

**CAMPOS, R. M. Novas abordagens para detecção e caracterização bioquímica dos principais biomarcadores da doença de Alzheimer.** Tese (Doutorado em Bioquímica) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta atualmente 55 milhões de pessoas no mundo, sendo a forma mais comum de demência. A DA se caracteriza pela perda sináptica, desencadeada por agregados solúveis do peptídeo  $\beta$ -amiloide. Estes agregados, conhecidos como oligômeros de  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os), constituem um dos principais biomarcadores da DA. Outro biomarcador de grande importância na DA são os emaranhados neurofibrilares, formados pela agregação da proteína neuronal associada a microtúbulo Tau que decorre de sua hiperfosforilação aberrante. Apesar da relevância dos A $\beta$ Os e da Tau na patologia da DA, detalhes bioquímicos acerca das conformações mais neurotóxicas desses biomarcadores ainda é discutida. Revelar esses detalhes é fundamental para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficientes. Na primeira etapa deste trabalho, investigamos a estabilidade da proteína Tau em extratos de cérebro de diferentes modelos animais por western blot. Nossos dados revelaram que ocorre proteólise parcial da Tau em extratos submetidos a um ciclo de descongelamento, mesmo na presença de inibidores, com potencial relevância na reprodutibilidade de ensaios de dosagem de Tau em modelos animais de neurodegeneração. Em seguida, focamos no isolamento de espécies oligoméricas de A $\beta$  *in vitro* e obtidas de modelos animais, com subsequente caracterização destas espécies. Para isso, usamos como principal ferramenta um anticorpo conformacional do tipo scFv – NUsc1 – previamente caracterizado por nosso grupo, que apresenta alta seletividade por oligômeros com peso molecular > 50 kDa. Após o isolamento bioquímico, dados de cromatografia de gel-filtração e espectrometria de massas nativa indicaram que as espécies isoladas tem peso molecular estimado entre 100 e 250 kDa. Além disso, demos seguimento a estudos prévios sobre o potencial do anticorpo NUsc1 ligado a fago como ferramenta de detecção de A $\beta$ Os neurotóxicos em amostras derivadas de tecido. Determinamos que nosso ELISA usando NUsc1 ligado a fago detecta até 1 femtomol de A $\beta$ Os. O ensaio foi capaz ainda de detectar eficientemente A $\beta$ Os em homogenatos de diferentes modelos animais de DA. Dados preliminares também indicam que o ensaio é eficaz na detecção de A $\beta$ Os em líquido de ratos transgênicos. Nossos resultados apontam que NUsc1 é uma excelente ferramenta para o isolamento e, principalmente na detecção de agregados relevantes em diversos modelos animais da doença, possibilitando a caracterização estrutural destas espécies e contribuindo para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas mais sensíveis que poderão auxiliar no diagnóstico molecular precoce da DA.

**Palavras-chave:** Oligômeros. Beta-amiloide. Doença de Alzheimer. Anticorpos. NUsc1. scFv. Tau. ELISA.