-PCR utilizando *primers* para a sequência do promotor *heat-shock*. Após confirmação da presença do gene através de eletroforese com gel de acrilamida, os animais F0 foram separados e

sequenciados para obtenção da sequência introduzida no genoma através do plasmídeo. Esses animais foram utilizados para a reprodução e geração da população F1 que foi subsequentemente submetida as mesmas análises acima para confirmação da presença do gene e sua capacidade de transmitir essa modificação genômica para as células germinativas (FIGURA 8-3). Estes animais serão submetidos à um aumento de temperatura do ambiente (de 27°C para 37°C) quando o promotor *heat-shock* será ativado, aumentando a expressão gênica nesta região, fazendo com que ocorra um aumento na expressão do gene que codifica a proteína β -amilóide. Após esse procedimento, será quantificada através de RT-PCR em tempo real a concentração do mRNA e estes animais serão submetidos a diferentes testes comportamentais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as doenças neurodegenerativas mais prevalentes a DA se sobressai sendo a forma de demência com maior incidência na população idosa (NEWMAN *et al.*, 2011; Alzheimer's Disease International, 2014). Devido ao aumento da expectativa de vida e por consequência o aumento da incidência da DA, os custos com tratamento e diagnóstico desta doença tem crescido mundialmente (Alzheimer's Disease International, 2014). Novos estudos para entender os processos de desenvolvimento da doença e os mecanismos moleculares que regulam as alterações ocasionadas pela DA devem ser realizados para a produção de novos fármacos que possam retardar ou interromper o processo de neurodegeneração. A geração de novos modelos animais que ao mesmo tempo possam elucidar os mecanismos celulares e moleculares da doença e também os aspectos comportamentais descritos em humanos tem sido o foco principal de estudos em diferentes doenças que envolvem o Sistema Nervoso.

A proteína β -amilóide tem um papel central nos estudos científicos relacionados a DA (ALLSOP *et al.*, 1988; SELKOE, 1989; HARDY & HIGGINS, 1992), visto que, outras proteínas que estão alteradas em pacientes, como a tau, também estão alteradas em outras doenças neurodegenerativas (HUANG & MUCK, 2012). Com o objetivo de entender melhor o papel da β -amilóide na progressão da DA, propomos um novo modelo utilizando embriões de *zebrafish*. Em nosso estudo realizamos a injeção de oligômeros solúveis de β -amilóide no ventrículo cerebral de embriões de *zebrafish* com 24hpf. Observamos que mesmo após 4 dias da intervenção (aos 5dpf), aspectos comportamentais e moleculares foram alterados. De acordo com estudos anteriores realizados em camundongos com o mesmo tipo de intervenção, oligômeros da proteína β -amilóide foram capazes de alterar a formação e consolidação de memórias (CLEARY *et al.*, 2005; LESNE *et al.*, 2006; SHANKAR *et al.*, 2008).

Juntamente com os efeitos comportamentais observados em nosso modelo, foi também caracterizado o aumento de proteína tau fosforilada nos resíduos alvos da GSK3 β . Estes resíduos são conhecidos por estarem entre os primeiros a serem fosforilados durante a progressão da DA e são responsáveis pela dissociação da proteína tau dos microtúbulos causando o acúmulo da mesma no citoplasma e a formação dos emaranhados neurofibrilares (MAZANETZ & FISCHER, 2007; SAKONO & ZACO, 2010). Com esses resultados resolvemos testar o efeito do LiCl, um fármaco já conhecido pelo seu efeito neuroprotetor e pela sua interação com a GSK3 β (NOBLE *et al.*, 2005). Observamos que os animais tratados com LiCl reverteram os efeitos comportamentais causados pelo β -amilóide e como esperado, inclusive os controles obtiveram uma melhora na resposta ao estímulo aversivo ao qual foram submetidos. Com relação ao aumento da fosforilação da proteína tau, os animais tratados com LiCl tiveram uma diminuição nos níveis em relação a todos os grupos que não foram tratados com LiCl.

Marcadores apoptóticos também foram examinados, mas não foram observadas alterações significativas e persistentes. Nossa hipótese com relação a estes resultados é de que apesar dos efeitos comportamentais e em relação à fosforilação da proteína tau, desenvolvemos um modelo que se assemelha o cenário inicial da DA o qual é caracterizado pelo aumento da proteína β -amilóide, alteração nos níveis de fosforilação da proteína tau que originam a formação dos emaranhados neurofibrilares, presença de estresse oxidativo e pouca perda neural (COLE & ROSS, 2001; YU *et al.* 2009; CAMPIONI *et al.*, 2010; SELKOE, 2011). Ainda, no nosso modelo, por estarmos utilizando um animal modelo durante o processo de desenvolvimento quando ocorrem alterações nas estruturas celulares e teciduais (COLE & ROSS, 2001), alterações específicas de neurodegeneração se tornam difíceis de serem reconhecidas e extraídas do cenário complexo e proeminentemente proliferativo no qual estão ocorrendo.

Juntamente com as observações realizadas neste novo modelo proposto em *zebrafish*, realizamos a padronização da técnica de *knock-down* utilizando sequencias de oligonucleotídeos morfolinos anti-senso. Esta técnica foi padronizada pela primeira vez em nosso laboratório com o objetivo de realizar alterações no *splicing* do éxon 8 da proteína Presenilina-1 (NORNES *et al.*, 2008). Estudos recentes demonstraram que esta proteína quando alterada pode ocasionar um aumento atividade enzimática do complexo proteico da γ -secretase, a qual a Presenilina-1 faz parte, aumentando a produção da proteína β -amilóide (NEWMAN *et al.*, 2014).

Nornes e colaboradores (2008) padronizaram uma série morfolinos direcionados a diferentes éxons focando na interferência da realização de *splicings* da Presenilina-1. Quando eles utilizaram um morfolino que impedia a inclusão do éxon 8 na proteína, observaram um aumento na produção da mesma e por consequência inibição da via Notch em embriões de *zebrafish*. O receptor Notch é um dos mais importantes durante o desenvolvimento embrionário sendo responsável pela ativação de vias de proliferação e diferenciação celular, sendo um dos principais responsáveis pela diferenciação neuronal (NORNES *et al.*, 2003). Seus mecanismos moleculares são altamente conservados evolutivamente e estudos demonstraram que alterações na atividade da presenilina-1 e por consequência da gama-secretase demonstraram que estas estão intimamente ligadas ao processamento do receptor e alteram a translocação do domínio intracelular para o núcleo (NORNES *et al.*, 2003; NEWMAN *et al.*, 2014). Devido a essas observações, achamos que seria interessante estudar os efeitos comportamentais em embriões de *zebrafish* que tivessem alterações nesta região.

Observamos em nosso estudo, que embriões injetados com esse morfolino, e por consequência com alterações na região do éxon 8 da Presenilina-1, desenvolveram alterações morfológicas semelhantes a animais com inibição da via Notch, como aumento da região encefálica, diminuição da pigmentação e problemas durante a somitogênese causando defeitos

na cauda. Com esses resultados corroborando achados anteriores, avaliamos a capacidade cognitiva destes animais através de uma tarefa aversiva e observamos que estes animais não respondiam à um estímulo aversivo da mesma maneira que os controles.

Não sabemos ainda se essas alterações comportamentais foram causadas por alterações na via Notch, na via Wnt ou pelo aumento da produção de proteína β -amilóide. Com estas especulações pretendemos investigar essas vias de sinalização neste modelo com a finalidade de entender melhor por quais mecanismos, tais modificações em determinadas regiões da Presenilina-1 podem estar colaborando com o desenvolvimento da DA.

Assim como a Presenilina-1, o estudo da APP também tem dado origem à diferentes especulações sobre a origem genética da DA. Estudos com pacientes demonstraram que, não somente mutações no gene da Presenilina-1 estão presentes em indivíduos com FAD (ROBERSON & MUCK, 2006; TJIN *et al.*, 2011), mas também mutações em regiões específicas da APP (ROBERSON & MUCK, 2006; NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007) podem gerar diferentes tamanhos da proteína β -amilóide (NEWMAN, MUSGRAVE & LARDELLI, 2007), podendo dar origem a forma mais tóxica 1-42. Novos modelos utilizando o *zebrafish* vem surgindo nos últimos anos e a utilização de técnicas para alteração genética tanto para a interromper a expressão de um gene, quanto para o aumento da expressão deles estão sendo padronizadas e estão cada vez mais fáceis de serem realizadas.

Durante o período de doutorado sanduíche ainda realizei, junto com a equipe do laboratório supervisionado por Steve Wilson e Jason Rihel na *University College London*, a produção de dois animais transgênicos que poderão no futuro contribuir significativamente para estudos da participação da APP e da β -amilóide não só nos processos de desenvolvimento da DA, mas também no seu papel funcional no organismo saudável. Com a utilização da técnica de TALEN tivemos como alvo o éxon 1 da proteína APPb. Dentre todos os animais os quais sequenciamos e analisamos, encontramos um no qual a clivagem da dupla

fita de DNA realizada pelo TALEN gerou a formação de um stop códon impossibilitando a expressão desta proteína. Em análises preliminares já constatamos que este animal possui alterações na formação dos vasos sanguíneos. Estas alterações corroboram com achados anteriores onde utilizaram morfolinos para inibir a expressão desta mesma proteína (LUNA, CAMERON & ETHELL, 2013).

Juntamente com o *knock-out* da proteína APPb, realizamos a introdução de um promotor *heat-shock* antecipando a sequência de pares de base codificante da proteína β -amilóide. Este animal quando exposto a uma temperatura de 37°C ativa a expressão da proteína *heat-shock* e por consequência a expressão da proteína β -amilóide em grande quantidade. Com este animal poderemos estudar o papel da proteína β -amilóide sem a interferência de outras vias de sinalização como no caso da Presenilina-1 ou da Appb.

Dentro de todas as abordagens realizadas nesta tese, temos a perspectiva de ainda combinar elas entre si, possibilitando a avaliação das diferentes vias estudadas aqui e suas capacidades de interação a nível celular e molecular. Poderemos assim entender se as alterações causadas pelo *knock-out* da proteína APPb podem ser resgatadas pela injeção da proteína β -amilóide, assim esclarecendo o papel de ambas no desenvolvimento do *zebrafish*.

Extrapolando nossos resultados, nossos modelos da DA em *zebrafish* poderão contribuir não somente para o entendimento do processo inicial da DA, mas também auxiliará no descobrimento de novas vias de sinalização que podem estar alteradas na doença. Ainda mais, com a facilidade de manipulação e cuidados do *zebrafish*, este se torna um animal modelo eficiente para o teste de novos fármacos e na descoberta de novas terapias para o tratamento da DA e de outras doenças neurodegenerativas.

6 PERSPECTIVAS

- Quantificar no modelo de *knock-down* da proteína Presenilina-1 alterações em proteínas relacionadas na progressão da DA, como a β -amilóide e tau fosforilada;
- Avaliar no modelo de *knock-down* da proteína Presenilina-1 alterações em vias apoptóticas;
- Avaliar no modelo de *knock-down* da proteína Presenilina-1 alterações nas vias Wnt e Notch através de quantificação dos níveis de proteína e mRNA;
- Caracterizar a participação da APP no desenvolvimento dos animais *knock-out* levando em consideração a via Wnt;
- Caracterizar o efeito do aumento de expressão da proteína β -amilóide nos animais *knock-in* levando em consideração as vias de sinalização alteradas na progressão da DA;
- Avaliação comportamental exploratória e da capacidade aversiva dos animais *knock-out* para a proteína APP e *knock-in* para a β -amilóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alzheimer's Disease International (<http://www.alz.co.uk>), acessado em dezembro de 2014.

ALLSOP, D., WONG, C.W., IKEDA, S., LANDON, M., KIDD, M., GLENNER, G.G. Immunohistochemical evidence for the derivation of a peptide ligand from the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.85, p. 2790-2794, 1988.

ARKING, R. **Biology of Aging: Observations And Principles**. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers, 1998, 410p.

BAI, Q., BURTON, E.A. Zebrafish models of Tauopathy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 353-363, 2011

BEDELL, V.M., WANG, Y., CAMPBELL, J.M., POSHUSTA, T.L., STARKER, C.G., KRUG, R.G., TAN, W., PENHEITER, S.G., MA, A.C., LEUNG, A.Y., FAHRENKRUG, S.C., CARLSON, D.F., VOYTAS, D.F., CLARK, K.J., ESSNER, J.J., EKKER, S.C. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. **Nature**, v. 491, p. 114-118, 2012.

BILL, B.R., PETZOLD, A.M., CLARK, K.J., SCHIMMENTI, L.A., EKKER, S.C. A primer for morpholino use in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 6, p. 69-77, 2009.

CAMERON D.J., GALVIN C., ALKAM, T., SIDHU, H., ELLISON, J., LUNA, S., ETHELL, D.W. Alzheimer's-related peptide Amyloid- β plays a conserved role in angiogenesis. **PLoS ONE**, v.7, e39598, 2012.

CAMPBELL, W.A., YANG, H., ZETTERBERG, H., BAULAC, S., SEARS, J.A., LIU, T., WONG, S.T.C., ZHONG, T.P., XIA, W. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, p. 1423-1440, 2006.

CAMPIONI, S., MANNINI, B., ZAMPAGNI, M., PENSALFINI, A., PARRINI, C., EVANGELISTI, E., RELINI, A., STEFANI, M., DOBSON, C.M., CECCHI, C., CHITI, F. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 140-147, 2010.

CHASSEIGNEAUX, S., DINC, L., ROSE, C., CHABRET, C., COULPIER, F., TOPILKO, P., MAUGER, G., ALLINQUANT, B. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. **PLoS One**, v.6, p. e16301, 2011

CHEN, R., DING, W.V., MCCORMICKS, F. Wnt Signaling to β -catenin Involves Two Interactive Components. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 17894-17899, 2000.

CIRRITO, J.R., YAMADA, K.A., FINN, M.B., SLOVITER, R.S., BALES, K.R., MAY, P.C., SCHOEPP, D.D., PAUL, S.M., MENNERICK, S., HOLTZMAN, D.M. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. **Neuron**, v. 48, p. 913-922, 2005

CLEARY, J.P., WALSH, D.M., HOFMEISTER, J.J., SHANKAR, G.M., KUSKOWSKI, M.A., SELKOE, D.J., ASHE, K.H. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 79–84, 2005.

COLE, L.K., ROSS, L.S. Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. **Developmental Biology**, v. 240, p. 123–142, 2011.

COREY, D.R., ABRAMS, J.M. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. **Genome Biology**, v. 2, p.1015.1-1015-03, 2001.

CROWTHER, D.C., KINGHORN, K.J., MIRANDA, E., PAGE, R., CURRY, J.A., DUTHIE, F.A., GUBB, D.C., LOMAS, D.A. Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 132, p.123–135, 2005.

CUVONG, K., HUFFMIRE, D., ETHELL, D.W., CAMERON, D.J. Amyloid- β increases capillary bed density in the adult zebrafish retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, p. 1516-1521, 2013.

DE FELICE, F.G., WU, D., LAMBERT, M.P., FERNANDEZ, S.J., VELASCO, P.T., LACOR, P.N. BIGIO, E.H., JERECIC, J., ACTON, P.J., SHUGHRUE, P.J., CHEN-DODSON, E., KINNEY, G.G., KLEIN, W.L. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1334-1347, 2008.

DE STROOPER, VASSAR, R., GOLDE, T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, p. 99–107, 2010.

DECKER, H., LO, K.Y., UNGER, S.M., FERREIRA, S.T., SILVERMAN, M.A. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3 β in primary cultured hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 9166-9171, 2010.

DEMURO, A., MINA, E., KAYED, R., MILTON, S.C. PARKER, I., GLABE, C.G. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 17294-17300, 2005.

DENTE, L., GESTRI, G., TSANG, M., KUDOH, T., WILSON, S.W., DAWID, I.B., ANDREAZZOLI, M. Cloning and developmental expression of zebrafish pdzrn3. **The International Journal of Developmental Biology**, v.55, p.989-993, 2011

FERREIRA, S.T., KLEIN, W.L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 529-543, 2011.

GOLDGABER, D., LERMAN, M.I., MCBRIDE, O.W., SAFFIOTTI, U., GAJDUSEK, D.C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. **Science**, v. 235, p.877-880, 1987.

GÖTZ, J., ITTNER L.M. Animal Models Of Alzheimer's Disease And Frontotemporal Dementia. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 532-544, 2008.

HAN, M., LIU, Y., TAN, Q., ZHANG, B., WANG, W., LIU, J., ZHANG, X.J., WANG, Y.Y., ZHANG, J.M. Therapeutic efficacy of stemazole in a beta-amyloid injection rat model of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 657, p. 104-110, 2011.

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

HARPER, A.E. Nutrition, Aging And Longevity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, p. 737-749, 1982.

HOLTZMAN, D.M., MORRIS, J.C., GOATE, A.M. Alzheimer's disease: The challenge of the Second Century. **Science**, v.3, p.77sr1, 2011.

HUANG, Y., MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v.148, p. 1204-1222, 2012.

KAISER, D.M., ACHARYA, M., LEIGHTON, P.L., WANG, H., DAUDE, N., WOHLGEMUTH, S., SHI, B., ALLISON, W.T. Amyloid beta precursor protein and prion protein have a conserved interaction affecting cell adhesion and CNS development. **PLoS One**, v. 7, p. e51305, 2012.

KAWAKAMI, K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. **Genome Biology**, v.8, Suppl 1:S7, 2007.

KLEIN, P.S.; MELTON, D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.16, p.8455-8459, 1996.

KLUGER, A., GIANUTSOS, J.G., GOLOMB, J., FERRIS, S.H., GEORGE, A.E., FRANSSEN, E., REISBERG, B. Patterns of Motor Impairment In Normal Aging, Mild Cognitive Decline, and Early Alzheimer's Disease. **Journal of Gerontology**, v.52, p. 28-39, 1997.

LENG, Y., LIANG, M., REN, M., MARINOVA, Z., LEEDS, P., CHUANG, D. Synergistic Neuroprotective Effects of Lithium and Valproic Acid or Other Histone Deacetylase Inhibitors in Neurons: Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2576-2588, 2008.

LESNE, S., KOH, M.T., KOTILINEK, L., KAYED, R., GLABE, C.G., YANG, A., GALLAGHER, M., ASHER, K.H. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. **Nature**, v. 440, p. 352–357, 2006.

LIESCHKE, G.L., CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews**, v. 8, p. 353-367, 2007.

LUCAS, J.J., HERNANDEZ, F., GOMEZ-RAMOS, P., MORAN, M.A., HEN, R., AVILA, J. Decreased nuclear β -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 20-27, 2001.

LUNA, S., CAMERON, D.J., ETHELL, D.W. Amyloid- β and APP deficiencies cause severe cerebrovascular defects: important work for an old villain. **PLoS One**, v.8, p. e75052, 2013.

MACCIONI, R.B., MUNOZ, J.P., BARBEITO, L. The Molecular Bases Of Alzheimer's Disease And Other Neurodegenerative Disorders. **Archives of Medical Research**, v.32, p. 367-381, 2001.

MAGDESIAN, M.H., CARVALHO, M.M.V.F., MENDES, F.A., SARAIVA, L.M., JULIANO, M.A., JULIANO, L., GARCIA-ABREU, J., FERREIRA, S.T. Amyloid- β binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/ β -catenin signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 9359-9368, 2008.

MAGUSCHAK, KA., RESSLER, KJ. β -catenin is required for memory consolidation. **Neture Neuroscience**, v. 11, p.1319-1326, 2008.

MAZANETZ, M.P., FISCHER, P.M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, p. 464-479, 2007.

MOORE, D.J., DAWSON, T.M. Value Of Genetic Models In Understanding The Cause And Mechanisms Of Parkinson's Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.8, p. 288-96, 2008.

MORRISSETTE, D.A., PARACHIKOVA, A., GREEN, K.N., LAFERLA, F.M. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 6033-6037, 2009.

NARAYAN, P., EHSANI, S., LINDQUIST, S. Combating neurodegenerative disease with chemical probes and model systems. **Nature Chemical Biology**, v.10, p. 911-920, 2014.

NEWMAN, M., MUSGRAVE, F.I., LARDELLI, M. Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 285-297, 2007.

NEWMAN, M., WILSON, L., CAMP, E., VERDILE, G., MARTINS, R., LARDELLI, M. A Zebrafish melanophore model for amyloid β toxicity. **Zebrafish**, v. 7, p. 155-159, 2010.

NEWMAN, M., VERDILE, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 346-352, 2011.

NEWMAN, M., WILSON, L., VERDILE, G., LIM, A., KHAN, I., NIK, S.H.M., PURSGLOVE, S., CHAPMAN, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Differential, dominant activation and inhibition of Notch signalling and APP cleavage by truncations of PSEN1 in human disease. **Human Molecular Genetics**, v.23, p. 602-617, 2014.

NICOLAS, M., HASSAN, B.A. Amyloid precursor protein and neural development. **Development**, v. 141, p. 2543-2548, 2014.

NOBLE, W., PLANEL, E., ZEHR, C., OLM, V., MEYERSON, J., SULEMAN, F., GAYNOR, K., WANG, L., LAFRANCOIS, J., FEINSTEIN, B., BURNS, M., KRISHNAMURTHY, P., WEN, Y., BHAT, R., LEWIS, J., DICKSON, D., DUFF, K. Inhibition of gliocogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degenerations *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 6990-6995, 2005.

NORNES, A., GROTH, C., CAMP, E., EY, P., LARDELLI, M. Developmental control of Presenilin 1 expression, endoproteolysis, and interaction in zebrafish embryos. **Experimental Cell Research**, v. 289, p. 124-132, 2003.

NORNES, S., NEWMAN, M., VERDILE, G., WELLS, S., STOICK-COOPER, C.L., TUCKER, B., FREDERICH-SLEPTSOVA, I., MARTINS, R., LARDELLI, M. Interference

with splicing of Presenilin transcripts has potent dominant negative effects on Presenilin activity. **Human Molecular Genetics**, v. 17, p. 402-412, 2008.

NORNES, S., NEWMAN, M., WELLS, S., VERDILE, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Independent and cooperative action of Psen2 with Psen1 in zebrafish embryos. **Experimental Cell Research**, v. 315, p. 2791-2801, 2009.

ODDO, S., CACCAMO, A., SHEPHERD, J.D., MURPHY, M.P., GOLDE, T.E., KAYED, R., METHERATE, R., MATTSON, M.P., AKBARI, Y., LAFERLA, F.M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Abeta and synapse dysfunction. **Neuron**, v. 39, p. 409-421, 2003.

PALMER, A.M. Neuroprotective therapeutics for Alzheimer's disease: progress and prospects. **Cell**, v. 32, p. 141-147, 2011.

PAULA-LIMA, A.C., ADASME, T., SANMARTIN, C., SEBOLLELA, C., HETZ, C., CARRASCO, M.A., FERREIRA, S.T. HIDALGO, C. Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca(2+) release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevalent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, p. 1209-1223, 2011.

PETER-DEREX, L., YAMMINE, P., BASTUJI, H., CROISILE, B. Sleep and Alzheimer's disease. **Sleep Medicine Reviews**, ahead of print, 2014.

REYON, D., TSAI, S.Q., KHAYTER, C., FODEN, J.A., SANDER, J.D., JOUNG, J.K. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 460-465, 2012.

RICKLEFS, R.E., FINCH, C.E. **Aging: A Natural History**. New York: Scientific American Library, 1995, 209p.

ROBERSON, E.D., MUCK, L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. **Science**, v.314, p. 781-784, 2006.

SALINAS, P.C., HALL, A.C. Lithium and synaptic plasticity. **Bipolar Disorders**, v.2, p. 87-90, 1999.

SAKONO, M., ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. **The FEBS Journal**, v. 277, p. 1348-1358, 2010.

SANCHEZ-ESPINOSA, MP., ATIENZA, M., CANTERO, JL. Sleep deficits in mild cognitive impairment are related to increased levels of plasma amyloid- β and cortical thinning. **Neuroimage**, v. 98, p. 395-404, 2014

SANDER, J.D., JOUNG, J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 347-355, 2014.

SANJANA, N.E., CONG, L., ZHOU, Y., CUNNIFF, M.M., FENG, G., ZHANG, F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. **Nature Protocols**, v. 7, p. 171-192, 2012.

SCHMID, B., HAASS, C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 461-470, 2013.

SELKOE, D.J. Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Cell**, v.58, p. 611-612, 1989.

SELKOE, D.J. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. **Nature Medicine**, v.17, p. 1060-1065, 2011.

SHANKAR, M.G., LI, S., MEHTA, T.H., GARCIA-MUNOZ, A., SHEPARDSON, N.E., SMITH, I., BRETT, F.M., FARRELL, M.A., ROWAN, M.J., LEMERE, C.A., REGAN, C.M., WALSH, D.M., SABATINI, B.L., SELKOE, D.J. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impairs synaptic plasticity and memory. **Nature Medicine**, v. 14, p. 837-842, 2008.

SHIPTON, O.A., LEITZ, J.R., DWORZAK, J., ACTON, C.E., TUNBRIDGE, E.M., DENK, F., DAWSON, H.N., VITEK, M.P., WADE-MARTINS, R., PAULSEN, O., VARGAS-CABALLERO, M. Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 1688-1692, 2011.

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, p. 13-34, 2008.

STAMBOLIC, V., RUEL, L., WOODGET, J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signaling in intact cells. **Current Biology**, v.6, n.12, p. 1664-1668, 1996.

STUMP, R.J.W., LOVICU, F.J., ANG, S., PANDEY, S.L., MCAVOY, J.W. Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition. **Journal of Pathology**, v.210, p. 249-257, 2006.

TAI, H.C., SERRANO-POZO, A., HASHIMOTO, T., FROSCHE, M.P., SPIRES-JONES, T.L., HYMAN, B.T. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in

Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. **American Journal of Pathology**, v. 181, p. 1426-1435, 2012.

TAKASHIMA, A., NOGUCHI, K., MICHEL, G., MERKEN, M., HOSHI, M., ISHIGURO, K., IMAHORI, K. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I / glycogen synthase kinase-3 beta. **Neuroscience Letters**, v. 203, p. 33– 36, 1996.

TJIN, P.V., KAMPHUIS, W., MARLATT, M.W., HOL, E.M., LUCASSEN, P.J. Presenilin mouse and Zebrafish models for dementia: Focus on neurogenesis. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 149-164, 2011.

TSENG, B.P., GREEN, K.N., CHAN, J.L., BLURTON-JONES, M., LAFERLA, F.M. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1607-1618, 2008.

TSUKUDA, K., MOGI, M., IWANAMI, J., MIN, L.J., SAKATA, A., JING, F., IWAI, M., HORIUCHI, M. Cognitive deficit in Amyloid- β -Injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. **Hypertension**, v. 54, p. 782-787, 2009.

VARELA-NALLAR, L., ALFARO, I.E., SERRANO, F.G., PARODI, J., INESTROSSA, N.C. Wingless-type Family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p. 21164-21169, 2010.

VARELA-NALLAR, L., GRABOWSKI, C.P. ALFARO, I.E., ALVAREZ, A.R., INESTROSSA, N.C. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in the presynaptic differentiation and function. **Neural Development**, v. 4, p. 41, 2009.

WASCO, W., BROOK, J.D., TANZI, R.E. The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. **Genomics**, v.15, p.237-239, 1993.

WOODRUFF-PAK, D.S. Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 15, p 507-521, 2008.

YU, Y., RUN, X., LIANG, Z., LI, Y., LIU, F., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I., GONG, C.X. Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. **Journal of Neurochemistry** v. 108, p. 1480–1494, 2009.