UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NATHALIA REGES PINHEIRO

Estudo comparativo da neuroproteção por anticorpos anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura diferenciada de neuroblastoma humano

Ribeirão Preto

2017

NATHALIA REGES PINHEIRO

Estudo comparativo da neuroproteção por anticorpos anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura diferenciada de neuroblastoma humano

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pinheiro, Nathalia Reges

Estudo comparativo da neuroproteção por anticorpos anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura diferenciada de neuroblastoma humano. Ribeirão Preto, 2017.

65 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Sebollela, Adriano Silva.

1. Doença de Alzheimer. 2. Peptídeo β -amiloide. 3. Oligômeros β -amiloides. 4. Células SH-SY5Y. 5. Anticorpos conformacionais.

Nome: PINHEIRO, Nathalia Reges

Título: Estudo comparativo da neuroproteção por anticorpos anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura diferenciada de neuroblastoma humano

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter dado a vida.

À minha família, pelo amor que nos une e pelos valores morais que nos guiam. Especialmente aos meus pais, Evandro e Vera, meus mentores nesta vida, e ao meu irmão, Victor, o novo universitário da família.

Aos meus amigos de infância e adolescência da turma do banquinho, que tornaram cada ida a Brasília nestes 2 anos mais prazerosa. Especialmente à Pérola, que demonstra constantemente como uma verdadeira amizade é inestimável.

A quem tem se mostrado um grande companheiro, Jadson, pela paciência nos meus momentos de estresse, pelo colo nos momentos de insegurança e pela motivação, apresentando-me a ciência de um jeito que eu ainda não conhecia.

Ao Prof^o Dr. Adriano Silva Sebollela, por aceitar me orientar durante o mestrado e abrir as portas de seu laboratório, tornando possível o começo do meu aprendizado na pesquisa em Bioquímica.

Aos integrantes de nosso grupo de pesquisa, que me auxiliaram no aprendizado técnico para a confecção deste trabalho. Especialmente à Izabela Santos, parceira de bancada, pela paciência com que me iniciou às técnicas básicas em bioquímica que usamos ao longo do projeto, pelas longas horas de trabalho na sala de cultura e pelos desabafos. Agradeço também à Silvana Chedraoui, que sempre foi prestativa em auxiliar na elaboração de nossos experimentos.

Aos amigos que ganhei na pós-graduação, pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa científica que financiaram este trabalho: CAPES e FAPESP.

RESUMO

PINHEIRO, Nathalia Reges. **Estudo comparativo da neuroproteção por anticorpos anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura diferenciada de neuroblastoma humano**. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência na população idosa e tende a se tornar um grave problema de saúde pública com o aumento da expectativa de vida da população mundial. A perda progressiva de memória, principal sintoma da demência em pacientes com DA, é atribuída a danos sinápticos e à perda neuronal desencadeadas pelo desequilíbrio entre a produção e a depuração do peptídeo A β . Evidências surgidas nos últimos 20 anos apontam os oligômeros solúveis de A β (A β O), produtos de agregação do peptídeo A β , como as principais espécies neurotóxicas na DA. Por conta disso, e também pela ausência de métodos diagnósticos *pre-mortem* e tratamento eficientes para essa demência, a busca por anticorpos conformacionais específicos para A β O está em ascensão. Testes clínicos com IgG anti-A β resultaram em efeitos colaterais inflamatórios mediados pela porção não variável Fc. Então, anticorpos conformacionais artificiais do tipo scFv, desprovidos de porção Fc, foram selecionados contra A β O. Dentre eles, está NUsc1, que é neuroprotetor contra A β O em cultura primária de neurônios. Neste trabalho, avaliamos a toxicidade de A β O na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciada em neurônios maduros e comparamos a neuroproteção conferida por diferentes anticorpos contra A β O, por ensaio de viabilidade celular com MTT. Também avaliamos a especificidade de NUsc1 por A β O comparativamente a lisozima monomérica e oligomérica em ensaio de ELISA, já que outros anticorpos conformacionais reconhecem epítipo compartilhado por estados oligoméricos de outras proteínas amiloidogênicas. Para a validação de células SH-SY5Y como modelo *in vitro* de neurônios maduros, a diferenciação foi induzida com ácido retinoico e BDNF e as células foram marcadas para as proteínas MAP2 e NeuN em ensaio de imunofluorescência. Células submetidas ao protocolo de diferenciação apresentaram aumento dos níveis dessas proteínas, mudança morfológica condizente com o esperado na maturação neuronal. Posteriormente, o desafio da cultura com A β O indicou morte celular dose-dependente e reversão desta morte segundo a dose administrada dos anticorpos 6E10 e NU-4. Obtivemos um sinal cerca de 400 vezes maior no reconhecimento de A β O por NUsc1 que para oligômeros de lisozima, quando presentes na mesma concentração, indicando forte especificidade de NUsc1 por A β O. Além disso, NUsc1 purificado em sistema de gel-filtração em HPLC não apresenta citotoxicidade em concentração equivalente a dos anticorpos 6E10 e NU-4 em ensaios de neuroproteção em cultura de SH-SY5Y diferenciada, sugerindo que, se NUsc1 for tão eficiente quanto estas IgG's, este poderá ser usado em dose não citotóxica. Portanto, podemos concluir que NUsc1 apresenta grande potencial como ferramenta diagnóstica e terapêutica para a DA, mas que mais experimentos para expandir sua validação e potencial ainda são necessários.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer (DA). Peptídeo β -amilóide (A β). Oligômeros β -amilóides (A β O). Células SH-SY5Y. Anticorpos conformacionais.

ABSTRACT

PINHEIRO, N. R. **Comparative study of neuroprotection by anti-A β antibodies against the toxicity of A β oligomers in differentiated culture of human neuroblastoma.** 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Alzheimer's Disease (AD) is the leading cause of dementia in the elderly population and tends to become a serious public health problem with increasing life expectancy of the world's population. Progressive memory loss, the main symptom of dementia in patients with AD, is attributed to synaptic damage and neuronal loss triggered by imbalance between production and clearance of the A β peptide. Evidence from the last 20 years indicates that soluble A β oligomers (A β O), A β peptide aggregation products, as the main neurotoxic species in AD. Because of this, and also because of the absence of efficient pre-mortem diagnostic and treatment methods for this dementia, the search for conformational antibodies specific for A β O is on the rise. Clinical tests with anti-A β IgG's resulted in inflammatory side effects mediated by the non-variable Fc portion. Then, artificial conformational antibodies of the scFv type, lacking the Fc portion, were selected against A β O. Among them is NUsc1, which is neuroprotective against A β O in primary neuronal culture. In this work, we evaluated the toxicity of A β O in the differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma line in mature neurons and compared the neuroprotection conferred by different antibodies against A β O types by MTT cell viability assay. We also evaluated the specificity of NUsc1 for A β O compared to monomeric and oligomeric lysozyme in the ELISA assay, since other conformational antibodies recognize epitope shared by oligomeric states of other amyloidogenic proteins. For the validation of SH-SY5Y cells as an *in vitro* model of mature neurons, differentiation was induced with retinoic acid and BDNF and the cells were labeled for MAP2 and NeuN proteins in immunofluorescence assay. Cells submitted to the differentiation protocol presented increased levels of these proteins, a morphological change consistent with the expected neuronal maturation. Subsequently, the challenge of culture with A β O indicated dose-dependent cell death and reversion of this death according to the administered dose of 6E10 and NU-4 antibodies. We obtained a 400-fold higher signal in the recognition of A β O by NUsc1 than for lysozyme oligomers, when present at the same concentration, indicating strong specificity of A β O by NUsc1. In addition, NUsc1 purified on HPLC gel-filtration system does not exhibit cytotoxicity at concentration equivalent to 6E10 and NU-4 antibodies in neuroprotection assays in differentiated SH-SY5Y culture, suggesting that, if NUsc1 is as efficient as these IgG's, it may be used in a non-cytotoxic dose. Therefore, we can conclude that NUsc1 presents great potential as a diagnostic and therapeutic tool for AD, but that further experiments to expand its validation and potential are still necessary.

Keywords: Alzheimer's disease (AD). β -amyloid peptide (A β). β -amyloid Oligomers (A β). SH-SY5Y cells. Conformational antibodies.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Doença de Alzheimer: principais aspectos históricos, epidemiológicos e moleculares.....	11
1.2	Neurotoxicidade de oligômeros do peptídeo β-amiloide.....	14
1.3	Imunoterapia anti-Aβ para a Doença de Alzheimer.....	19
1.4	A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y como modelo experimental	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Diferenciação de células SH-SY5Y	28
3.2	Tratamento de SH-SY5Y diferenciada com oligômeros de Aβ e com anticorpos anti-Aβ.....	30
3.3	Determinação de viabilidade celular por MTT	31
3.4	Determinação de especificidade de NUsc1 por ELISA	31
3.5	Purificação do anticorpo NUsc1 por cromatografia de afinidade e gel-filtração.....	32
3.6	Análise estatística e edição de imagens.....	32
4	RESULTADOS	34
4.1	Análise da diferenciação neuronal de células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	35
4.2	Toxicidade de oligômeros de Aβ em SH-SY5Y diferenciada	36
4.3	Neuroproteção por anticorpos do tipo IgG anti-Aβ contra a toxicidade de oligômeros de Aβ em cultura de SH-SY5Y diferenciada.....	38
4.4	Especificidade do anticorpo anti-Aβ do tipo scFv NUsc1.....	40
4.5	Avaliação da citotoxicidade do anticorpo scFv NUsc1 purificado em cultura de SH-SY5Y diferenciada.....	41
5	DISCUSSÃO	44

6	CONCLUSÕES	52
---	------------------	----

REFERÊNCIAS	54
-------------------	----

ANEXO A – Artigo aceito para publicação: “A <i>human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid-β oligomers</i> ”	65
---	----

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer: principais aspectos históricos, epidemiológicos e moleculares

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência e um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI (SCHELTENS et al., 2016). O envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA e, como não há método diagnóstico *pre-mortem* e tratamento eficientes, a sua prevalência continuará a crescer nos próximos anos, já que avanços na medicina tem propiciado o aumento da expectativa de vida. Análises da incidência da DA na população revelam a possibilidade de epidemia futura, contando com um expressivo aumento de casos em países com economias em desenvolvimento como China, Índia, bem como em países integrantes de América Latina. Prince et al. (2013) estimaram que, até 2050, o número de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos terá aumentado 1,25 bilhões, o que corresponderia a 22% da população mundial, sendo 79% moradores das regiões menos desenvolvidas do planeta. Também foi estimado que em 2010 já havia 35,6 milhões de portadores da DA ao redor do mundo, um cenário projetado para dobrar a cada 20 anos, até pelo menos 2050, quando 115,4 milhões de idosos apresentarão esse quadro (SCHELTENS et al., 2016). Assim, a DA se torna um problema de saúde pública e prevenir a concretização desta epidemia deve se tornar prioridade governamental nas áreas de saúde e de assistência social.

A DA é uma doença crônica de curso médio de 8 a 10 anos, apesar das fases clínicas sintomáticas serem precedidas de estágios pré-clínicos e prodrômicos, que geralmente se estendem ao longo de duas décadas (MASTERS et al., 2015). A DA está associada ao declínio progressivo de cognição, de linguagem e especialmente de memória (KOROLEV, 2014). Os sintomas clínicos iniciais, classificados como o estágio leve da DA, resultam da deterioração de domínios cognitivos seletivos, particularmente aqueles relacionados à memória. O paciente relata a incapacidade de lembrar eventos recentes, incluindo atividades autobiográficas (LAFERLA; GREEN; ODDO, 2007). Com o avanço da doença para o estágio moderado, os indivíduos podem ter maior dificuldade em realizar tarefas cotidianas, como pagar contas, mas ainda podem lembrar detalhes significativos sobre sua vida. No estágio severo da doença, os indivíduos perdem a capacidade de responder ao seu meio ambiente, de se comunicar e, eventualmente, de controlar o movimento. À medida que a memória e as habilidades cognitivas continuam a piorar, mudanças significativas na personalidade podem

ocorrer e os indivíduos dependem ainda mais de ajuda nas atividades diárias (THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017). Esse declínio se torna incapacitante nos estágios finais da doença, levando à absoluta dependência, hospitalização e, inevitavelmente, à morte (SILVA et al., 2014).

Primeiramente descrita por Aloïs Alzheimer em 1907, a DA foi caracterizada pela presença extensa de placas senis e de emaranhados neurofibrilares em histologia cerebral *post-mortem* (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003), até hoje seus principais biomarcadores fisiopatológicos. Além desses, a DA inclui astrogliose, alterações vasculares, inflamação cerebral, assim como estresse oxidativo e perdas sináptica e neuronal, o que a torna uma neuropatologia complexa (DE STROOPER et al., 2016; TERRY; KATZMAN; BICK, 1994).

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, proposta originalmente por Hardy e Higgins (1992), o acúmulo de um peptídeo no cérebro, nomeado como A β , sob a forma de placas senis (fibras insolúveis geradas pela auto-associação desse peptídeo), seria o fator que direcionaria a patogênese da doença, e sua progressão se daria com a formação de emaranhados neurofibrilares da proteína tau, resultante de um desequilíbrio entre a produção e a remoção de A β (HARDY; SELKOE, 2002), o que levaria a um quadro de disfunção sináptica, inflamação, perda neuronal e, por fim, demência.

As causas para o desenvolvimento da DA ainda estão em um laborioso processo de fundamentação, pois envolvem uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais (BLENNOW; DE LEON; ZETTERBERG, 2006). Fatores de risco em potencial incluem diabetes mellitus, hipertensão e obesidade de meia idade, sedentarismo, depressão, fumo e baixo nível educacional (NORTON et al., 2014), os quais também estão relacionados a doenças cerebrovasculares, já reconhecidas como potencial fator de risco no desenvolvimento de DA (ARVANITAKIS et al., 2016; CAI et al., 2015). Estes fatores aumentam a probabilidade de ocorrência e do avanço da DA, porém os fatores genéticos e, principalmente, os moleculares tem maior destaque no seu desencadeamento. Cerca de 1 a 5% de todos os casos de DA documentados derivam da herança de desordens autossomais dominantes familiares (REITZ; MAYEUX, 2014). Pessoas com a forma familiar da DA carregam raras mutações autossômicas dominantes em um dos genes da presenilina (PSEN-1 e PSEN-2), localizados nos cromossomos 1 e 14, ou no gene da proteína precursora amiloide (APP), localizado no cromossomo 21 (KOROLEV, 2014). PSEN-1 e PSEN-2 geram a subunidade catalítica da γ secretase, essencial na clivagem da APP que dá origem ao peptídeo A β . A mutação destes genes causa um processamento alterado da APP, gerando peptídeos β -

amiloides (A β) mais longos ou aumentando a proporção destes, que são mais hidrofóbicos e estão mais propensos à agregação (SCHELTENS et al., 2016).

Contudo, a DA esporádica é o tipo mais comum. Ela corresponde a mais de 95% de todos os casos (REITZ; MAYEUX, 2014) e se instala em média aos 80 anos (MASTERS et al., 2015). A genética da DA esporádica é mais complexa e menos conhecida. Sabe-se que o alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (APOE), localizado no cromossomo 19, é o maior fator de risco genético para o desenvolvimento dessa forma da DA (SILVA et al., 2014). APOE é a principal apolipoproteína carreadora de colesterol e de outros lipídeos essenciais a neurônios no plasma e no SNC (BU, 2009), além de participar do catabolismo normal de lipoproteínas ricas em triacilglicerídeos (MASTERS et al., 2015). Há múltiplas vias que podem explicar a natureza patogênica da APOE4 na DA esporádica, mas a principal é o seu papel na mediação da depuração do peptídeo A β . A APOE4 se liga com menos afinidade ao A β , reduzindo a sua depuração e promovendo seu acúmulo, o que leva à formação de placas senis (BU, 2009; KIM; BASAK; HOLTZMAN, 2009). Portanto, os efeitos pleomórficos da APOE4 mostram que ela tem uma interação complexa com os mecanismos que contribuem para a DA esporádica.

A identificação de β -amiloide em placas senis e de mutações nos genes da APP, da PSEN-1 e da PSEN-2, que levam ao acúmulo de A β e à DA familiar, resultaram na formulação da hipótese da cascata amiloide original. Quando proposta, interpretou-se que o acúmulo de fibras de A β nas placas seria uma consequência dessas mutações e o gatilho para o surgimento das alterações patológicas de tau, este sendo então um evento posterior à deposição de A β , que subsequentemente levaria à morte celular e à demência. Inicialmente, a hipótese amiloide foi bem aceita pela comunidade científica e considerada como fundamento de ambas as formas da DA, familiar e esporádica, pois elas são histologicamente idênticas (presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares) e clinicamente semelhantes (somente o início precoce da DA as difere). Apesar das evidências substanciais que suportam essa hipótese, ela possui limitações. Uma delas está na possibilidade de se questionar se as placas e os emaranhados poderiam ser produtos da neurodegeneração da DA, em vez de sua causa, e ainda permanece obscuro se, e como, os depósitos de A β levam à formação dos emaranhados (REITZ, 2012).

Assim, atualmente se discutem outras hipóteses que consideram uma maior complexidade e multicausalidade da DA (BOYLE et al., 2013). Debate-se que a elevação de A β e de tau fosforilada podem estar relacionadas por mecanismos independentes, mas paralelos, dirigidos por um intermediário comum, o qual ainda deve ser identificado. Um dos

argumentos levantados é que, apesar dos emaranhados de Tau serem um dos biomarcadores da DA e de mutações no gene codificante de tau causarem demência, essas mutações não conduzem à DA (SCHELTENS et al., 2016; SMALL; DUFF, 2008). Na realidade, elas resultam na demência fronto-temporal (DFT) (HUTTON et al., 1998), que, como indicado pelo seu nome, é caracterizada por predominante alteração nas funções cognitivas associadas ao lobo frontal. Além disso, a DFT é histologicamente distinta da DA, pois é caracterizada por emaranhados que ocorrem primeiro em locais extra-hipocampais e, ainda mais importante, o cérebro é desprovido de placas amiloides. Com isso, mostra-se que os emaranhados não são necessariamente consequência do acúmulo de A β e podem agir de forma independente para gerar neurodegeneração. Por outro lado, esses dados indicam também que nem mesmo a intensa formação de emaranhados na DFT é suficiente para induzir a formação de placas amiloides características da DA, isto é, os emaranhados vistos em cérebros com DA provavelmente só surgiram após mudanças no metabolismo de A β e o início da formação de placas senis (HARDY et al., 1998).

Além disso, já foi também reportado que camundongos transgênicos que super-expressam APP e tau humanas mutantes tem aumento da formação de emaranhados neurofibrilares, em comparação com camundongos que somente super-expressam tau, enquanto que a estrutura e o número de placas amiloides nesses animais permanecem inalterados (LEWIS et al., 2001), o que sugere que o processamento alterado da APP ocorre antes das alterações de tau na cascata patogênica da DA.

Estes, e outros resultados, reforçam a hipótese amiloide como a mais aceita pelos pesquisadores, mas, sabendo-se que ela carece de detalhes, ela também tem passado por aperfeiçoamentos. Dessa forma, independentemente de qual hipótese for a verdadeira, o acúmulo e a agregação de A β no cérebro, derivado do processamento sequencial proteolítico da APP, é um evento inicial e central na patogênese da DA e merece ser investigado detalhadamente (BLENNOW; DE LEON; ZETTERBERG, 2006; HARDY; SELKOE, 2002).

1.2 Neurotoxicidade de oligômeros do peptídeo β -amiloide

Já está bem estabelecida a relevância do peptídeo A β na DA, bem como a das enzimas responsáveis pelo processamento de APP em A β . No entanto, o papel preciso de A β , como as conformações neurotóxicas e os mecanismos de sinalização celular, ainda não foi totalmente esclarecido.

O peptídeo A β , composto de 36 a 43 aminoácidos e de massa molecular aproximada de 4kDa, é um produto fisiológico do metabolismo humano e está presente no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de humanos normais ao longo da vida (WALSH; SELKOE, 2007). Esse peptídeo é resultante da clivagem enzimática na face extracelular da proteína transmembranar precursora amiloide (APP) pelas enzimas β -secretase (cliva a extremidade N-terminal do peptídeo) e γ -secretase (cliva a extremidade C-terminal do peptídeo), como descrito na figura 1. A simples presença de A β não é capaz de gerar neurodegeneração; esta só ocorre quando há auto-associação desses peptídeos (WALSH; SELKOE, 2007). Alternativamente, em condições fisiológicas, uma fração significativa da APP é clivada por proteases com atividade de α -secretase e nesta via não é gerado A β (via não-amiloidogênica) (SPENCER; MASLIAH, 2014). Na verdade, este evento resulta na secreção de um domínio extracelular da APP que atua como um fator de crescimento para muitos tipos de células e promove o desenvolvimento de neuritos nos neurônios pós-mitóticos (GRALLE; FERREIRA, 2007).

Figura 1: Processamento da proteína precursora amiloide (APP). A clivagem pela α -secretase inicia a via não-amiloidogênica. Um ectodomínio da APP é gerado (sAPP α) junto de um fragmento C-terminal de 83 aminoácidos, o qual é digerido pela γ -secretase, liberando p3 ao meio extracelular. A via amiloidogênica começa com a clivagem da APP pela BACE-1, gerando sAPP β e C99. Este produto retido é substrato para γ -secretase, formando o peptídeo A β . Fonte: adaptado de Querfurth; LaFerla, 2010.

Atualmente, os biomarcadores em estudo para a DA presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) são A β 42, que indicaria deposição cortical de amiloide; tau total, que reflete a intensidade da neurodegeneração; e tau fosforilada, que se correlacionaria com a presença de emaranhados neurofibrilares (BLENNOW et al., 2010). Houve avanços em

técnicas de imageamento por ressonância magnética e por tomografia de emissão de pósitrons (PET) que possibilitaram a detecção e a quantificação de depósitos amiloides, por meio da marcação das placas com o composto Pittsburgh B em pacientes com comprometimento cognitivo leve (EDISON et al., 2007; JOHNSON, 2006; KLUNK et al., 2004; SIEBNER et al., 2003). Quando esse composto foi apresentado (KLUNK et al., 2004), acreditava-se que a retenção de PiB pudesse auxiliar na decisão do diagnóstico antes do agravamento dos sinais clínicos da DA. Entretanto, surgiram incongruências em relação à retenção de PiB em pacientes clinicamente diagnosticados como portadores de DA. Pacientes com a Demência com Corpos de Lewy, por exemplo, apresentam frequentemente altos níveis de marcação cortical para PiB, pois os agregados de α -sinucleína geralmente estão acompanhados de depósitos amiloides (GOMPERTS et al., 2008). Portanto, PiB não é específico para a DA (DEGERMAN GUNNARSSON et al., 2013). Ainda mais relevante é o fato de PiB só ser capaz de marcar A β fibrilar (BLENNOW et al., 2010), mas não agregados intermediários desse peptídeo (oligômeros de A β), que atualmente são creditados como os responsáveis pela neurodegeneração na DA (LACOR, 2004). Todavia, a introdução de sondas para PET para placas amiloide foi um grande avanço técnico, estabelecendo o precedente de que o imageamento molecular cerebral poderia se tornar uma ferramenta importante para diagnóstico e para o desenvolvimento de novas drogas, o que motivou posteriormente o desenvolvimento de sondas específicas a esses agregados intermediários de A β , presentes nos estágios iniciais da DA (VIOLA et al., 2014).

Monômeros do tipo A β 40 são mais abundantes e existem em uma proporção de concentração de aproximadamente 10: 1 em relação ao A β 42, uma espécie mais hidrofóbica e mais propensa à agregação, por isso predominante nas placas senis (DE STROOPER, 2010; QUERFURTH; LAFERLA, 2010). É reconhecido que os peptídeos A β são capazes de se auto associarem de maneira não covalente em múltiplos estados de montagem, cada qual com efeitos fisiológicos ou fisiopatológicos diferentes (LAFERLA; GREEN; ODDO, 2007). Os monômeros podem se polimerizar por nucleação, formando intermediários curtos, solúveis e metaestáveis, chamados oligômeros, os quais se montam para formar um núcleo oligomérico que pode rapidamente se estender por adição de mais monômeros para formar as protofibras. Finalmente, as protofibras se juntam e formam fibras grandes, insolúveis e ricas na estrutura secundária folha β , que se acumulam em placas (GILBERT, 2013).

Estudos pioneiros demonstraram que peptídeos A β não são tóxicos na forma monomérica, mas o são na forma de fibras (LORENZO; YANKNER, 1994; PIKE et al., 1991). No entanto, foi demonstrado que a quantidade de A β insolúvel em cérebros de

portadores da DA não é diretamente proporcional à severidade da doença ou ao número de placas senis (MCLEAN et al., 1999). Este fato representa outra limitação da hipótese amiloide original. A fim de explicar esses resultados, supôs-se que entidades intermediárias (pequenas, solúveis e metaestáveis) à agregação deveriam ser responsáveis pela perda sináptica durante o estágio inicial da DA, portanto antes da formação de placas. Surge então a hipótese de neurotoxicidade de oligômeros de A β (A β O).

Foi demonstrado que os A β O são tóxicos *in vitro* (LAMBERT et al., 1998) e *in vivo* (WALSH et al., 2002), e que os déficits de aprendizagem e de memória causados por A β O em camundongos transgênicos modelo da DA podem ser reduzidos quando os níveis de A β O são diminuídos pela aceleração da formação de fibras (CHENG et al., 2007). Além disso, foi relatado em modelos animais da DA, que animais que não possuíam placas amiloides cerebrais, mas que eram positivos para A β O, apresentavam sintomas da doença (MEILANDT et al., 2009). Esses achados iniciais em modelos animais são consistentes com descobertas recentes de que níveis de A β O detectados em cérebro humano crescem gradualmente com a idade e são significativos em indivíduos acima de 70 anos (LESNÉ et al., 2013).

Quando a investigação da toxicidade de A β O foi expandida para o tecido cerebral humano *post-mortem*, verificou-se que a quantidade de A β O extraído era até 70 vezes maior na DA em comparação aos controles de idade pareada, correlacionando-se melhor com os sintomas da doença do que com o número de placas amiloides (GONG et al., 2003; MC DONALD et al., 2010; MCLEAN et al., 1999). Foi mostrado ainda que os A β O: estão presentes em concentração elevada no LCR de pessoas portadoras da DA (GEORGANOPOULOU et al., 2005; GONG et al., 2003; SHANKAR et al., 2008); são capazes de se ligar à superfície neuronal, incluindo espinhos dendríticos, e conduzem à perda e à aberração destes (LACOR, 2004; LACOR et al., 2007); internalizam receptores (DE FELICE et al., 2007; ZHAO et al., 2007), hiperfosforilam a proteína estabilizadora de microtúbulos Tau (DE FELICE et al., 2008); provocam estresse oxidativo (DE FELICE et al., 2007); subregulam genes associados à função sináptica (PAULA-LIMA et al., 2011; SEBOLLELA et al., 2012); inibem a potenciação de longa duração (LTP) (LAMBERT et al., 1998); e provocam déficits comportamentais (BROUILLETTE et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2013). Todos esses processos estão presentes na patologia da DA.

Ademais, já foi mostrado que os oligômeros de A β 42 de baixo peso molecular podem se propagar entre neurônios (HARRIS et al., 2010; NATH et al., 2012). Isso pode explicar a progressão da DA, por meio do acúmulo patológico de A β e da deposição de placas amiloides, começando no córtex entorrinal, seguido do hipocampo e das áreas corticais

(BRAAK; BRAAK, 1991, 1996), o que resulta em perda gradativa de memória e em déficits cognitivos observados nos pacientes (BLENNOW; DE LEON; ZETTERBERG, 2006).

O trabalho de Sperling et al. (2011) relata recomendações direcionadas a pesquisadores, desenvolvidas para determinar os fatores que melhor predizem o risco de progressão da cognição "normal" para comprometimento cognitivo leve, seguindo até a demência característica da DA. Nele, reconhecem-se estágios pré-clínicos da DA que envolvem o desenvolvimento de patologia cerebral bem antes da apresentação clínica de DA. Então, com base num conjunto robusto de achados, foi reconhecido que a perda de memória precoce na DA e a demência progressiva são causadas por disfunção de sinalização neural desencadeada por A β O solúveis (KLEIN; KRAFFT; FINCH, 2001; LAMBERT et al., 1998).

A estrutura de A β *in vivo* permanece desconhecida, embora evidências *in vitro* sugiram que, em solução aquosa, ela exista num estado amplamente desordenado, a partir do qual, ocasionalmente, se formem estruturas metaestáveis parcialmente dobradas (FEZOU; TELOW, 2002; HOU et al., 2004; YANG; TELOW, 2008), possivelmente sítios de nucleação para a propagação da polimerização. Muitas formas oligoméricas diferentes de A β podem existir simultaneamente em um equilíbrio dinâmico. Essa falta de uma estrutura terciária estável em condições fisiológicas resulta em uma grande variabilidade conformacional dos A β O, altamente dependente do ambiente em que se encontra.

O termo "A β solúvel" é comumente empregado para descrever os A β O. Ele descreve superficialmente qualquer forma de peptídeo A β que é solúvel em tampão aquoso e que permanece em solução após centrifugação à alta velocidade, excluindo-se a natureza fibrilar da preparação pela ausência de precipitado (WALSH; SELKOE, 2007). Isso evidencia a grande dificuldade que permeia a rotina dos pesquisadores da área em estabelecer com precisão o estado oligomérico e as propriedades físico-químicas desses agregados. O isolamento de A β celular pode incluir uma variedade processos de homogeneização de tecido, de lise celular e de técnicas de extração (algumas incluindo detergentes), muitos dos quais alteram o ambiente e a concentração de A β e sua distribuição oligomérica (HAYDEN; TELOW, 2013). Como consequência, estabeleceu-se uma grande controvérsia a respeito da massa molecular dos A β O tóxicos. Houve relatos de que espécies de baixa massa molecular, como dímeros, trímeros e tetrameros, extraídas de cérebros humanos e de modelos transgênicos seriam aquelas de maior toxicidade (POLING et al., 2008; SHANKAR et al., 2008). Porém, Gong et al. (2003) e Lesne et al. (2006) reportaram a presença de dodecâmeros em extratos solúveis derivados de cérebros humanos com DA e camundongos transgênicos. E ainda, em (2009), Noguchi et al. e Tomic et al. alegaram a existência de A β O tóxicos maiores

que 100 kDa e Sebollela et al. (2014) mostraram espécies de aproximadamente 80kDa em extratos de cérebros humanos. Apesar da demonstração de neurotoxicidade diferencial induzida por A β Os de alta ou baixa massa molecular *in vivo* (BROUILLETTE et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2013), essa incerteza limita a compreensão das bases moleculares e celulares envolvidas na patogênese dos A β O.

É interessante notar que A β Os derivados de cérebro com DA e A β Os sintéticos parecem ser estruturalmente equivalentes (GONG et al., 2003; KAYED et al., 2003; SEBOLLELA et al., 2014), ambos capazes de perturbar a plasticidade sináptica, bem como a aprendizagem e a memória quando injetados em modelos animais (CLEARY et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2013; WALSH et al., 2002).

1.3 Imunoterapia anti-A β para a Doença de Alzheimer

Até hoje, as intervenções terapêuticas para a DA foram limitadas principalmente ao tratamento de sintomas, sem a capacidade de atingir as causas subjacentes ao acúmulo de A β . Estes tratamentos incluem inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas dos receptores de glutamato do tipo ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (TAYEB et al., 2013). Os inibidores da β -secretase foram testados clinicamente na tentativa de reduzir a produção de A β . Essas moléculas pequenas e inibidores peptidomiméticos conseguiram reduzir os níveis plasmáticos e de LCR de A β . Contudo, foi observada toxicidade fora do alvo e neurodegeneração secundária (VASSAR et al., 2014). Como alternativa, os pesquisadores tentaram utilizar o sistema imunológico humano para eliminar o corpo de proteínas potencialmente nocivas ou tóxicas que são produzidas de forma endógena. Dentre os estudos iniciais que apoiaram a imunoterapia para a DA, mostrou-se que os anticorpos anti-A β poderiam inibir a fibrilação do peptídeo A β , desagregar as fibras pré-formadas e prevenir a neurotoxicidade em cultura celular (SOLOMON, 2007; SOLOMON et al., 1997). Surgiu então a ideia de imunização ativa contra A β a partir da vacinação com peptídeos A β 42 sintéticos. Contudo, para a indução de uma resposta imune a esse peptídeo, pode ocorrer uma ruptura na tolerância natural do corpo em não produzir anticorpos ou gerar uma resposta imune contra ele mesmo. Assim, apesar dos pacientes envolvidos nos testes clínicos apresentarem diminuição significativa de placas amiloides no hipocampo, e dos níveis de tau hiperfosforilada, eles também desenvolveram meningoencefalite (SPENCER; MASLIAH, 2014).

As imunoterapias de maior sucesso desenvolvidas para a maioria das doenças humanas contam com anticorpos que possuem alta seletividade para um antígeno em

particular (GOURE et al., 2014). Historicamente, a imunização passiva demonstrou maior sucesso em tratar doenças que apresentam antígenos endógenos (SPENCER; MASLIAH, 2014). Entretanto, atualmente todas as imunoterapias em desenvolvimento clínico voltadas para A β estão baseadas em anticorpos não-seletivos, que se ligam a múltiplas espécies de A β (GOURE et al., 2014). O anticorpo monoclonal Bapineuzumab foi usado na primeira imunoterapia passiva em testes clínicos para a DA, sendo o primeiro anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG, derivado do anticorpo murino 3D6, desenvolvido contra a extremidade N-terminal de A β (resíduos 1-5). Ele tem alta afinidade por monômeros, A β Os e fibras. As vantagens levantadas por aqueles que apostavam nessa estratégia era estimular a depuração de A β no cérebro, independentemente do seu estado oligomérico (GOURE et al., 2014). Porém, na fase de ensaios clínicos de Bapineuzumab, houve pouca melhora cognitiva em pacientes e alguns deles, os que receberam alta dose do anticorpo, desenvolveram edema cerebral vasogênico (SALLOWAY et al., 2014). Houve também redução moderada de tau em LCR e nenhuma redução em A β do LCR (ZETTERBERG et al., 2012), de modo que os ensaios foram interrompidos.

O anticorpo 6E10, do tipo monoclonal, também foi desenvolvido para reconhecer uma região específica do peptídeo A β , com epítipo residindo entre os resíduos de aminoácidos 4-13. Ele foi usado inicialmente nas tentativas de verificar a presença de A β intracelular em cérebro saudável e com DA na década de 1990, mas ele também reconhece APP (AHO et al., 2010, KIM et al., 1990). Atualmente, 6E10 é um anticorpo comercial e é conhecido por reagir com qualquer estado de agregação do peptídeo A β , sendo geralmente usado como controle experimental.

Outros anticorpos anti-A β , não sensíveis ao estado oligomérico (chamados de anti-pan-A β), foram submetidos a testes clínicos, mas falharam em gerar melhoras cognitivas em pacientes com DA leve a moderada (WISNIEWSKI; GOÑI, 2014). Ainda não se sabe explicar o motivo dessas falhas, mas algumas hipóteses foram construídas, as mais aceitas sendo a “drenagem” dos anticorpos por A β monomérico (não tóxico) abundante da corrente sanguínea e no parênquima cerebral, por meio de um efeito competitivo de ligação aos anticorpos entre os monômeros e os oligômeros de A β ; e o tratamento tardio dos pacientes. No caso da segunda hipótese, a dificuldade maior está na ausência de um diagnóstico precoce da DA.

Esse contexto tem motivado a busca por anticorpos conformacionais específicos para A β Os (LAMBERT et al., 2001, 2007a; LEE et al., 2006; VIOLA; KLEIN, 2015). Os anti-A β Os podem ser de alto valor terapêutico contra a DA e fortes ferramentas no estudo de suas

bases moleculares e celulares (LAMBERT et al., 2009). A IgG A11 foi o primeiro anticorpo descrito que se liga aos intermediários de agregação de $A\beta_{40/42}$, mas não a fibras de $A\beta_{40/42}$ ou a $A\beta_{40/42}$ monomérico. Ademais, ele reconhece oligômeros solúveis de outros peptídeos e proteínas amiloidogênicas, como a α -sinucleína, lisozima, poliglutamina, entre outras. A11 é capaz de reverter a toxicidade de oligômeros de $A\beta_{42}$ em células SH-SY5Y em cultura e de se ligar especificamente a extratos e a cortes cerebrais *post mortem* de pacientes com DA (KAYED et al., 2003). Posteriormente, anticorpos monoclonais anti- $A\beta$ O foram gerados através de imunização com preparação oligomérica de $A\beta_{42}$ sintético e selecionados pela capacidade de discriminarem cérebro com DA de cérebro saudável. NU-4 fez parte dessa seleção e faz essa distinção de forma altamente específica. Esse anticorpo também bloqueia a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) em cultura de neurônio hipocampais, prevenindo uma resposta patológica ao tratamento com os $A\beta$ O típica da DA (LAMBERT et al., 2007b).

A forma mais comum de geração de anticorpos anti- $A\beta$ Os é a imunização animal, que gera IgG's murinas que podem ser posteriormente "humanizadas". Outros anticorpos anti- $A\beta$ Os gerados dessa forma foram capazes de neutralizar espécies tóxicas *in vitro* e *in vivo* (LAMBERT et al., 2007; XIAO et al., 2013) e são candidatos a testes clínicos. O uso de anticorpos monoclonais que tem como alvo $A\beta$ O especificamente (conformacionais) pode resolver o problema de falta de translacionalidade dos anticorpos anti- $A\beta$ não sensíveis à conformação e evita a potencial interferência com as formas fisiológicas normais de $A\beta$. Estudos pré-clínicos com anti- $A\beta$ Os sugerem que esta metodologia é potencialmente poderosa e requer um maior desenvolvimento (LAMBERT et al., 2007a, 2009; LEE et al., 2006; MAMIKONYAN et al., 2007; MORETTO et al., 2007).

A tecnologia de *phage display* foi descrita primeiramente por Scott e Smith (1990), através da qual fragmentos de cDNA exógenos são clonados no genoma de um bacteriófago filamentosos para formar uma biblioteca de fagos. Os fragmentos de cDNA são expressos na superfície do bacteriófago e pode-se obter clones de fago ligante de um antígeno de interesse por meio de seleção de algumas etapas direcionadas pelo antígeno, o que permite, por exemplo, a seleção de anticorpos com características específicas (NISSIM et al., 1994; PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010). Assim, essa técnica foi empregada na seleção *in vitro* de ligantes específicos para $A\beta$ Os (LAMBERT et al., 2009), usando-se preparação de $A\beta$ Os sintéticos (CHROMY et al., 2003) como antígeno. Dessa forma, foi selecionada uma coleção de anticorpos artificiais humanizados do tipo scFv com alta afinidade e especificidade por conformações $A\beta$ O denominados NUsc's (SEBOLLELA, 2017; VELASCO et al., 2012).

Um anticorpo de cadeia única, ou tipo scFv (fragmento variável de cadeia única) tem massa molecular de 30kDa e consiste em regiões variáveis de cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L), unidas por um peptídeo flexível de Ser/ Gly (Fig. 2), e pode ser facilmente expresso em forma funcional em *E. coli* (AHMAD et al., 2012).

Figura 2: Tipos de fragmentos de anticorpos. Representação de um anticorpo completo e de vários tipos de fragmentos de anticorpos. CH, cadeia pesada constante; CL, cadeia leve constante; IgG, imunoglobulina; Fab, fragmento de anticorpo ligante de antígeno; scFv, fragmento variável de cadeia única, V_H , cadeia pesada variável; V_L , cadeia leve variável. Fonte: adaptada de Nelson, 2010.

Neste trabalho, usou-se o anticorpo do tipo scFv NUsc1, que já foi relatado como capaz de neutralizar a ligação de A β O tóxicos a neurônios em cultura e de detectar A β O em cortes de cérebro humano de portadores da DA (SEBOLLELA et al., 2017). NUsc1 tem massa molecular de 30kDa, com cadeias conectadas por um curto linker de Ser/Gly. Ele é uma alternativa interessante na imunoterapia da DA por ser uma proteína pequena (1/5 da massa de uma IgG), com biodisponibilidade atraente, de estrutura simples, e pouco imunogênicas, dada a ausência da porção Fc (TURNER; RITTER; GEORGE, 1997; WHITLOW; FILPULA, 1991). Essas características se destacam perante os quadros de baixo alcance ao SNC e resposta inflamatória emergentes nas terapias para a DA com IgG's, além da vantagem de terem baixo custo de produção em larga escala, usando sistema procariótico de expressão.

1.4 A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y como modelo experimental

A linhagem celular imortalizada e proliferativa SH-SY5Y é uma das linhagens celulares mais utilizadas na pesquisa em neurociência. Essa linhagem é derivada da terceira seleção da linhagem SK-N-SH, a qual foi originalmente estabelecida a partir de uma biópsia de medula óssea de um paciente feminino de neuroblastoma de 4 anos (FORSTER et al., 2016). A linhagem SH-SY5Y foi descrita por conter dois fenótipos morfolologicamente distintos: epitelial (tipo S) e neuroblástico (tipo N), que podem sofrer transdiferenciação (ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983), porém a proporção de células do tipo S em relação às do tipo N é baixa. Células do tipo N indiferenciadas são positivas para marcadores enzimáticos de neurônios catecolaminérgicos, enquanto que as do tipo S não apresentam esse tipo de atividade enzimática (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013).

A linhagem SH-SY5Y tem características que torna seu uso conveniente como alternativa à cultura primária de neurônios derivados do sistema nervoso central (SNC) embrionário de mamíferos, pois podem ser propagadas, são cromossomicamente estáveis e, por serem derivadas de células humanas, expressam uma variedade de proteínas específicas de humanos e isoformas proteicas que não estão presentes em culturas primárias de roedores (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016). Este modelo pode ser útil para realizar estudos bioquímicos e moleculares em larga escala devido à sua susceptibilidade à manipulação genética e à disponibilidade de uma quantidade ilimitada de células (ENCINAS et al., 2000).

Apesar de tanto células SH-SY5Y indiferenciadas quanto diferenciadas serem utilizadas como modelo *in vitro* em experimentos que requerem neurônio humanos, as células em cultura dessa linhagem se encontram tipicamente limitadas em um estágio inicial de diferenciação, caracterizado pela presença em baixos níveis de marcadores neuronais, apresentando, portanto, poucas propriedades de neurônios maduros (GILANY et al., 2008). Assim, tendo-se em vista o uso de um modelo translacional *in vitro* consistente, vários protocolos de diferenciação foram desenvolvidos para otimizar as propriedades de SH-SY5Y como modelo de cultura de células neuronais, através dos quais ela adquire fenótipos bioquímico e morfológico neuronal maduro (noradrenérgico ou colinérgico) (AGHOLME et al., 2010; PÅHLMAN et al., 1995).

Os protocolos de diferenciação mais amplamente aceitos envolvem tratamentos com ácido retinoico (AR) em meio de cultura ausente de ou com pouco soro fetal, que pode ser

reforçado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (ARCANGELI et al., 1999; MATSUMOTO et al., 1995). Isso permite que as células do tipo N se diferenciem em neurônios com fenótipo colinérgico, enquanto as do tipo S são contra selecionadas, resultando em uma cultura neuronal homogênea.

Neste trabalho, com base no descrito acima, almejou-se avaliar a toxicidade de A β Os na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y previamente diferenciada em neurônios maduros (AGHOLME et al., 2010) e a neuroproteção comparativa de anticorpos do tipo IgG, NU-4 e 6E10, contra a morte celular induzida por A β Os. Avaliamos também a viabilidade de SHSY-SY diferenciada na presença do anticorpo do tipo scFv NUsc1 sob diferentes graus de purificação, a fim de investigar seu potencial neuroprotetor contra os A β Os. Objetivou-se, também, determinar a especificidade de NUsc1 para os A β Os, visto que já foi descrita a capacidade de anticorpos conformacionais como A11 de reconhecerem oligômeros solúveis de outras proteínas amiloidogênicas (KAYED et al., 2003).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o potencial diagnóstico e terapêutico do anticorpo do tipo scFv NUsc1 na Doença de Alzheimer através da análise de especificidade e neuroproteção contra oligômeros do peptídeo A β ₁₋₄₂ em linhagem neuronal humana SH-SY5Y diferenciada.

2.2 Específicos:

- a) padronizar o protocolo de diferenciação de células SH-SY5Y e de análise de viabilidade dessas células;
- b) determinar a neurotoxicidade de oligômeros de A β em cultura de SH-SY5Y diferenciada;
- c) avaliar a neuroproteção por anticorpos anti-A β do tipo IgG (6E10 e NU-4) contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura de SH-SY5Y diferenciada;
- d) avaliar a viabilidade de SHSY-SY diferenciada na presença do anticorpo do tipo scFv NUsc1 sob diferentes graus de purificação; e
- e) avaliar a especificidade de NUsc1 para oligômeros de A β .

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Diferenciação de células SH-SY5Y

A linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (cedida pelo Prof. Felipe Teixeira, UFSCar) foi cultivada em meio DMEM com 4,5g/L de D-glucose, [+] L-glutamina, [+] piruvato de sódio (Life), suplementado com 100U/L de penicilina e 0,1g/L de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado por temperatura (Hyclone, GE). Esta composição de meio será citada daqui em diante como “DMEM completo”. As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, em uma incubadora COM-194/ CUV-PA (Panasonic). O protocolo de diferenciação celular foi baseado no descrito em Encinas (2000), com algumas modificações. A placa de 96 poços (Costar) foi tratada com 50µL/poço de poli-lisina D a 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich) em água MilliQ, durante 15 minutos na capela de fluxo laminar. Esta solução foi esterilizada por filtração em filtro de 0,22 µm (GE). Seguiu-se a lavagem dos poços com 200µL de água milli-Q autoclavada. No momento da passagem, a monocamada de células foi lavada com PBS e então incubada com 2mL de tripsina-EDTA (0,25%) com fenol red (Gibco), por 3 minutos a 37°C. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de DMEM completo para bloquear a atividade da tripsina. Centrifugou-se a suspensão celular por 4 minutos, a 1000rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 8 mL de DMEM completo. A suspensão celular obtida foi quantificada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Trypan, como descrito por Strober (1997). Diluiu-se a suspensão em solução 0,4% de Azul de Trypan (m/v) na proporção 1:1. Contam-se as células viáveis, isto é, aquelas que não adquirem coloração azul, obtendo-se assim o volume a ser plaqueado para obtenção de 9.000 células viáveis por poço, num volume final de 100µL em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada por 24h para adesão das células. Após esse período, retirou-se o meio DMEM completo e adicionou-se meio DMEM de diferenciação, composto por 0,5% de SFB (v/v), 100U/L de penicilina e 0,1g/L de estreptomicina em DMEM, acrescido de 10 µM de ácido retinóico (All Trans-Retinoic acid, Sigma). As células foram cultivadas nessa condição, por 72h em incubadora. Após, retirou-se o meio e adicionou-se novo meio DMEM de diferenciação, suplementado com 10 µM de ácido retinóico e 50 ng/mL de BDNF (Brain Derived Neural Factor, Sigma). A placa permaneceu em incubadora por mais 96h. O acompanhamento da mudança morfológica das células e seus respectivos registros fotográficos foram realizados em microscópio invertido (Primo Vert, Zeiss).

A análise da diferenciação de SH-SY5Y se deu por imunofluorescência, utilizando-se as proteínas MAP2 e NeuN como marcadores da diferenciação neuronal, como descrito por Langford e Kovalevich (2013). Nesse caso, o plaqueamento ocorreu em placas de 24 poços (Costar), contendo lamínulas tratadas com 300 µL/poço de poli-lisina D a 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich), durante 30 minutos na capela de fluxo laminar. Após esse período, retirou-se a poli-lisina D e lavaram-se os poços com 1mL de água milli-Q autoclavada. Foram plaqueadas 45.000 células por poço. As células diferenciadas ou controle não diferenciadas (usadas 24h após plaqueamento em meio DMEM completo) foram fixadas por lavagem com 1mL de PBS gelado, seguida de incubação com 300 µL por poço por 15 minutos de solução 4% (v/v) de paraformaldeído (estoque a 20%, Electron Microscopy Sciences) e 4% (m/v) de sacarose (P. A., Synth) diluídos em PBS gelado, a temperatura ambiente. Lavaram-se os poços 3 vezes, com 5 minutos por lavagem, com PBS gelado. As células fixadas foram mantidas a 4°C e em 0,02% (m/v) de azida em PBS, ao abrigo da luz, até o início do protocolo de imunomarcação, que foi conduzido em câmara úmida e ao abrigo da luz. Como os antígenos analisados são intracelulares, foi feita permeabilização com 0,5% (v/v) de Triton X-100 em solução de bloqueio, composta por 1% (m/v) de BSA e 0,1% (v/v) de Tween 20 em PBS, por 10 minutos. Seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos com PBS e incubação, por 30 minutos, com a solução de bloqueio. Em seguida, adicionaram-se os anticorpos diluídos em solução de bloqueio. Foram usados os anticorpos primários anti-MAP2 (AB5622, Millipore) e anti-NeuN (clone 60, Millipore) (HERZOG; WEBER, 1978; MULLEN; BUCK; SMITH, 1992), nas diluições 1:500 e 1:100, respectivamente, *overnight*. As lamínulas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS e incubadas no escuro por 1h com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos (Alexa fluor 568 anti-rabbit IgG, Life Technologies; e AlexaFluor 568 antimouse IgG, Life Technologies). Estes foram diluídos em solução 0,1% (v/v) de Tween 20 em PBS na proporção 1:1000. As lamínulas foram lavadas no escuro 3 vezes por 10 minutos com PBS e secas. A marcação nuclear e a adesão da lamínula à lâmina (Knittel Gläser) foram feitas em Prolong com DAPI (Life Technologies). As lâminas foram observadas e registradas em microscópio de fluorescência (Leica), em objetiva com aumento de 40 vezes, e trabalhadas no programa ImageJ.

3.2 Tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com oligômeros de A β e com anticorpos anti-A β

Os oligômeros foram preparados com peptídeos A β_{1-42} , segundo o protocolo de Lambert et al. (1998) e Chromy et al. (2003), com a troca do meio F12 por PBS na ressuspensão do filme de peptídeos A β . Resumidamente, o peptídeo A β comercial (Anespec) foi solubilizado em 50 μ L de hexafluoro-2-propanol (HFIP) gelado. Essa solução foi incubada *overnight* a temperatura ambiente e o HFIP foi removido por evaporação, de forma a gerar filmes de peptídeos estoque, armazenados a -80°C. O filme foi dissolvido a 5mM em 10 μ L de DMSO anidro e, depois, a 100 μ M em 490 μ L de PBS estéril. Seguiu-se homogeneização por breve vortexação e incubação *overnight* a 4°C. A amostra foi então centrifugada por 10 minutos, a 14.000g e a 4°C. Os oligômeros de A β , que estavam no sobrenadante, foram quantificados pelo método de Bradford (1976). A condição aqui denominada “veículo” é um controle da solução na qual os oligômeros foram ressuspensos. Foram usados os anticorpos do tipo IgG 6E10 (BioLegend) e NU-4 [anticorpo monoclonal desenvolvido por Lambert et al. (2007)] e o anticorpo do tipo scFv NUsc1 (VELASCO et al., 2012; SEBOLLELA et al., 2017). O anticorpo NUsc1 foi produzido em *Escherichia coli* HB2151 transformada com o vetor pIT2 clonado com o cDNA de NUsc1 após indução com IPTG. Após expressão, NUsc1 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A (GE) e mantido liofilizado a -20°C para evitar agregação. Imediatamente antes do uso, NUsc1 foi ressuspensado em meio DMEM de tratamento, composto por DMEM com 4,5g/L de D-glucose, [+] L-glutamina, [+] piruvato de sódio, suplementado com 100U/L de penicilina e 0,1g/L de estreptomicina e 0,5% (v/v) de soro fetal bovino inativado por temperatura. Os testes foram conduzidos com NUsc1 nos formatos não purificado e purificado por gel-filtração, numa faixa de concentração de 100nM e 500nM. Em todos os experimentos de tratamento celular com oligômeros de A β e/ou anticorpos, estes foram diluídos em meio DMEM de tratamento, incubados por 30 minutos em banho de gelo, seguidos de incubação a 37°C por 5 minutos, evitando um possível comprometimento da viabilidade celular devido a uma mudança brusca de temperatura do meio de cultura. Então, o meio das culturas foi trocado pelo meio de tratamento, montado segundo a condição em teste, permanecendo por 24h em incubadora, até o ensaio de viabilidade celular. Nas condições controle, em que se considerou viabilidade celular 100%, o meio de diferenciação foi substituído pelo meio DMEM de tratamento, e esta solução se manteve em contato com as células pelo mesmo período que as condições de desafio.

3.3 Determinação de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (MOSMAN, 1983). Esse ensaio colorimétrico é baseado na redução do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma), que é convertido em formazan. As células foram tratadas com 250µg/mL de MTT em meio DMEM de tratamento, por 1h a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e os cristais azuis de formazan foram ressuspensos em 100µL de DMSO por poço por 5 minutos à temperatura ambiente. A medição de absorbância da placa foi feita imediatamente, em espectrofotômetro de placa (Molecular Devices), a 540nm.

3.4 Determinação de especificidade de NUsc1 por ELISA

Nesse ensaio, oligômeros de A β e monômeros e oligômeros de lisozima foram ligados à superfície dos poços de uma placa de ELISA. A agregação de lisozima foi realizada como descrito em Vieira et al. (2007). Em resumo, lisozima de ovo de galinha (Sigma) foi diluída a 10mM em água milliQ e estocada a -20°C. Soluções a 1mM de lisozima foram preparadas a partir do estoque em água milliQ não tamponada a pH 2,0, cujo pH foi ajustado para 1,85 com HCl antes da adição da proteína, resultando num pH final de 2,0. As alíquotas foram incubadas a 65°C por 48h em banho seco para agregação. No preparo da solução de monômeros de lisozima, a solução estoque foi diluída imediatamente antes do início do protocolo do ensaio de ELISA. O acompanhamento da agregação foi feito por medições da turbidez em espectrofotômetro, a 340nm, de alíquotas diluídas 10 vezes. A adsorção dos antígenos na placa ocorreu *overnight* a 4°C, sem agitação, sobre uma superfície plana e ao abrigo da luz. Os poços foram lavados 3 vezes com 300µL de PBS para a adição da solução de bloqueio de sítios de ligação inespecíficos aos anticorpos composta por 3% (m/v) de BSA em PBS. Usaram-se 200µL por poço, durante 1h à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com 300µL de PBS e incubados com os anticorpos NU-4, A11 (Oligomer A11 Polyclonal Antibody, ThermoFischer Scientific) e NUsc1 ligado a fago (pbNUsc1), produzidos como descrito em Velasco et al. (2012) e em Sebollela et al. (2017). pbNUsc1 foi produzido em *Escherichia coli* TG1 após co-infecção com *helper phage* KM13. O sobrenadante que continha pbNUsc1 foi diretamente usado ou parcialmente purificado por precipitação com polietilenoglicol (P.M. 6.000)/ NaCl (BARBAS III et al., 2004). Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio nas proporções 1,5µg/mL, 1:500

e 1:40, respectivamente. Usaram-se 80µL por poço, durante 1h à temperatura ambiente e sob agitação horizontal leve. Os anticorpos secundários conjugados à enzima HRP anti-rabbit IgG (GE), anti-mouse IgG (GE) e anti-fagoM13 (GE) foram diluídos em solução de bloqueio nas proporções 1:3.000, 1:3.000 e 1:5.000, respectivamente. Estes foram incubados por 1h à temperatura ambiente, sob leve agitação horizontal. Lavaram-se os poços 3 vezes com 0.1% (v/v) de Tween20 em PBS e revelou-se a placa com a adição de 75µL do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma), à temperatura ambiente, por 10 minutos e no escuro. A solução adquire coloração azul nos poços em que ocorre oxidação do substrato TMB. Para-se a reação adicionando-se 40µL de 0,5M de ácido sulfúrico em água. Com essa edificação, a coloração azul muda para amarela. A placa foi lida em espectrofotômetro de placa a 450nm. Nos poços reservados para “branco”, não houve adição de anticorpos; e nos reservados para “controle negativo”, adicionou-se veículo de oligômeros de Aβ. Já nos “controle positivo”, adicionou-se NU-4 para oligômeros de Aβ, e A11 para oligômeros de lisozima.

3.5 Purificação do anticorpo NUsc1 por cromatografia de afinidade e gel-filtração

O anticorpo do tipo scFv NUsc1 utilizado nos ensaios de viabilidade celular foi produzido em *Escherichia coli* HB2151 transformada com o vetor pIT2 clonado com cDNA de NUsc1 (SEBOLLELA, 2017). Após expressão, NUsc1 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A (GE) e quantificado por Bradford, utilizando-se curva padrão de BSA diluída em PBS (BRADFORD, 1976). Seguiu-se a purificação de NUsc1 em cromatografia líquida de alta performance na coluna de gel-filtração Biosuit 125Å, 5µm, 7,8mm x 300mm, 5kDa-150kDa, montada em sistema de HPLC (Shimadzu), em tampão PBS a pH 7,0, sob o fluxo de 0,5mL por minuto. Foi feita uma curva de calibração da coluna (dados não mostrados) para se estabelecer o tempo de retenção do anticorpo, usando-se albumina bovina (66,4kDa), ovoalbumina (44,3kDa), anidrase carbônica (29,0kDa) e citocromo C (12,4kDa). O volume correspondente ao pico de NUsc1 foi coletado e passado por processo de *desalting* com solução 5mM de fosfato de sódio em água, liofilizado e mantido a 4°C.

3.6 Análise estatística e edição de imagens

Para avaliar comparativamente a viabilidade celular, foi realizada a análise de variância ANOVA de uma via com o pós-teste de múltipla comparação de Tukey, usando o

programa GraphPad Prisma versão 5.0. Os resultados foram expressos como média aritmética $\pm$ desvio padrão. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram $p < 0,05$.

A edição das imagens apresentadas neste documento foi realizada no programa de processamento de imagens de código aberto ImageJ, preservando-se o mesmo tratamento para a comparação das condições controle e teste em cada experimento (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Análise da diferenciação neuronal de células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y

A diferenciação neuronal da linhagem SH-SY5Y foi induzida pelo tratamento com ácido retinoico (todo trans, daqui em diante chamado de ATRA) e BDNF por 7 dias. Como forma de verificar o sucesso dessa diferenciação, foram feitos registros fotográficos em microscópio de campo claro das mudanças morfológicas das células 24h após plaqueamento e após 96h de incubação com BDNF (Fig. 3A-B). Células expostas ao meio de diferenciação adquiriram características de diferenciação neuronal, como formação e extensão de processos neuríticos, indícios de formação de sinapses (contatos entre células via neuritos), crescimento celular sem formação de *clusters*, e proliferação mais lenta, um fenótipo típico de células do “tipo N” (ENCINAS et al., 2000; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Para avaliar a diferenciação com mais detalhes, também foram realizados ensaios de imunofluorescência para as proteínas de neurônios maduros MAP2 e NeuN, sabidamente aumentadas em células SH-SY5Y diferenciadas (AGHOLME et al., 2010).

Figura 3. Diferenciação neuronal de células SH-SY5Y induzida por tratamento com ácido retinoico e BDNF. Imagens representativas de células SH-SY5Y controle ou diferenciadas com ácido retinoico e BDNF por 7 dias obtidas por microscopia de campo claro (A-B) ou por imunofluorescência (C-F). Foram imunomarcadas as proteínas de neurônios maduros MAP2 (vermelho, C e D) e NeuN (verde, E e F). Em todas as lâminas, os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). (A-B) Cabeças de seta azuis salientam a formação e a extensão de processos neuríticos. As setas verdes indicam o crescimento de SH-SY5Y indiferenciada em clusters. Imagens obtidas em objetiva de 40 vezes.

Pode-se perceber um aumento da marcação tanto de NeuN quanto de MAP2, indicando o sucesso da diferenciação. No entanto, observamos heterogeneidade na lâmina, indicando graus diversos de diferenciação da cultura tratada.

4.2 Toxicidade de oligômeros de A β em SH-SY5Y diferenciada

Já é sabido que oligômeros do peptídeo A β 42 são tóxicos para células de neuroblastoma (CHAFEKAR; BAAS; SCHEPER, 2008; CHROMY et al., 2003; DI CARLO et al., 2010), inclusive para SH-SY5Y (WANG et al., 2009). Entretanto, a extensão dessa toxicidade é muito variável, possivelmente por conta de diversidades na qualidade da diferenciação celular (AGHOLME et al., 2010) e da preparação de oligômeros. Já foi mostrado, por exemplo, que A β O só é tóxico para SH-SY5Y não diferenciada em concentrações mais elevadas daquelas usadas para induzir toxicidade em SH-SY5Y diferenciada (LAMBERT et al., 1994; MARSHALL et al., 2016; NANNENGA; ZAMEER; SIERKS, 2008). De posse de uma cultura de SH-SY5Y diferenciada validada, e de uma preparação de A β O clássica, capaz de produzir espécies neurotóxicas (CHROMY et al., 2003; LAMBERT et al., 1998), procedemos à análise da toxicidade dos A β O preparados em nosso laboratório em cultura diferenciada de SH-SY5Y.

Figura 4. Citotoxicidade dose-dependente induzida por oligômeros de A β em células SH-SY5Y diferenciadas. Quando indicado, as células diferenciadas foram incubadas com veículo ou com A β O nas concentrações indicadas por 24h. A viabilidade celular foi medida por redução de MTT. O gráfico representa a média de 1 experimento representativo realizado em triplicata. ***p<0,001, comparado à condição controle.

A viabilidade celular, calculada relativamente ao sinal gerado pela condição controle (ausência de desafio), indica que não houve morte celular causada pela adição de veículo [0,2% (v/v) de DMSO em PBS] ou de A β O a 0,5 μ M (Fig. 4). Por outro lado, o desafio com A β O a partir de 1 μ M levou à morte celular dose dependente (Fig. 4). Com base nesse resultado, decidimos usar a concentração de 1 μ M, na qual cerca de 53% das células se mantêm viáveis, nos experimentos seguintes. Essa concentração é mais baixa que em vários trabalhos que testam toxicidade de A β O nesta linhagem (LAMBERT et al., 1994; MARSHALL et al., 2016; NANNENGA; ZAMEER; SIERKS, 2008; SHAROAR et al., 2012).

4.3 Neuroproteção por anticorpos do tipo IgG anti-A β contra a toxicidade de oligômeros de A β em cultura de SH-SY5Y diferenciada

Uma vez padronizado o ensaio de neurotoxicidade induzida por oligômeros de A β 42 em SH-SY5Y diferenciada, e com o objetivo de comparar a neuroproteção conferida por anticorpos anti-A β ou anti-A β O nesse modelo, avaliou-se a viabilidade celular nessas culturas desafiadas com A β O que foram previamente incubados com diferentes anticorpos. Foram usados os anticorpos monoclonais murinos do tipo IgG 6E10 (KIM et al, 1990 — disponível comercialmente), capaz de reagir com A β humano em diferentes conformações (monômeros, oligômeros e fibras), e NU-4 (específico para A β Os; LAMBERT et al., 2007a).

Figura 5. Neuroproteção induzida pelos anticorpos 6E10 e NU-4 contra a toxicidade de oligômeros de A β sobre células SH-SY5Y diferenciadas. Células SH-SY5Y diferenciadas foram incubadas com 1μM de A β O por 24h na ausência ou na presença de 6E10 e NU-4 nas concentrações indicadas. A viabilidade foi medida pela redução de MTT. Os dados foram obtidos em 2 experimentos independentes, indicados pelo preenchimento sólido ou hachurado das barras. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparada à condição A β O 1μM do respectivo experimento.

Culturas de SH-SY5Y diferenciadas foram submetidas a tratamento com A β O e com concentrações crescentes desses anticorpos. A viabilidade celular foi calculada relativamente ao sinal gerado pela condição controle (ausência de desafio). Tendo em vista que a condição “veículo” foi testada em vários experimentos (dados não mostrados), e que todos indicaram ausência de toxicidade, esta condição não foi mais realizada nos ensaios de neuroproteção.

Contudo, sempre foram incluídas condições em que as células foram incubadas somente com os anticorpos (na maior concentração testada no ensaio de neuroproteção), as quais demonstram que 6E10 e NU-4 não apresentaram neurotoxicidade (Fig. 5).

Assim como nos dados apresentados na Fig. 4, os A β O a 1 μ M induziram morte celular de cerca de 40% (Fig. 5). Constatou-se neuroproteção contra a toxicidade dos A β O por ambos os anticorpos nas concentrações 20 e 200nM (Fig. 5). Notavelmente, na concentração mais alta testada, a viabilidade retornou ao nível do controle. Contudo, não foi verificada diferença estatística ($p>0,05$) comparando-se as médias de viabilidade celular das condições A β O e A β O + anticorpos a 10nM, portanto mais experimentos para essas condições devem ser conduzidos. Até o momento, pode-se inferir que a concentração mínima de 6E10 ou NU-4 necessária para que haja neuroproteção contra A β O a 1 μ M neste formato experimental é de 20nM.

4.4 Especificidade do anticorpo anti-A β O tipo scFv NUsc1

Uma alternativa interessante de imunoproteção contra a neurotoxicidade de A β Os são anticorpos de cadeia única tipo scFv selecionados usando-se A β O sintéticos como antígenos (VIOLA; KLEIN, 2015). Neste cenário, um anticorpo promissor é o scFv NUsc1, já demonstrado como específico para oligômeros tóxicos de A β (VELASCO et al., 2012). Foi demonstrado recentemente que NUsc1 é capaz de se ligar a neurônios em cultura previamente incubados com A β Os e reduzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzido pela presença de A β Os, prevenindo a toxicidade de A β Os em neurônios (SEBOLLELA et al., 2017). Dessa forma, questionou-se se NUsc1 apresentaria neuroproteção contra A β Os em cultura de SH-SY5Y diferenciada.

Previamente aos ensaios de neuroproteção com NUsc1 em células SH-SY5Y diferenciadas, buscou-se avaliar se NUsc1 é específico para oligômeros de A β , ou se também é capaz de se ligar a oligômeros tóxicos de peptídeos não-A β , como descrito para o anticorpo A11 (KAYED et al., 2003) e outros anticorpos conformacionais dirigidos contra A β Os.

Figura 6. NUSc1 se liga especificamente a oligômeros de A β . A especificidade de ligação de NUSc1 *phage bound* a A β O, comparativamente a monômeros (LisM) e oligômeros de lisozima (LisO), foi avaliada por ELISA. (A) A agregação de lisozima foi monitorada pelo aumento de densidade ótica em 48h. (B) Os antígenos foram testados a 10nM para o ensaio com pbNUSc1 e, com A11, a 333nM de A β O e a 1 μ M de LisM e LisO.

Assim, foi realizado um ELISA com oligômeros de A β e com monômeros e oligômeros de lisozima. Como descrito em Vieira et al. (2007), a incubação de lisozima em pH ácido e alta temperatura induziu agregação dessa proteína, como monitorado pelo aumento de 3 vezes da turbidez da solução (Fig. 6A). Na figura 4B, é representada a ligação de NUSc1 e de A11 a A β O ou a monômeros (LisM) e oligômeros de lisozima (LisO). Como descrito em Kaye et al. (2003), os dados mostraram que A11 se liga tanto às formas oligoméricas de A β quanto às de lisozima, mas não se liga a monômeros de lisozima. Já NUSc1 se liga especificamente a A β O, gerando um sinal cerca de 400 vezes maior no reconhecimento desses oligômeros que para os outros antígenos, quando presentes na mesma concentração.

4.5 Avaliação da citotoxicidade do anticorpo scFv NUSc1 purificado em cultura de SH-SY5Y diferenciada

Ainda como etapa prévia à avaliação da neuroproteção por NUSc1 contra a neurotoxicidade de A β O em células SH-SY5Y, avaliou-se a viabilidade dessas células em meio contendo diferentes concentrações de NUSc1 purificado produzido em *E. coli*. As etapas de expressão e de purificação foram realizadas pelo Msc. André Bittencourt, doutorando do nosso laboratório. Em resumo, uma cepa contendo plasmídeo que codifica a sequência de

NUsc1 foi induzida com IPTG e o anticorpo foi purificado por cromatografia de afinidade, usando-se coluna de proteína A. A capacidade de ligação de NUsc1 purificado a A β O foi testada por ELISA (dados não mostrados).

Figura 7. Análise da toxicidade do tratamento com NUsc1 em células SH-SY5Y diferenciadas. As culturas foram incubadas com doses crescentes de NUsc1 por 24h, antes (A) ou após (C) o passo extra de purificação por gel-filtração. A viabilidade foi medida pela redução de MTT. Os dados foram obtidos de 2 experimentos independentes, ao menos em triplicata, diferenciados pelo preenchimento sólido ou hachurado das barras. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado à condição controle. (B) Cromatograma da purificação adicional por SEC-HPLC. O tempo de retenção de alguns padrões de peso molecular são mostrado como referência.

A Fig. 7A mostra a citotoxicidade dose-dependente induzida por NUsc1 na cultura de SH-SY5Y diferenciada. Houve morte celular significativa (média de 75%) nas concentrações 500nM e 200nM de NUsc1, o que tendeu a reduzir na condição de 20nM, a qual não apresenta diferença estatística em relação ao controle.

Como esse anticorpo é produzido em bactéria, levantou-se a possibilidade de que endotoxinas bacterianas, como LPS, presentes como contaminantes da preparação de NUsc1, pudessem explicar a morte celular induzida pela incubação com NUsc1 em concentrações

mais altas. Por isso, realizou-se a purificação adicional de NUsc1 através de gel-filtração em HPLC. O cromatograma resultante é apresentado na Figura 7B. Nele, observa-se o pico de NUsc1 eluindo em cerca de 21 minutos de corrida, que corresponde, com base em uma calibração de peso molecular na mesma coluna, à estimativa de peso molecular aparente de NUsc1 de 23kDa, portanto próximo do PM teórico de 29kDa. O pico de NUsc1 foi coletado, liofilizado e utilizado em novo ensaio de morte celular em cultura de SH-SY5Y diferenciada, cujos resultados estão mostrados na Figura 7C. Verifica-se que a exposição à NUsc1 purificado por gel-filtração a 1nM e a 10nM não foi tóxico. Na concentração de 100nM, a viabilidade média foi de 79% em relação ao controle, mas em um dos ensaios houve toxicidade estatisticamente significativa. Isso aponta a necessidade de novos ensaios nesta concentração. Ainda assim, a média da viabilidade celular resultante do tratamento com 100nM de NUsc1 gel-filtrado foi muito semelhante à obtida com o tratamento com 20nM de NUsc1 não gel-filtrado (72,5%), o que respalda a ideia de que a origem do anticorpo e a sua forma de purificação influenciam no percentual de morte celular. Além disso, constata-se que, assim como observado para os controles com NU-4 e 6E10, o tratamento de SH-SY5Y diferenciada com NUsc1 a 20nM mantém a viabilidade celular elevada como na condição controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência na atualidade, e tende a se tornar um grave problema de saúde pública, visto que o principal fator de risco para desenvolvê-la é o envelhecimento, e a expectativa de vida da população mundial tem aumentado. A perda progressiva de memória, a afasia, a agnosia e as dificuldades com as atividades da vida diária características da DA são atribuídas ao dano sináptico e a perda neuronal no hipocampo, no córtex e em outras regiões do cérebro (HAYDEN; TELOW, 2013). Embora tenham ocorrido progressos significativos nas áreas de pesquisa básica e clínica sobre o entendimento do curso da DA, ainda não foi possível encontrar método diagnóstico *pre-mortem* e tratamento eficientes, pois ainda não se conhecem em detalhes os mecanismos pelos quais essa patologia se instala. A hipótese da cascata amiloide é ainda hoje a mais aceita pela comunidade científica da área. Inicialmente, ela apontava um desequilíbrio entre a produção e a depuração do peptídeo A β como a causa de seu acúmulo no cérebro, sob a forma de placas senis. Este seria o principal fator desencadeador da doença, levando à hiperfosforilação da proteína tau, que origina os emaranhados neurofibrilares, e a um quadro de disfunção sináptica, inflamação, perda neuronal e, por fim, demência. Entretanto, foi relatado que a quantidade de A β insolúvel em cérebro de paciente com DA não é diretamente proporcional à severidade da doença ou ao número de placas senis (MCLEAN et al., 1999). Dessa forma, a fim de aprimorar a hipótese amiloide original, foi sugerido que oligômeros de A β , entidades pequenas, solúveis e metaestáveis, seriam os responsáveis pela perda de plasticidade sináptica e pela morte celular durante o estágio inicial da DA, antes da formação de placas senis. Portanto, parece ser fato que o acúmulo e a agregação de A β no cérebro é um evento inicial e central na patogênese da DA.

A neurotoxicidade de A β Os foi primeiramente descrita por Lambert et al. (1998). Naquele estudo, foi mostrado que o tratamento com A β Os em concentrações nanomolares foi capaz de matar neurônios em cultura organotípica de hipocampo de camundongo. Desde então, as evidências da toxicidade dessas espécies de A β se acumularam, tanto em modelos experimentais animais (CHENG et al., 2007; MEILANDT et al., 2009; WALSH et al., 2002), como em humanos (LESNÉ et al., 2013). A inibição da potenciação de longa duração, ou LTP (LAMBERT et al., 1998), a perda e aberração de espinhos dendríticos (LACOR, 2004; LACOR et al., 2007) e o estresse oxidativo (DE FELICE et al., 2007) são alguns dentre os vários processos patológicos que levam à disfunção neuronal desencadeados pelos A β Os em portadores da DA, o que os coloca como responsáveis pela perda de memória precoce e pela

demência progressiva na DA (KLEIN; KRAFFT; FINCH, 2001). Apesar da dificuldade em se estabelecer com precisão o estado oligomérico e as propriedades físico-químicas desses agregados, já é possível preparar A β O em laboratório a partir de peptídeos A β sintéticos, uma metodologia hoje amplamente usada e relatada na literatura e que foi utilizada no nosso trabalho. Essas preparações parecem ser estruturalmente equivalentes aos A β O derivados de cérebro com DA (GONG et al., 2003; KAYED et al., 2003; SEBOLLELA et al., 2014), pois perturbam a plasticidade sináptica, bem como a aprendizagem e a memória quando injetados em modelos animais (CLEARY et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2013; WALSH et al., 2002), preservando as propriedades neurotóxicas (DE FELICE et al., 2008; KLYUBIN et al., 2012).

Neste trabalho, decidimos avaliar a morte celular induzida por A β O em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônio maduro. Assim, começamos pela validação do protocolo de diferenciação dessa linhagem como modelo experimental em nosso laboratório. SH-SY5Y é uma linhagem celular imortalizada e proliferativa e uma das linhagens celulares mais utilizadas na pesquisa em neurociência. Derivada de células de neuroblastoma humano, apresenta dois fenótipos morfolologicamente distintos: epitelial (tipo S) e neuroblástico (tipo N) (ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983). As células do tipo N se encontram tipicamente limitadas em um estágio inicial de diferenciação, com baixos níveis de marcadores de neurônios maduros (GILANY et al., 2008). Muitos trabalhos as utilizam nesse formato como modelo *in vitro* de neurônios humanos (SCHLACHETZKI; SALIBA; DE OLIVEIRA, 2013; THAPA; JETT; CHI, 2016; WANG et al., 2009). Visando um modelo translacional mais consistente, decidimos promover a sua diferenciação em neurônios maduros. Há diversos métodos descritos na literatura pelos quais se pode alcançar esse fenótipo para SH-SY5Y. Os mais comuns combinam o tratamento inicial da linhagem com ácido retinoico, que possui poderosas propriedades de inibição de crescimento celular, e de promoção de diferenciação celular, e posteriormente com fatores promotores de neuritogênese, como o BDNF (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Após o tratamento, obtivemos sucesso na indução da diferenciação de SH-SY5Y, verificando indícios de formação de sinapses, crescimento celular sem formação de *clusters*, proliferação lenta e contra seleção de células do tipo S, observados por registro em microscopia em campo claro (ENCINAS et al., 2000; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Além disso, detectamos por imunofluorescência aumento das proteínas marcadoras de maturação neuronal NeuN (proteína de núcleo neuronal) e MAP2 (proteína associada a microtúbulo 2), a qual participa da montagem de microtúbulos, etapa essencial na neuritogênese (AGHOLME et al., 2010). Seguimos então para os ensaios de neurotoxicidade

de A β O em SH-SY5Y diferenciada, desafiando-as com concentrações crescentes de A β O preparado a partir de peptídeo A β 42 humano sintético, e quantificando a morte celular por ensaio de MTT. Como demonstrado anteriormente (DE FELICE et al., 2008; KLYUBIN et al., 2012), A β Os sintéticos preservam propriedades toxicológicas, inclusive em nosso modelo experimental, as quais se demonstram dose-dependentes. Vários trabalhos já mostraram evidências da morte celular causada pelas preparações oligoméricas de A β em células SH-SY5Y (NANNENGA; ZAMEER; SIERKS, 2008), inclusive utilizando o ensaio de MTT (MARSHALL et al., 2016; SHAROAR et al., 2012). Contudo, nota-se que nesses trabalhos não há indução da diferenciação de SH-SY5Y, e que foram usadas concentrações ao menos 10 vezes maiores de A β O comparado a que padronizamos neste trabalho (1 μ M). Tais concentrações altas não devem ser alcançadas *in vivo*, mesmo em situações patológicas. Ademais, sabe-se que o ensaio de MTT mensura a viabilidade celular através da conversão do sal de tetrazólio MTT em sal de formazan pelas desidrogenases da cadeia respiratória, isto é, mensura a atividade oxidativa mitocondrial. Sabe-se também que na DA, a exposição celular a A β O inibe a ação de certas enzimas mitocondriais chave no cérebro, prejudicando o transporte de elétrons, a produção de ATP, o consumo de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Consequentemente, o aumento do radical superóxido leva a formação de peróxido de hidrogênio, ao estresse oxidativo, à liberação de citocromo c e à apoptose (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Em nossos resultados, calculamos a morte celular a partir de um ensaio de viabilidade que mede indiretamente a morte celular, e só registramos morte significativa na presença de A β O a partir de 1 μ M em tratamento de 24h. No entanto, acreditamos que podem ocorrer perturbações no funcionamento celular causadas por A β O quando presente em concentrações ainda mais baixas, que levariam a disfunções sinápticas, algo também observado na DA, sem necessariamente desencadear em morte neuronal. Aqui também se faz relevante a observação de diversos graus de diferenciação na lâmina de imunofluorescência que podem estar associados a diferentes estados de atividade mitocondrial. Essas considerações podem explicar o alto desvio padrão que encontramos nos resultados de viabilidade celular como um todo ao longo deste trabalho. Para avaliar essas possíveis perturbações pré-morte por A β Os sobre SH-SY5Y diferenciada, uma análise mais aprofundada da função mitocondrial na presença de A β Os devem ser realizados. Uma metodologia aplicável em nosso estudo, e que poderia gerar resultados com menor desvio padrão, seria a marcação das células com iodeto de propídio, em que se avalia a integridade da membrana plasmática, pois já foi sugerido que o mecanismo inicial de dano às células neuronais por agregados de A β seria através da

formação de poros na membrana celular (HAYDEN; TELOW, 2013). Apesar das limitações de nossa análise, ainda podemos afirmar que células SH-SY5Y diferenciadas em neurônio maduro são susceptíveis à toxicidade de A β O, consistindo num modelo *in vitro* mais apropriado do que SH-SY5Y não diferenciada.

Com a demonstração de que os anticorpos anti-A β poderiam inibir a fibrilação do peptídeo A β , desagregar as fibras pré-formadas e prevenir a neurotoxicidade em cultura celular (SOLOMON, 2007; SOLOMON et al., 1997), as iniciativas de imunização ativa começaram a tomar lugar nas estratégias terapêuticas para a DA. Entretanto, houve registro de pacientes que desenvolveram meningoencefalite devido à vacinação com agregados de A β , e esses resultados estimularam a busca por estratégias de imunoterapia passiva, em que IgG's monoclonais humanizadas eram desenvolvidas para reconhecer sequências específicas do peptídeo A β , como foi o caso de 6E10. Assim, essas IgG's tinham afinidade por múltiplos estados de agregação do peptídeo, porém, quando submetidos a ensaios clínicos, falharam em gerar melhoras cognitivas em pacientes com DA leve a moderada (WISNIEWSKI; GOÑI, 2014). Baseando-se nesse histórico, e tendo o conhecimento de que os A β O já se acumulam em estágios iniciais da DA (pré-clínicos), hoje se buscam anticorpos conformacionais específicos para A β O (LAMBERT et al., 2001, 2007a; LEE et al., 2006; VIOLA; KLEIN, 2015). A11 foi o primeiro anticorpo policlonal descrito que se liga aos intermediários de agregação de A β 42, mas não a fibras ou a monômeros. Ele também reconhece oligômeros solúveis de outros peptídeos e proteínas amiloidogênicas. Foi demonstrado que A11 é capaz de reverter a toxicidade de oligômeros de A β 42 em células SH-SY5Y em cultura e de se ligar especificamente a extratos e a cortes cerebrais *post mortem* de pacientes com DA (KAYED et al., 2003). Posteriormente, anticorpos monoclonais anti-A β O foram gerados através de imunização com preparação oligomérica de A β 42 sintético. NU-4, um desses anticorpos, é capaz de discriminar de maneira altamente específica cérebro com DA de cérebro normal (LAMBERT et al., 2007b). Decidimos então comparar a neuroproteção conferida pelos anticorpos 6E10 e NU-4 a células SH-SY5Y diferenciadas desafiadas com A β O. Ambos os anticorpos foram neuroprotetores quando presentes na concentração mínima de 20nM em nosso modelo de estudo, e, notavelmente, foram capazes de reverter totalmente a morte celular causada por A β O quando a 200nM. Vale ressaltar que NU-4 foi tão eficiente quanto 6E10, e ainda que utilizar SH-SY5Y diferenciada como modelo neuronal no estudo de neuroproteção de anticorpos não conformacionais e conformacionais anti-A β O é uma estratégia plausível.

A baixa penetração no SNC e a resposta inflamatória induzidas pelas terapias para a DA usando-se IgG's, estimulou a busca por anticorpos artificiais humanizados do tipo scFv altamente seletivos para A β O's, como por exemplo os NUsc's (SEBOLLELA, 2017; VELASCO et al., 2012). Neste trabalho, usamos o anticorpo NUsc1, caracterizado em Sebollela et al. (2017), e apresentado sob dois formatos, ligado ou não a fago. Como mostrado neste artigo (ver seção "Anexos" dessa Dissertação), ambas as estruturas conservam a atividade de reconhecimento de A β O, sendo capazes de neutralizar a ligação de A β O tóxicos a neurônios em cultura e de detectar A β O em cortes de cérebro humano de portadores da DA (SEBOLLELA et al., 2017). NUsc1 é uma alternativa interessante na imunoterapia para a DA, pois é um anticorpo do tipo scFv, sendo portanto uma proteína pequena (1/5 da massa de uma IgG), com biodisponibilidade atraente, e de estrutura simples e pouco imunogênica, dada a ausência da porção Fc (TURNER; RITTER; GEORGE, 1997; WHITLOW; FILPULA, 1991). Além disso, apresenta baixo custo de produção em larga escala através de sistema de expressão procariótico. Dessa forma, realizamos uma análise de especificidade de NUsc1 por epítipo presente em A β O comparativamente a lisozima monomérica e oligomérica em ensaio de ELISA. Esse ensaio foi motivado pelo relato de que A11, dentre outros anticorpos conformacionais, reconhece epítipo compartilhado por estados oligoméricos de outras proteínas amiloidogênicas, dentre elas a lisozima (KAYED et al., 2003; SWAMINATHAN et al., 2011). Obtivemos um sinal cerca de 400 vezes maior no reconhecimento de NUsc1 por A β O que para os outros antígenos, quando presentes na mesma concentração. Apesar de lisozima não ser uma proteína neural de mamífero, oligômeros solúveis formados *in vitro* estão bem caracterizados e são neurotóxicos (VIEIRA et al., 2007). Esse resultado indica alta especificidade de NUsc1 por A β O comparativamente a oligômeros de lisozima. Entretanto, a complementação desse resultado se faz necessária para outras proteínas amiloidogênicas. Sebollela et al. (2017) também mostra que NUsc1 não se liga significativamente a oligômeros de Tau.

A fim de investigar a capacidade neuroprotetora de NUsc1 em SH-SY5Y diferenciada, realizamos primeiramente um ensaio de citotoxicidade, avaliando-se a viabilidade de SH-SY5Y diferenciada perante doses crescentes de NUsc1. Os dados obtidos não revelam citotoxicidade para NUsc1 a 20nM, mas ela se tornou relevante para NUsc1 a partir de 200nM. Como utilizamos um sistema procariótico de expressão, cogitamos a possibilidade de que lipopolissacarídeos (LPS), liberados após a lise bacteriana, pudessem explicar a queda na viabilidade celular. Sabe-se que as endotoxinas não afetam igualmente todas as culturas de células de mamíferos (RYAN, 2008). Apesar de já terem sido modelo neuronal de estudo

sobre os efeitos de LPS na produção celular de citocinas, ainda se desconhece o grau de interferência da presença de LPS na viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas (BORNER et al., 2004; LANGSDORF; MAO; CHANG, 2011; YU et al., 2003). Então, uma etapa adicional de purificação usando cromatografia de gel-filtração em HPLC foi realizada, e os novos dados de viabilidade celular indicaram que a exposição a NUsc1 10nM não provocou morte celular, mas ainda foi inconclusiva a sua citotoxicidade a 100nM, o que aponta a necessidade de mais ensaios nesta concentração. Entretanto, é interessante destacar que, assim como observado para os controles com NU-4 e 6E10 nos ensaio de neuroproteção contra A β O, o tratamento de SH-SY5Y diferenciada com NUsc1 gel-filtrado a 10nM mantém a viabilidade celular pareada à condição controle, um indício de que se NUsc1 for tão eficiente quanto 6E10 e NU-4, este poderá ser usado em dose não citotóxica.

Seguramente, são necessários mais experimentos para estabelecer se há citotoxicidade de NUsc1 sobre células SH-SY5Y, e se esse anticorpo confere neuroproteção contra A β Os. Além disso, devemos repetir os ensaios de viabilidade celular descritos, de forma a ampliar as conclusões sobre a toxicidade dos A β Os no modelo usado. No entanto, até o momento já foi possível estabelecer um protocolo eficiente de diferenciação de células SH-SY5Y para usá-las como modelo *in vitro* de neurônio humano maduro em ensaios de toxicidade de A β O e de neuroproteção de anticorpos anti-A β , uma estratégia terapêutica promissora para a DA. Para a nossa linha de pesquisa, a linhagem SH-SY5Y apresenta vantagens frente a outros modelos, como a cultura primária de neurônios de roedor ou a cultura organotípica, pois podem ser propagadas, são cromossomicamente estáveis e, por serem derivadas de células humanas, elas expressam uma variedade de proteínas específicas de humanos e isoformas proteicas que não estão presentes em culturas primárias de roedores (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016). Ponderando a utilidade deste modelo para realizar estudos bioquímicos e moleculares em larga escala, devido à sua susceptibilidade à manipulação genética e à disponibilidade de uma quantidade ilimitada de células (ENCINAS et al., 2000), e todas as propriedades funcionais que NUsc1, um anticorpo conformacional do tipo scFv (SEBOLLELA et al., 2017), mantém comparado a IgG's anti-A β O, almejamos construir uma linhagem de SH-SY5Y que expresse estavelmente NUsc1. Pretendemos, assim, avaliar a possibilidade de terapia endógena com NUsc1 para a DA, superando a problemática de cruzamento da barreira hematoencefálica e dispensando a administração contínua deste anticorpo. Resultados preliminares de um grupo de pesquisa parceiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), liderado pelo Dr. Sergio T. Ferreira, demonstram que NUsc1 pode ser expresso *in vivo* em animais modelo da DA através de infecção por adenovírus e é capaz

de reverter quadros de perda de memória. Por meio de subclonagem do cDNA de NUsc1 em vetor viral de expressão, obtivemos células SH-SY5Y positivas para o gene repórter do vetor, a proteína fluorescente verde (GFP — dados não mostrados). Estas células foram selecionadas por citometria de fluxo com base na fluorescência de GFP, expandidas e se mantiveram viáveis depois de criopreservadas. No entanto, não conseguimos detectar expressão de NUsc1, o que atribuímos a alguma intercorrência na expressão gênica deste cDNA. Desejamos dar continuidade ao projeto, otimizando a construção do sistema vetorial contendo sequência de NUsc1 e a metodologia para expressão estável em SH-SY5Y.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação permitem concluir que:

- a) através do protocolo de indução de diferenciação celular utilizado neste trabalho, é possível obter culturas de SH-SY5Y com características típicas de neurônios maduros;
- b) há morte celular dose-dependente de células SH-SY5Y diferenciadas causada por A β O obtidos de preparação de peptídeo A β 42 sintético;
- c) há neuroproteção dose-dependente conferida por anticorpos do tipo IgG 6E10 e NU-4 contra A β O em SH-SY5Y diferenciada, o que a torna um bom modelo para estudos comparativos de neuroproteção por anticorpos anti-A β O conformacionais e não sensíveis à conformação;
- d) o epítopo reconhecido por NUsc1 na estrutura dos A β Os não está presente em oligômeros de lisozima. No entanto, a análise da especificidade de NUsc1 para A β Os deve ser complementada testando-se o reconhecimento para outras proteínas amiloidogênicas;
- e) a citotoxicidade de NUsc1 purificado de bactéria sobre cultura de SH-SY5Y diferenciada pode ser reduzida por passo extra de purificação em cromatografia de gel-filtração;
- f) é necessário realizar mais experimentos para estabelecer com precisão o grau de citotoxicidade de NUsc1 sobre células SH-SY5Y, e o grau de neuroproteção contra morte induzida por A β O.

REFERÊNCIAS¹

- AGHOLME, L. et al. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1069–1082, 13 jun. 2010.
- AHMAD, Z. A. et al. scFv antibody: principles and clinical application. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 980250, 2012.
- AHO, L. et al. Immunohistochemical Visualization of Amyloid- β Protein Precursor and Amyloid- β in Extra- and Intracellular Compartments in the Human Brain. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1015–1028, 13 jun. 2010.
- ARCANGELI, A. et al. Modulation of HERG Current and Herg Gene Expression During Retinoic Acid Treatment of Human Neuroblastoma Cells: Potentiating Effects of BDNF - Journals - NCBI. **J Neurobiol**, v. 40, p. 214–225, 1999.
- ARVANITAKIS, Z. et al. Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 9, p. 934–943, ago. 2016.
- BLENNOW, K. et al. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 3, p. 131–144, 16 mar. 2010.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 368, n. 9533, p. 387–403, 29 jul. 2006.
- BORNER, C. et al. Transcriptional Regulation of the Human mu-Opioid Receptor Gene by Interleukin-6. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 1719–1726, 31 ago. 2004.
- BOYLE, P. A. et al. Much of late life cognitive decline is not due to common neurodegenerative pathologies. **Annals of Neurology**, v. 74, n. 3, p. 478–489, set. 2013.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–59, 1991.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 94, n. S165, p. 3–12, 1 abr. 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- BROUILLETTE, J. et al. Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- Molecular-Weight Amyloid- 1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 23, p. 7852–7861, 6 jun. 2012.
- BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 333–44, maio 2009.
- CAI, Z. et al. Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. **Clinical interventions in aging**, v. 10, p. 1695–704, 2015.
- CHAFEKAR, S. M.; BAAS, F.; SCHEPER, W. Oligomer-specific A β toxicity in cell models is mediated by selective uptake. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 9, p. 523–531, set. 2008.
- CHENG, I. H. et al. Accelerating Amyloid- β Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease Mouse Models. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23818–23828, 17 ago. 2007.
- CHROMY, B. A. et al. Self-assembly of A β (1-42) into globular neurotoxins. **Biochemistry**, v. 42, n. 44, p. 12749–12760, 11 nov. 2003.
- CLEARY, J. P. et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 79–84, 19 jan. 2005.
- CONSTANTINESCU, R. et al. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 72, p. 17–28, 2007.
- DE FELICE, F. G. et al. Abeta Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Mechanism That Is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11590–11601, 13 abr. 2007.
- DE FELICE, F. G. et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 9, p. 1334–47, set. 2008.
- DE STROOPER, B. Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 465–494, 1 abr. 2010.
- DE STROOPER, B. et al. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603–615, 11 fev. 2016.
- DEGERMAN GUNNARSSON, M. et al. Re-evaluation of clinical dementia diagnoses with pittsburgh compound B positron emission tomography. **Dementia and geriatric cognitive disorders extra**, v. 3, n. 1, p. 472–81, jan. 2013.
- DI CARLO, M. et al. Insulin promotes survival of amyloid-beta oligomers neuroblastoma damaged cells via caspase 9 inhibition and Hsp70 upregulation. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 147835, 13 maio 2010.

- EDISON, P. et al. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: An [11C]PIB and [18F]FDG PET study. **Neurology**, v. 68, n. 7, p. 501–508, 13 fev. 2007.
- ENCINAS, M. et al. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 991–1003, 4 jan. 2000.
- FEZOUI, Y.; TEFLOW, D. B. Kinetic Studies of Amyloid β -Protein Fibril Assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 36948–36954, 4 out. 2002.
- FIGUEIREDO, C. P. et al. Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight Abeta Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 23, p. 9626–9634, 5 jun. 2013.
- FORSTER, J. I. et al. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. **Journal of biomolecular screening**, v. 21, n. 5, p. 496–509, jun. 2016.
- GEORGANOPOULOU, D. G. et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2273–2276, 15 fev. 2005.
- GILANY, K. et al. The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: An enlarged proteome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 7–8, p. 983–985, jul. 2008.
- GILBERT, B. J. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 5, p. 362–366, maio 2013.
- GOMPERTS, S. N. et al. Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. **Neurology**, v. 71, n. 12, p. 903–910, 16 set. 2008.
- GONG, Y. et al. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric Abeta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10417–10422, 2 set. 2003.
- GOURE, W. F. et al. Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 4, p. 42, 2014.
- GRALLE, M.; FERREIRA, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. **Progress in Neurobiology**, v. 82, n. 1, p. 11–32, maio 2007.

- HARDY, J. et al. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. **Nature neuroscience**, v. 1, n. 5, p. 355–8, set. 1998.
- HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5054, p. 184–5, 10 abr. 1992.
- HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 19 jul. 2002.
- HARRIS, J. A. et al. Transsynaptic Progression of Amyloid- β -Induced Neuronal Dysfunction within the Entorhinal-Hippocampal Network. **Neuron**, v. 68, n. 3, p. 428–441, 4 nov. 2010.
- HAYDEN, E. Y.; TEFLOW, D. B. Amyloid β -protein oligomers and Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 60, 2013.
- HERZOG, W.; WEBER, K. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. **European journal of biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 1–8, 1 dez. 1978.
- HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–8, mar. 2003.
- HOU, L. et al. Solution NMR Studies of the A β (1–40) and A β (1–42) Peptides Establish that the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 7, p. 1992–2005, 25 fev. 2004.
- HUTTON, M. et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 702–705, 18 jun. 1998.
- JOHNSON, K. A. Amyloid imaging of Alzheimer's disease using Pittsburgh Compound B. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 6, n. 6, p. 496–503, nov. 2006.
- KAYED, R. et al. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. **Science**, v. 300, n. 5618, p. 486–489, 18 abr. 2003.
- KIM, J.; BASAK, J. M.; HOLTZMAN, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 63, n. 3, p. 287–303, 13 ago. 2009.
- KLEIN, W. L.; KRAFFT, G. A.; FINCH, C. E. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 219–24, abr. 2001.
- KLUNK, W. E. et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. **Annals of Neurology**, v. 55, n. 3, p. 306–319, mar. 2004.
- KLYUBIN, I. et al. Alzheimer's disease A β assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 25, 17 jul. 2012.
- KOROLEV, I. Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. **Medical Student**

Research Journal, v. 4, n. Fall, p. 24–33, 2014.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 1078p. 9–21.

LACOR, P. N. Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Oligomers. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 45, p. 10191–10200, 10 nov. 2004.

LACOR, P. N. et al. Abeta Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 796–807, 24 jan. 2007.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 499–509, 2007.

LAMBERT, M. P. et al. beta/A4-evoked degeneration of differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 39, n. 4, p. 377–385, 1994.

LAMBERT, M. P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6448–53, 26 maio 1998.

LAMBERT, M. P. et al. Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 595–605, 7 jul. 2001.

LAMBERT, M. P. et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 1, p. 23–35, 2007a.

LAMBERT, M. P. et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 1, p. 23–35, jan. 2007b.

LAMBERT, M. P. et al. Targeting generation of antibodies specific to conformational epitopes of amyloid beta-derived neurotoxins. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 8, n. 1, p. 65–81, mar. 2009.

LANGSDORF, E. F.; MAO, X.; CHANG, S. L. A role for reactive oxygen species in endotoxin-induced elevation of MOR expression in the nervous and immune systems. **Journal of neuroimmunology**, v. 236, n. 1–2, p. 57–64, jul. 2011.

LEE, E. B. et al. Targeting Amyloid-beta Peptide (Abeta) Oligomers by Passive Immunization with a Conformation-selective Monoclonal Antibody Improves Learning and Memory in Abeta Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 7, p. 4292–4299, 3 jan. 2006.

LESNÉ, S. et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. **Nature**, v. 440, n. 7082, p. 352–357, 16 mar. 2006.

- LESNÉ, S. E. et al. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. **Brain**, v. 136, n. 5, p. 1383–1398, maio 2013.
- LEWIS, J. et al. Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1487–1491, 24 ago. 2001.
- LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain research**, v. 1337, p. 85–94, 14 jun. 2010.
- LORENZO, A.; YANKNER, B. A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12243–7, 6 dez. 1994.
- MAMIKONYAN, G. et al. Anti-A beta 1-11 antibody binds to different beta-amyloid species, inhibits fibril formation, and disaggregates preformed fibrils but not the most toxic oligomers. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22376–86, 3 ago. 2007.
- MARSHALL, K. E. et al. A critical role for the self-assembly of Amyloid- β 1-42 in neurodegeneration. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 30182, 2016.
- MASTERS, C. L. et al. Alzheimer's disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15056, 15 out. 2015.
- MATSUMOTO, K. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 55, n. 8, p. 1798–806, 15 abr. 1995.
- MC DONALD, J. M. et al. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A β dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. **Brain**, v. 133, n. 5, p. 1328–1341, maio 2010.
- MCLEAN, C. A. et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Annals of neurology**, v. 46, n. 6, p. 860–6, dez. 1999.
- MEILANDT, W. J. et al. Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 1977–1986, 18 fev. 2009.
- MORETTO, N. et al. Conformation-sensitive Antibodies against Alzheimer Amyloid- β by Immunization with a Thioredoxin-constrained B-cell Epitope Peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11436–11445, 13 abr. 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p.

55–63, 16 dez. 1983.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development (Cambridge, England)**, v. 116, n. 1, p. 201–11, set. 1992.

NANNENGA, B. L.; ZAMEER, A.; SIERKS, M. R. Anti-oligomeric single chain variable domain antibody differentially affects huntingtin and α -synuclein aggregates. **FEBS Letters**, v. 582, n. 4, p. 517–522, 20 fev. 2008.

NATH, S. et al. Spreading of Neurodegenerative Pathology via Neuron-to-Neuron Transmission of β -Amyloid. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 26, p. 8767–8777, 27 jun. 2012.

NELSON, A. L. Antibody fragments: hope and hype. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NISSIM, A. et al. Antibody fragments from a “single pot” phage display library as immunochemical reagents. **The EMBO journal**, v. 13, n. 3, p. 692–8, 1 fev. 1994.

NOGUCHI, A. et al. Isolation and Characterization of Patient-derived, Toxic, High Mass Amyloid β -Protein (A β) Assembly from Alzheimer Disease Brains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 47, p. 32895–32905, 20 nov. 2009.

NORTON, S. et al. Potential for primary prevention of Alzheimer’s disease: an analysis of population-based data. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 8, p. 788–794, ago. 2014.

PÅHLMAN, S. et al. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 31A, n. 4, p. 453–8, 1995.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 849–858, nov. 2010.

PAULA-LIMA, A. C. et al. Amyloid beta-Peptide Oligomers Stimulate RyR-Mediated Ca²⁺ Release Inducing Mitochondrial Fragmentation in Hippocampal Neurons and Prevent RyR-Mediated Dendritic Spine Remodeling Produced by BDNF. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 7, p. 1209–1223, 1 abr. 2011.

PIKE, C. J. et al. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. **Brain research**, v. 563, n. 1–2, p. 311–4, 1 nov. 1991.

POLING, A. et al. Oligomers of the amyloid-beta protein disrupt working memory: Confirmation with two behavioral procedures. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 230–234, 21 nov. 2008.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer’s & Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63–75.e2, jan. 2013.

- QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, 28 jan. 2010.
- REITZ, C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. **International journal of Alzheimer's disease**, v. 2012, p. 369808, 2012.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–51, 15 abr. 2014.
- ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 71, n. 4, p. 741–7, out. 1983.
- RYAN, J. **Endotoxins and Cell Culture** Corning Life Sciences Technical Bulletin. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/cc_endotoxins_tc_305_rev1.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2017.
- SALLOWAY, S. et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 4, p. 322–333, 23 jan. 2014.
- SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505–517, jul. 2016.
- SCHLACHETZKI, J. C. M.; SALIBA, S. W.; DE OLIVEIRA, A. C. P. Studying neurodegenerative diseases in culture models. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 92–100, 2013.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SCOTT, J. K.; SMITH, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4967, p. 386–90, 27 jul. 1990.
- SEBOLLELA, A. et al. Amyloid- Oligomers Induce Differential Gene Expression in Adult Human Brain Slices. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7436–7445, 2012.
- SEBOLLELA, A. et al. Elucidating molecular mass and shape of a neurotoxic A β oligomer. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 1238–45, 2014.
- SEBOLLELA, A. et al. A human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid- β oligomers. **Journal of Neurochemistry**, 3 jul. 2017.
- SHANKAR, G. M. et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature Medicine**, v. 14, n. 8, p. 837–842, 22 ago. 2008.

- SHAROAR, M. et al. Keampferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 104, 21 dez. 2012.
- SHIPLEY, M. M.; MANGOLD, C. A.; SZPARA, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. **Journal of Visualized Experiments**, n. 108, p. 53193, 17 fev. 2016.
- SIEBNER, H. et al. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 30, n. 8, p. 1104–1113, 1 ago. 2003.
- SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116–145, maio 2014.
- SMALL, S. A.; DUFF, K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. **Neuron**, v. 60, n. 4, p. 534–42, 26 nov. 2008.
- SOLOMON, B. et al. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 4109–12, 15 abr. 1997.
- SOLOMON, B. Antibody-mediated immunotherapy for Alzheimer's disease. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 8, n. 7, p. 519–24, jul. 2007.
- SPENCER, B.; MASLIAH, E. Immunotherapy for Alzheimer's disease: past, present and future. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, p. 114, 2014.
- SPERLING, R. A. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 280–292, maio 2011.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1997. v. Appendix 3p. Appendix 3B.
- SWAMINATHAN, R. et al. Lysozyme. In: **Advances in protein chemistry and structural biology**. [s.l: s.n.]. v. 84p. 63–111.
- TAYEB, H. O. et al. Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: is the "amyloid cascade hypothesis" still alive? **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 13, n. 7, p. 1075–1084, 10 ago. 2013.
- TERRY, R. D.; KATZMAN, R.; BICK, K. L. **Alzheimer disease**. [s.l.] Raven Press, 1994.

- THAPA, A.; JETT, S. D.; CHI, E. Y. Curcumin Attenuates Amyloid- β Aggregate Toxicity and Modulates Amyloid- β Aggregation Pathway. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 56–68, 20 jan. 2016.
- THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Stages of Alzheimer's**. Disponível em: <http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp>. Acesso em: 7 jul. 2017.
- TOMIC, J. L. et al. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 3, p. 352–358, set. 2009.
- TURNER, D. J.; RITTER, M. A.; GEORGE, A. J. Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. **Journal of immunological methods**, v. 205, n. 1, p. 43–54, 23 jun. 1997.
- VASSAR, R. et al. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 1, p. 4–28, jul. 2014.
- VELASCO, P. T. et al. Synapse-binding subpopulations of A β oligomers sensitive to peptide assembly blockers and scFv antibodies. **ACS chemical neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 972–81, 21 nov. 2012.
- VIEIRA, M. N. N. et al. Soluble oligomers from a non-disease related protein mimic Abeta-induced tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 2, p. 736–748, 11 jul. 2007.
- VIOLA, K. L. et al. Towards non-invasive diagnostic imaging of early-stage Alzheimer's disease. **Nature Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 91–98, 22 dez. 2014.
- VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 183–206, fev. 2015.
- WALSH, D. M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 535–539, 4 abr. 2002.
- WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. Abeta Oligomers - a decade of discovery. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 5, p. 1172–1184, jun. 2007.
- WANG, X. P. et al. Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers. **FEBS Letters**, v. 583, n. 3, p. 579–584, 2009.
- WHITLOW, M.; FILPULA, D. Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. **Methods**, v. 2, n. 2, p. 97–105, abr. 1991.
- WISNIEWSKI, T.; GOÑI, F. Immunotherapy for Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 499–507, abr. 2014.

- XIAO, C. et al. Brain transit and ameliorative effects of intranasally delivered anti-amyloid- β oligomer antibody in 5XFAD mice. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 35, n. 4, p. 777–88, 2013.
- YANG, M.; TELOW, D. B. Amyloid beta-protein monomer folding: free-energy surfaces reveal alloform-specific differences. **Journal of molecular biology**, v. 384, n. 2, p. 450–64, 12 dez. 2008.
- YU, X. et al. Morphine and Endomorphins Differentially Regulate μ -Opioid Receptor mRNA in SHSY-5Y Human Neuroblastoma Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 447–454, 29 abr. 2003.
- ZETTERBERG, H. et al. Effect of Immunotherapy With Bapineuzumab on Cerebrospinal Fluid Biomarker Levels in Patients With Mild to Moderate Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 8, p. 1002, 1 ago. 2012.
- ZHAO, W.-Q. et al. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 1, p. 246–260, 28 ago. 2007.

ANEXO A – Artigo aceito para publicação: “A human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid- β oligomers”

DR. ADRIANO SEBOLLELA (Orcid ID : 0000-0002-7444-9156)

Article type : Original Article

A human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid- β oligomers

Adriano Sebollela,^{1,2,3,*} Erika N. Cline,^{1,*} Izolda Popova,⁴ Kevin Luo,¹ Xiaoxia Sun,¹ Jay Ahn,¹ Milena A. Barcelos,² Vanessa N. Bezerra,² Natalia M. Lyra e Silva,² Jason Patel,¹ Nathalia R. Pinheiro,³ Lei A. Qin,¹ Josette M. Kamel,¹ Anthea Weng,¹ **Nadia DiNunno**,¹ Adrian M. Bebenek,^{1,5} Pauline T. Velasco,¹ Kirsten L. Viola,¹ Pascale N. Lacor,¹ Sergio T. Ferreira,^{2,6} and William L. Klein¹

¹Department of Neurobiology, Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA; ²Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil; ³Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil; ⁴Recombinant Protein Production Core (rPPC), Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA; ⁵Illinois Math and Science Academy, Aurora, IL 60506, USA; ⁶Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil

* These authors contributed equally to this work

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/jnc.14118

This article is protected by copyright. All rights reserved.