

DANIELLE COZACHENCO FERREIRA

ENVOLVIMENTO DE REGULADORES TRADUCIONAIS E
DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA EM
MODELOS DE TOXICIDADE DE OLIGÔMEROS DE A β



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2016

Trabalho realizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do Professor Sergio Teixeira Ferreira e coorientação do Mestre Felipe Campos Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

F383e Ferreira, Danielle Cozachenco

Envolvimento de reguladores traducionais e do sistema ubiquitina-proteassoma em modelos de toxicidade de oligômeros de A β / Danielle Cozachenco Ferreira. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2016. 66f.

Orientador: Sergio Teixeira Ferreira

Coorientador: Felipe Campos Ribeiro

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2016.

1. Doença de Alzheimer 2. Oligômeros de A β 3. Reguladores traducionais 4. Sistema ubiquitina-proteassoma I. Ferreira, Sergio Teixeira II. Ribeiro, Felipe Campos III. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. IV. Envolvimento de reguladores traducionais e do sistema ubiquitina-proteassoma em modelos de toxicidade de oligômeros de A β

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELLE COZACHENCO FERREIRA

**ENVOLVIMENTO DE REGULADORES TRADUCIONAIS E DO SISTEMA
UBIQUITINA-PROTEASSOMA EM MODELOS DE TOXICIDADE DE OLIGÔMEROS
DE A β**

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2016

(Marcelo Torres Bozza, professor associado, IMPPG)

(Ana Lucia Moraes Giannini, professora adjunta, PGGen)

(Mychael Vinícius da Costa Lourenço, PhD, IBqM)

(Leandro Araújo Lobo, professor adjunto, IMPPG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, por sempre me apoiarem e me incentivarem nos estudos e por todos os sacrifícios feitos para garantir que eu fosse capaz de perseguir os meus sonhos. Agradeço eternamente aos dois por sempre fazerem de tudo para me ver feliz.

Agradeço à minha família (incluindo Zoe e JJ) pela presença em minha vida. Aos meus tios e prima, por todo apoio, torcida, conselhos e preocupações que sempre tiveram comigo. À minha avó, por tudo isso e mais.

Agradeço à todos os amigos que me acompanharam da infância até hoje, por compartilharem comigo inúmeros bons momentos, em especial aos que estiveram ao meu lado durante essa trajetória na universidade, nas salas de aula ou no laboratório.

Agradeço também aos excelentes professores do IMPPG que tive ao longo do curso, pelas ótimas aulas, pelo carinho e dedicação em nos ensinar.

Agradeço demais aos “camungas” por todo o suporte no laboratório e fora dele. Por todas as chopadas, baladas, bares e noites viradas na casa de um ou de outro. Paula, Danizocka, Ju Fontes, Ju Tiemi, Bruninho, Ricardão, Felipinho, Guilherme e Ricardinho, muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

Agradeço à toda a equipe LDN/LInDA por criar um ambiente tão bom de trabalho. Um ambiente onde temos espaço para discutir, tirar dúvidas, aprender e ainda bater papo tomando um cafezinho. Andrezinho, Helen, Vivian, Clari, Maurício, Dani Beckman, Mychael e Grasi (e todo o resto), todos contribuíram de alguma forma para minha evolução dentro do laboratório. Obrigada em especial à Nat, que teve paciência comigo assim que entrei e tirava dúvidas o tempo inteiro, e ao Luis, pelas inúmeras discussões enriquecedoras ao longo desse ano.

Às técnicas Mariângela, Dominique e Meyre (nossa lab manager) pela dedicação em nos proporcionar um ambiente mais organizado e tornarem nosso trabalho mais fácil.

Agradeço às profs. Cláudia Figueiredo e Júlia Clarke pela orientação no início da minha iniciação científica que me permitiu tamanho amadurecimento profissional durante esse período.

Agradeço à Paulinha pela ajuda e companhia em experimentos demorados e/ou no sábado que costumávamos fazer. Obrigada por me acalmar nas vezes que me estressei com seu jeito otimista “calma, tá tudo bem”.

Agradeço à Ju Tiemi por todas as vezes (e não foram poucas) que me ajudou no lab, sempre com muito carinho e paciência. Obrigada por ser tão disponível e dedicada a me ajudar. Obrigada pela amizade, parceria, animação e bom humor.

Agradeço muito ao meu namorado, Cadinho, por todo o apoio na vida profissional e pessoal, por sempre me ouvir e fazer de tudo para me ajudar. Obrigada por ter estado ao meu lado durante esse período, seja aqui pertinho ou do outro lado do oceano. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo amor, pela paciência e por todas as viagens e momentos que passamos juntos.

Agradeço ao Felipinho que, além de coorientador, é um grande amigo. Muito obrigada por tudo que passamos este ano, desde os experimentos até tarde no sábado, até as cervejas em barzinhos à noite. Obrigada por me aturar praticamente de segunda a segunda, o dia inteiro. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, incentivos, discussões sobre o projeto... Enfim, te agradeço o tanto que aprendi e evoluí neste ano. Mais do que isso, te agradeço por tornar um sábado no Fundão em experimento tão prazeroso e gratificante.

Ao meu orientador, prof. Sergio Ferreira, e à prof^a Fernanda de Felice por me acolherem no laboratório, pelo ambiente tão agradável que proporcionam, pelo carinho e constante preocupação que têm com toda a equipe e pela contribuição na minha formação.

Por fim, às agências de fomento CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

DANIELLE COZACHENCO FERREIRA

ENVOLVIMENTO DE REGULADORES TRADUCIONAIS E DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMA EM MODELOS DE TOXICIDADE DE OLIGÔMEROS DE A β

Orientador: Sergio T. Ferreira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Evidências crescentes apontam que o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), principal maquinaria de degradação celular, encontra-se inibido na doença de Alzheimer (DA). Essa inibição parece diminuir a degradação do peptídeo β -amiloide (A β), facilitando seu acúmulo e agregação, formando oligômeros de A β (A β Os), neurotoxinas fundamentais na DA. A inibição do proteassoma também parece levar a diminuição de proteínas sinápticas, característica da DA. Por outro lado, já foi demonstrado que ocorre redução da síntese global de proteínas em modelos de DA. Esses dois eventos podem estar interligados, por exemplo, através de repressores traducionais. Nós hipotetizamos que, na DA, A β Os induzem inibição proteassomal, que levaria ao acúmulo de repressores traducionais que, por fim, inibiriam a tradução, especialmente de proteínas sinápticas.

A partir disso, investigamos quais alterações os A β Os, utilizados como modelo agudo de DA pelo nosso grupo, causam no UPS e na síntese de proteínas, avaliando reguladores traducionais. Vimos, por exemplo, que os A β Os induzem redução do proteassoma em sinapses neuronais. Vimos também aumento de expressão do gene *Fmr1* e da proteína correspondente, o repressor *Fragile-X mental retardation protein* (FMRP), em culturas neuronais hipocampais expostas a A β Os ou lactacistina, inibidor farmacológico do proteassoma. Já em relação à tradução, observamos diminuição de diversas proteínas das vias de ERK e mTOR no hipocampo de camundongos *Swiss* 7 dias depois da injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de A β Os. Essas vias estão associadas à síntese de proteínas sinápticas e regulação dos níveis de FMRP. Portanto, nossos resultados sugerem que os A β Os induzem disfunção proteassomal, acúmulo de repressores e redução da tradução, possivelmente por intermédio das alterações no UPS.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, oligômeros de A β , reguladores traducionais, sistema ubiquitina-proteassoma

ABSTRACT

DANIELLE COZACHENCO FERREIRA

INVOLVEMENT OF TRANSLATIONAL MODULATORS AND THE UBIQUITIN- PROTEASOME SYSTEM ON A β OLIGOMERS TOXICITY MODELS

Supervisor: Sergio T. Ferreira

Summary of the monograph presented to the Institute of Microbiology Paulo de Góes at the Federal University of Rio de Janeiro, as a partial requirement for obtaining the Bachelor degree in Biological Sciences: Microbiology and Immunology.

Increasing evidence shows that the ubiquitin-proteasome system (UPS), the main cellular degradation machinery, is inhibited in Alzheimer's disease (AD). This inhibition seems to reduce amyloid- β peptide (A β) degradation, facilitating its accumulation and aggregation, forming A β oligomers (A β Os), major neurotoxins in AD. Proteasome inhibition also seems to induce decrease of synaptic proteins levels, which is characteristic of AD. On the other hand, studies have shown decrease of global protein synthesis in models of AD. These two events may be connected, for example, via translational repressors. We hypothesize that, in AD, A β Os induce proteasomal inhibition, which it'd lead to translational repressors accumulation that, lastly, it'd inhibit translation, especially of synaptic proteins.

From that, we investigated what alterations A β Os, used as an acute model of AD in our group, cause in the UPS and protein synthesis, analyzing translational modulators. We found, for example, that A β Os induce proteasome decrease in neuronal synapses. We also found the increase of *Fmr1* gene expression and its corresponding repressor protein, *Fragile-X mental retardation protein* (FMRP), in hippocampal neurons cultures exposed to A β Os or lactacystin, a pharmacological inhibitor of proteasome. Regarding the translation, we found decrease of many ERK and mTOR pathway proteins, in hippocampi of *Swiss* mice 7 days after intracerebroventricular (i.c.v.) injection of A β Os. These pathways are associated with synaptic protein synthesis and FMRP levels regulation. Therefore, our results suggest that A β Os induce proteasomal dysfunction, repressors accumulation and translation decrease, possibly through UPS alterations.

Key-words: Alzheimer's disease, A β oligomers, translational modulators, ubiquitin-proteasome system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores histopatológicos da doença de Alzheimer.....	3
Figura 2. Processamento da proteína precursora amiloide (APP).....	3
Figura 3. O proteassoma 26S e as etapas de ubiquitinação.....	7
Figura 4. Etapas da tradução.....	13
Figura 5. Mecanismos de repressão da tradução por FMRP.....	15
Figura 6. Sinalização de mGluR através das vias de ERK e mTOR.....	18
Figura 7. Caracterização dos A β Os.....	21
Figura 8. A β Os causam diminuição da marcação de Rpt6 em prolongamentos sinápticos..	29
Figura 9. O tratamento de lactacistina utilizado não causa morte em cultura de neurônios hipocampais.....	31
Figura 10. A β Os e lactacistina causam tendência ao aumento dos níveis e expressão de FMRP.....	33
Figura 11. A β Os induzem tendência ao aumento nos níveis de ATF4 no hipocampo de camundongos 7 dias após injeção i.c.v.....	34
Figura 12. Lactacistina causa tendência a diminuição da fosforilação de eIF4E <i>in vitro</i>	36
Figura 13. A β Os causam diminuição da fosforilação de eIF4E e 4E-BP1 7 dias após injeção i.c.v.....	39
Figura 14. A β Os causam tendência à diminuição da fosforilação de S6K e S6 7 dias após injeção i.c.v.....	40
Figura 15. A β Os causam diminuição da fosforilação de ERK e mTOR após injeção i.c.v..	41

LISTA DE SIGLAS

- 4E-BP – do inglês, *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*
- A β – peptídeo β -amiloide
- A β Os – oligômeros do peptídeo β -amiloide
- AICD – domínio intracelular da APP
- APO - apomorfina
- APP – proteína precursora amiloide
- ATF4 – do inglês, *activating transcription factor 4*
- BACE – do inglês, *β -site APP cleaving enzyme*
- BDNF – do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*
- cAMP – monofosfato cíclico de adenosina
- CREB – do inglês, *cAMP-response-element-binding protein*
- CYFRIP1 – do inglês, *cytoplasmic FMRP-interacting protein 1*
- DA – doença de Alzheimer
- DUBs – enzimas deubiquitinases
- eIF – fator de iniciação eucariótico
- eEF – fator de alongamento eucariótico
- E-LTP – do inglês, *early phase LTP*
- FMRP – do inglês, *Fragile-X mental retardation protein*
- i.c.v. – intracerebroventricular
- IDE – enzima degradadora de insulina
- LTD – depressão de longa duração
- LTF – facilitação de longa duração
- LTP – potencial de longa duração
- L-LTP – do inglês, *late phase LTP*
- mRNA – RNA mensageiro
- mGluR – receptor metabotrópico de glutamato
- NFTs – emaranhados neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangles*)
- NMDAR - receptor N-metil-D-aspartato
- PABP – do inglês, *poly(A)-binding protein*
- Paip2 – do inglês, *polyadenylate-binding protein interacting protein 2*

PDE4 – fosfodiesterase-4

PI3K – do inglês, *phosphatidyl inositol 3 kinase*

PKA – proteína quinase A

PSD-95 – do inglês, *postsynaptic density protein 95*

RISC – do inglês, *RNA-induced silencing complex*

ROS – espécies reativas de oxigênio

Rpn – do inglês, *regulatory particle non-ATPase*

Rpt – do inglês, *regulatory particle triple-A protein*

tRNA – RNA transportador

UBB(+1) – forma mutada de ubiquitina

UCH-L1 – do inglês, *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*

UCHs – do inglês, *ubiquitin carboxy-terminal hydrolases*

UPS – sistema ubiquitina-proteassoma

USP – do inglês, *ubiquitin-specific proteases*

ÍNDICE

Lista de Figuras	ix
Lista de Siglas	x
1) Introdução.....	1
1.1) A doença de Alzheimer	1
1.1.1) Epidemiologia	1
1.1.2) Histórico	1
1.1.3) Marcadores histopatológicos	2
1.1.4) Oligômeros de β -amiloide.....	4
1.2) O sistema ubiquitina-proteassoma	5
1.2.1) Proteassoma 26S	5
1.2.2) Ubiquitinação de substratos	5
1.3) Envolvimento do proteassoma na DA.....	8
1.4) Mecanismos de plasticidade sináptica.....	9
1.5) UPS na plasticidade sináptica e na memória.....	10
1.6) Tradução de proteínas	11
1.7) Mecanismos de regulação da tradução.....	14
1.8) FMRP e a via de mTOR.....	16
2) Justificativa	19
3) Objetivos	19
4) Metodologia	20
4.1) Considerações éticas	20
4.2) Preparo e caracterização de A β Os.....	20
4.3) Injeção i.c.v. de A β Os em camundongos	21
4.4) Preparação enriquecida em sinaptossomos	22
4.5) Preparo, cultivo e tratamento de culturas primárias de neurônios hipocampais	23
4.6) Ensaio <i>Live/Dead</i>	23
4.7) Imunocitoquímica	24
4.8) Dosagem de proteínas totais e <i>Western blot</i>	24
4.9) Extração de RNA e síntese de cDNA	25
4.10) PCR em Tempo Real.....	27
4.11) Análises estatísticas.....	27
5) Resultados	28
5.1) A β Os causam diminuição da subunidade proteassomal Rpt6 em prolongamentos sinápticos	28
5.2) A concentração de lactacistina utilizada não causa morte em cultura de neurônios hipocampais.....	30
5.3) A β Os induzem aumento nos níveis e expressão de FMRP em cultura de neurônios hipocampais e sinaptossomas isolados	32

5.4) A β Os induzem tendência ao aumento nos níveis de ATF4 7 dias após injeção i.c.v.	34
5.5) Lactacistina causa tendência à diminuição da fosforilação de eIF4E	35
5.6) A β Os causam alterações nas vias de ERK e mTOR 7 dias após injeção i.c.v.	37
6) Discussão	42
7) Conclusão	46
8) Referências bibliográficas.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1.A doença de Alzheimer

1.1.1. Epidemiologia

À medida que ocorre um aumento da expectativa de vida da população mundial, há também um aumento na incidência de doenças crônicas e incapacitantes, como a demência. No Brasil, 55,1% das demências são decorrentes da doença de Alzheimer (DA) (Herrera *et al.*, 2002).

A DA é a maior causa de demência no mundo, acometendo 1 em cada 10 pessoas após os 65 anos de idade (Thies *et al.*, 2013). Devido ao aumento da população idosa, a doença tem se tornado um desafio para a saúde pública. Além do impacto na vida dos pacientes e seus familiares, a doença tem um enorme impacto na economia.

Nos EUA, o custo atual já é de 226 bilhões de dólares ao ano, sendo previsto um aumento dos gastos de até 1 trilhão de dólares anual até 2050 (Alzheimer's Association, 2015).

Apesar do enorme avanço nas pesquisas nos últimos anos, ainda não há uma terapia eficaz capaz de impedir ou reverter a progressão da doença. Os medicamentos aprovados até o momento são somente paliativos (Melnikova, 2007).

1.1.2. Histórico

A DA foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista Alois Alzheimer, após publicar o relato de caso de sua paciente Auguste Deter. Com 51 anos de idade, Auguste apresentava comportamento imprevisível, desorientação e prejuízo cognitivo pronunciado (Maurer, Volk, e Gerbaldo, 1997).

Após a morte de Auguste, Dr. Alzheimer realizou análises histológicas de seu cérebro, encontrando atrofia generalizada no córtex cerebral, região associada às habilidades intelectuais, e no hipocampo, região associada ao processamento de memória.

Encontrou, ainda agregados proteicos, que denominou de “inclusões filamentosas” e “placas senis” (Moller e Graeber, 1998).

1.1.3. Marcadores histopatológicos

Somente cerca de 70 anos mais tarde, descobriu-se que o principal componente das inclusões filamentosas, agora chamada de emaranhados neurofibrilares (NFTs), é a proteína tau (Goedert *et al.*, 1988). Esta proteína é responsável pela estabilização do microtúbulo e, em cérebros de pacientes acometidos pela DA, torna-se hiperfosforilada e agregada no interior de neurônios (Bancher *et al.*, 1989).

Já as placas senis ou placas amiloides (Fig. 1) são compostas pelo acúmulo do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) (Glennner e Wong, 1984), formado a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Essa proteína sofre processamento por duas vias: pela via não-amiloidogênica e pela amiloidogênica.

Na via não-amiloidogênica, a APP é clivada pela α -secretase, liberando o fragmento solúvel sAPP α no meio extracelular; seguida da γ -secretase, liberando o fragmento p3 no meio extracelular e o domínio intracelular da APP (AICD) no meio intracelular.

Já na via amiloidogênica, a clivagem da APP é realizada através da ação da β -secretase, liberando o fragmento solúvel sAPP β no meio extracelular; seguida da γ -secretase, liberando o AICD e, no meio extracelular, o $A\beta$ (Fig. 2).

As β -secretases foram identificadas como sendo as proteínas *β -site APP cleaving enzyme* (BACE) 1 e 2; enquanto o complexo de γ -secretases parece ser dependente da atividade proteolítica das proteínas nicastrina e das presenilinas 1 e 2. As α -secretases, por outro lado, podem ser atribuídas a diversas proteínas e não parecem ser específicas para APP (Turner *et al.*, 2003).

O sítio de clivagem da APP pela γ -secretase determina o tamanho do peptídeo $A\beta$ (Gu *et al.*, 2004), que pode conter entre 39 a 43 aminoácidos. Enquanto o peptídeo contendo 40 aminoácidos é a forma predominante em condições fisiológicas, $A\beta$ contendo 42 é a forma mais encontrada no cérebro com DA (Castaño *et al.*, 1986). Diferentemente do $A\beta_{1-40}$, o peptídeo $A\beta_{1-42}$ possui maior tendência à agregação, formando oligômeros solúveis, protofibrilas, fibrilas e placas (Ferreira e Klein, 2011).

Apesar da associação da via amiloidogênica com a DA, a clivagem da APP ocorre também em condições fisiológicas, e cada fragmento obtido possui uma função, incluindo o $A\beta$. Por exemplo, já foi mostrado que a adição de $A\beta$ em cultura de neurônios impede a morte celular em resposta a inibição de β e γ -secretases, o que significa que o peptídeo $A\beta$ em alguma instância é necessário para a sobrevivência neuronal (Plant *et al.*, 2003). Ainda que pareça contraditório, em baixas

concentrações, o $A\beta_{1-42}$ também é capaz de melhorar a plasticidade sináptica e memória, demonstrado através de tarefa comportamental de medo condicionado (Puzzo *et al.*, 2008).

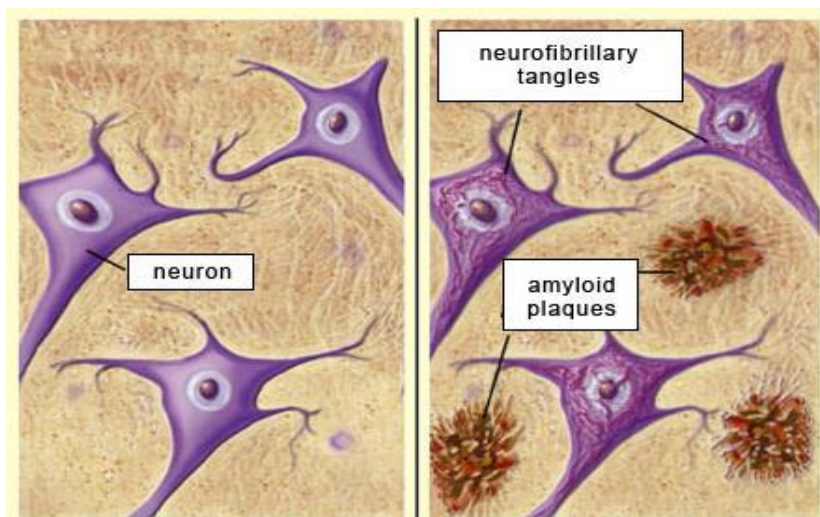


Figura 1. Marcadores histopatológicos da doença de Alzheimer. Esquema do cérebro de indivíduos com DA (direita) comparado a de indivíduos normais (esquerda). No cérebro com DA, é vista a presença dos emaranhados neurofibrilares intracelulares e das placas amiloides extracelulares (adaptado de <http://thebrain.mcgill.ca>).

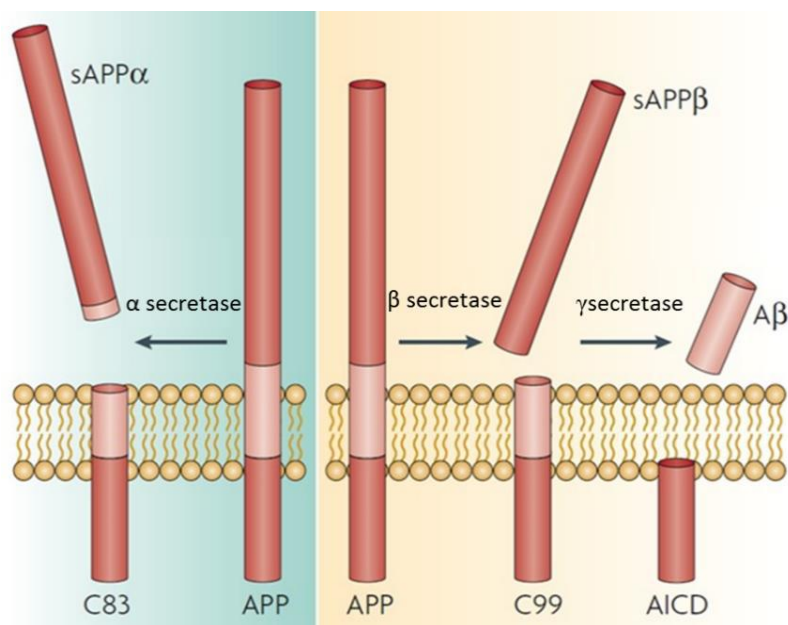


Figura 2. Processamento da proteína precursora amiloide (APP). Esquema do processamento da APP pela via não-amiloidogênica (esquerda), realizada pela α -secretase, liberando o fragmento sAPP α , e pela via amiloidogênica (direita), realizada pela β e γ -secretases, liberando o peptídeo A β no meio extracelular (adaptado de Laferla, Green, e Oddo, 2007).

1.1.4. Oligômeros de β -amiloide

As placas amiloides, de acordo com a teoria da cascata amiloide, eram vistas como principais causadoras da patogênese da DA, sendo responsáveis pela geração de NFTs, lesão vascular e morte neuronal (Hardy e Higgins, 1992). Tal hipótese foi sustentada pelas seguintes evidências: (1) a trissomia no cromossomo 21, localização do gene da APP, está associada a casos de DA (Rumble *et al.*, 1989); (2) mutações nos genes de presenilina 1 e 2, responsáveis pela DA familiar, aumentam o processamento da APP para formação de A β (Scheuner *et al.*, 1996); e (3) o acúmulo de A β induz a fosforilação, agregação e perda de afinidade da proteína tau pelo microtúbulo (Busciglio *et al.*, 1995; Tokutake *et al.*, 2012).

No entanto, estudos posteriores desafiaram tal hipótese ao demonstrar a neurotoxicidade associada ao A β mesmo na ausência de agregados insolúveis, como fibras ou placas (Sloane *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2003). Além disso, as placas amiloides são encontradas no cérebro de indivíduos idosos não demenciados (Serrano-Pozo *et al.*, 2011), indicando a falta de correlação entre as placas e a patogênese da DA. Sendo assim, foi levantada uma nova teoria propondo que o A β agregado em espécies solúveis globulares formando oligômeros de A β (A β Os) seriam as neurotoxinas centrais na DA (Hardy e Selkoe, 2002).

De acordo com essa nova hipótese, o acúmulo de A β Os seria a primeira etapa associada à patologia da DA. A corroboração à nova teoria surgiu ao se demonstrar que A β Os são capazes de: (1) causar morte celular em concentrações nanomolares; (2) inibir a indução do potencial de longa duração (LTP), bloquear a formação de memórias (Lambert *et al.*, 1998); (3) aumentar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo estresse oxidativo; (4) induzir disfunção na sinalização de cálcio, fundamental para os processos de plasticidade sináptica; e (5) induzir a hiperfosforilação de tau (Demuro *et al.*, 2005; Chafekar *et al.*, 2007; De Felice *et al.*, 2007; Pigino *et al.*, 2009; Shipton *et al.*, 2011).

A degradação do peptídeo A β enzimática é realizada principalmente por duas proteases extracelulares, a neprilisina e a enzima degradadora de insulina (IDE) (Fawzi *et al.*, 2010; Miners *et al.*, 2011). Já os A β Os e as fibrilas podem ser fagocitados pela microglia e direcionados à degradação pela via lisossomal ou autofágica (Yang *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014).

No cérebro de pacientes com DA, os A β Os que se acumulam no meio extracelular são capazes de escapar do processo de depuração celular, provocando disfunção sináptica e morte neuronal. Esse acúmulo de proteínas tóxicas pode ocorrer devido a falhas nos mecanismos de degradação

celular. Em especial, no sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), principal via proteolítica da célula eucariótica, visto que a presença de proteínas ubiquitinadas em inclusões intracelulares é uma característica associada a diversas doenças neurodegenerativas (Ross e Poirier, 2004).

1.2. O sistema ubiquitina-proteassoma

1.2.1 Proteassoma 26S

A degradação de proteínas necessária para manutenção celular é realizada através dos lisossomos ou do UPS. Um dos papéis do UPS é fornecer o controle de qualidade celular, marcando para degradação proteínas mal enoveladas ou erroneamente modificadas. Nesse sistema, a proteína alvo é reconhecida através da poliubiquitinação, ou seja, uma modificação pós-traducional em que a proteína ubiquitina é associada a seu alvo, que então pode ser direcionado para degradação pelo proteassoma 26S.

O proteassoma 26S é um complexo proteolítico dependente de ATP formado a partir de duas porções: uma porção 20S catalítica e a partícula 19S regulatória (Fig. 3a). A subunidade 20S possui sete anéis cilíndricos β internos que apresentam atividade catalítica, sendo $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ que possuem atividade como proteases de treonina. Essas subunidades clivam ligações peptídicas em sítios C-terminais depois de resíduos ácidos, básicos e hidrofóbicos, e são chamadas atividade de caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente. Já os anéis externos são formados por sete subunidades α cuja função é atuar como um portão para que o substrato seja reconhecido e degradado pelas subunidades β .

A partícula 19S regulatória é dividida em dois subcomplexos: a base e a tampa. Enquanto a base é composta de seis subunidades ATPases, *regulatory particle triple-A protein* (Rpt) 1 a 6, e três subunidades não-ATPases, *regulatory particle non-ATPase* (Rpn) 1 a 3; a tampa é composta de nove subunidades não-ATPases (Rpn 3,5 a 9, 11, 12 e 15). A base tem por função o desenovelamento de substratos e a captura de proteínas ubiquitinadas, ao passo que a tampa é necessária para deubiquitinação de proteínas marcadas.

1.2.2. Ubiquitinação de substratos

A ligação de ubiquitina em proteínas alvo possui outras funções na célula além de marcá-las para degradação. Dentre elas: reparo de DNA, internalização e endereçamento de proteínas, e resposta ao estresse; dependendo do resíduo de lisina ubiquitinado (Mabb e Ehlers, 2010).

A reação de ubiquitinação ocorre em três etapas: (1) a enzima ativadora E1 liga a ubiquitina em sítios de cisteína em uma etapa dependente de ATP; (2) em seguida, a enzima carreadora de ubiquitina E2 transfere a ubiquitina para seus resíduos de cisteína; e, por fim, (3) a enzima E3 ubiquitina ligase transfere a ubiquitina para a proteína alvo (Hershko e Ciechanover, 1998). O endereçamento para o proteassoma é usualmente feito através da poliubiquitinação do substrato no resíduo de lisina 48 (Fig. 3b). Essas etapas garantem a maior especificidade da reação, especialmente pelas enzimas E3 ubiquitina ligase, existindo mais de 600 em humanos (Berndsen *et al.*, 2014).

A proteína após ser ligada a ubiquitina ainda pode sofrer uma reação de deubiquitinação por enzimas deubiquitinases (DUBs) e escapar da degradação. As principais DUBs pertencem a duas famílias: *ubiquitin-specific proteases* (USPs) e *ubiquitin carboxy-terminal hydrolases* (UCHs). Essas enzimas podem atuar tanto impedindo a degradação, ao remover a ubiquitina antes que a proteína alvo seja clivada, como a facilitando, ao promover a liberação de ubiquitina monomérica livre. Portanto, para garantir que uma proteína ligada a ubiquitina seja de fato degradada, tais processos precisam ser devidamente regulados.

Assim sendo, a regulação do UPS pode se dar pela atividade, expressão ou localização de suas enzimas (Varshavsky, 2005; Xie e Varshavsky, 2001); assim como por modificações pós-traducionais em suas subunidades. Um exemplo é a fosforilação de Rpt6, subunidade da partícula regulatória 19S, que além de aumentar a atividade do proteassoma, promove seu transporte do corpo celular do neurônio para as espinhas dendríticas (Djakovic *et al.*, 2009), local onde ocorre a transmissão sináptica. Em leveduras, foi descoberta uma subunidade constitutiva, Rpn 4, capaz de induzir aumento de todas as demais subunidades. Já em mamíferos, o fator de transcrição *nuclear factor erythroid derived 2-related factor 1* (NRF1) possui um papel similar (Radhakrishnan *et al.*, 2010).

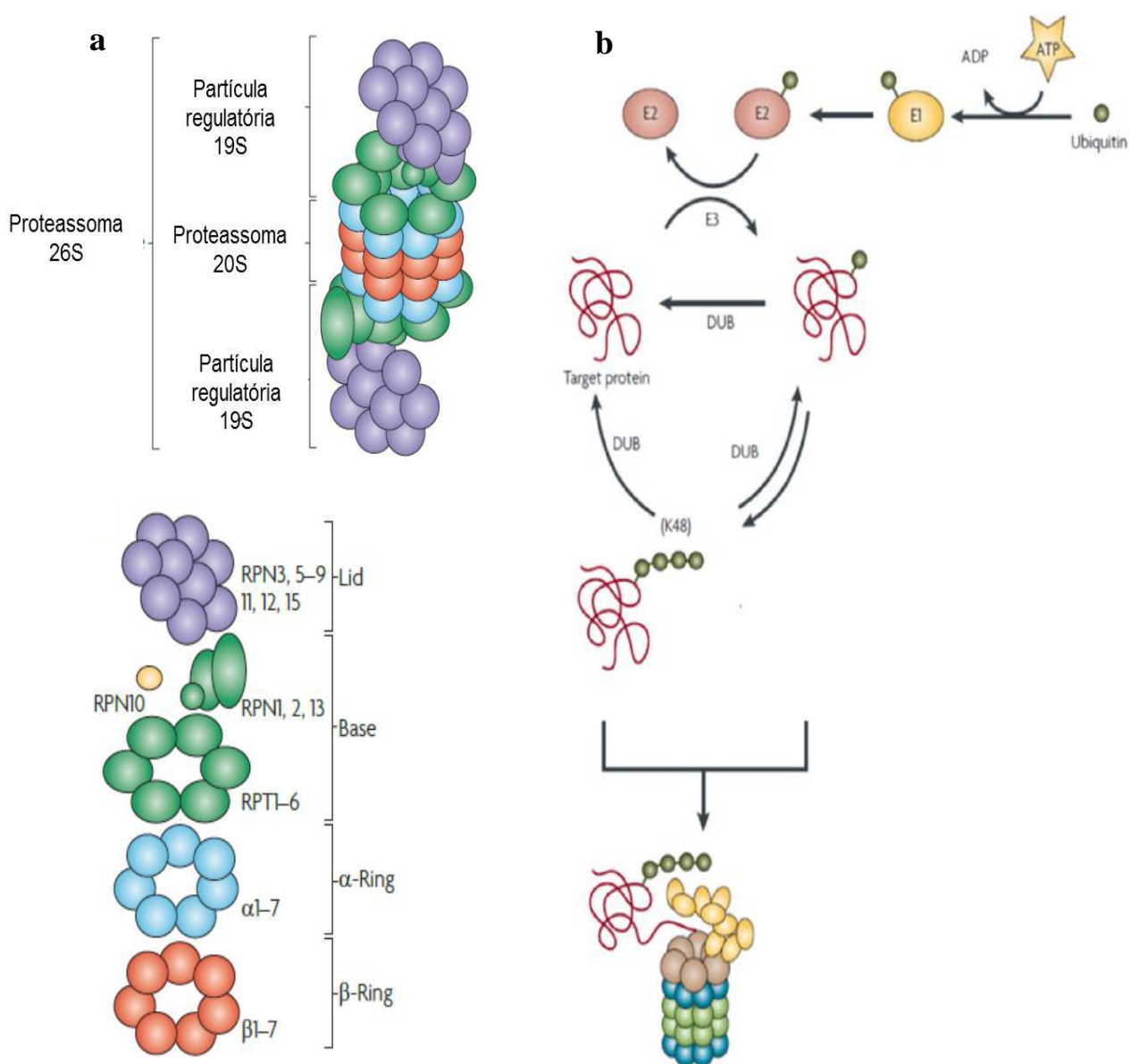


Figura 3. O proteassoma 26S e as etapas da ubiquitinação. (A) Esquema da partícula central 20S, formada por 2 anéis α exteriores e 2 anéis β interiores, e partícula regulatória 19S, formada por 2 subcomplexos, base e tampa (adaptado de Murata *et al.*, 2009). (B) Etapas de ubiquitinação: a ubiquitina se liga à E1, em seguida à E2 e, então, à proteína alvo, através da E3. O substrato pode sofrer poliubiquitinação e ser degradado pelo proteassoma, ou sofrer ação de deubiquitinases (DUBs) e escapar da destruição (adaptado de Tai e Schuman, 2008).

1.3. Envolvimento do proteassoma na DA

Desde a demonstração da presença de proteínas ubiquitinadas nos NFTs e nas placas amiloides no cérebro *post mortem* de pacientes com DA (Perry *et al.*, 1987), diversos trabalhos vêm apontando para uma estreita relação entre disfunções no UPS e a DA.

Alguns anos mais tarde, foi demonstrado, também em análises *post mortem* de pacientes com DA, a inibição da atividade do proteassoma (Keller *et al.*, 2000). Estudos posteriores confirmaram a diminuição dessa atividade, assim como observaram o aumento de ubiquitinação, em modelo *in vitro* para DA (Almeida, *et al.*, 2006) e em modelo transgênico de tauopatia (Myeku *et al.*, 2015). A inibição do proteassoma parece ocorrer com diminuição da expressão de $\beta 5$ e da atividade de quimiotripsina (Aso *et al.*, 2012). Por outro lado, quando a atividade do proteassoma é recuperada, o declínio cognitivo é revertido (Myeku *et al.*, 2015).

Outros fatores evidenciados em pacientes com DA são: a presença de uma forma mutada de ubiquitina (UBB+1) e a diminuição nos níveis da deubiquitinase *ubiquitin carboxy-terminal hydrolases L1* (UCH-L1) (Osaka *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). A UBB+1 possui 19 aminoácidos adicionais na parte C-terminal, é resistente à ação de deubiquitinases (Dennissen *et al.*, 2011), inibe a degradação pelo proteassoma e induz morte neuronal (Tan *et al.*, 2007).

A diminuição da atividade da UCH-L1, por sua vez, também já foi demonstrada em animais transgênicos para DA (Gong *et al.*, 2006). Essa evidência pode significar uma redução de ubiquitina livre e, dessa forma, o impedimento da marcação de substratos para degradação. Possivelmente, ainda, essa redução está associada ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas evidenciado na DA (Ross e Poirier, 2004). Outra possível consequência dessa redução é o escape de substratos da degradação. Como o UPS falha em degradar os A β Os, talvez a diminuição dessa enzima seja um importante fator para a disfunção do UPS na doença. Entretanto, até o momento não há trabalhos na literatura que investiguem esses mecanismos.

Além disso, a inibição do proteassoma pelo fármaco lactacistina parece causar um aumento drástico de A β intracelular em linhagens neuronais (Tseng *et al.*, 2008). De acordo com tais evidências, então, tem sido proposto que a inibição do proteassoma é um fator fundamental para o acúmulo e agregação de A β (Baranello *et al.*, 2015). É proposto, ainda, um mecanismo de retroação positiva: o A β inibe o proteassoma, logo, sua degradação é reduzida e seus níveis aumentados, facilitando a formação e o acúmulo dos A β Os (Oh *et al.*, 2005).

1.4. Mecanismos de plasticidade sináptica

O processo de memória refere-se à aquisição, armazenamento e evocação de informações. A memória pode ser dividida em memória de curta ou longa duração. Além da diferença entre o período o qual a memória pode ser armazenada, essa divisão também é distinguida por seus mecanismos. Enquanto a memória de curta duração ocorre através de modificações pós-traducionais transientes, a memória de longa duração ocorre através da transcrição de determinados genes e da síntese proteica, além de depender de modificações estruturais na sinapse (Lynch, 2004).

Traçando-se um paralelo molecular para a memória, temos os processos de plasticidade sináptica. Esses processos atuam fortalecendo, como no caso da LTP, ou enfraquecendo, como na depressão de longa duração (LTD), a resposta sináptica e, dessa forma, contribuem para o armazenamento ou extinção de memória, respectivamente.

A LTP é, ainda, dividida em duas fases: a *early phase* LTP (E-LTP) e a *late phase* LTP (L-LTP). A E-LTP se assemelha à memória de curta duração, dura algumas horas e ocorre de maneira independente de síntese proteica, enquanto a L-LTP pode durar até dias e é dependente da tradução (Lynch, 2004; Citri e Malenka, 2008).

Os eventos celulares chave para a plasticidade sináptica associada à LTP são decorrentes do influxo de cálcio em neurônios pós-sinápticos. A forma mais clássica ocorre através da abertura de receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), um canal transmembranar ativado por glutamato. Sua ativação, após entrada de cálcio, ativa proteínas quinases como *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α* (CaMKII α), proteína quinase A (PKA), dentre outras, pelo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). A PKA, em sequência, entra no núcleo e fosforila *cAMP-response-element-binding protein* (CREB), ativando-o, o que leva a transcrição de diversos genes envolvidos na plasticidade neuronal (Waltereit e Weller, 2003). Por exemplo, ativação de CREB induz aumento no número e tamanho de espinhas dendríticas, assim como de receptores na membrana, modulando a resposta sináptica (Lynch, 2004).

Na DA, sabe-se que os A β Os causam inibição de LTP hipocampal, *in vitro* e *in vivo* (Selkoe, 2008). Além disso, os receptores de glutamato parecem exercer um papel central na ligação de A β Os em neurônios (Liu *et al.*, 2010; Renner *et al.*, 2010; Zhao, *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que os A β Os interagem com e ativam NMDAR (Téxido *et al.*, 2011). O silenciamento desse receptor diminui a ligação de A β Os em dendritos de neurônios hipocampais e seu nocaute anula o

estresse oxidativo causado pelos A β Os, que é mediado pela ativação aberrante de NMDAR (Decker *et al.*, 2010).

1.5. UPS na plasticidade sináptica e na memória

A atividade neuronal é um processo dependente tanto de síntese quanto de degradação proteica. Atualmente, sabe-se que a proteólise desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso e nos processos de plasticidade sináptica e memória (Bingol e Sheng, 2011).

Uma forma de regulação da resposta sináptica é através da exocitose e endocitose de receptores de glutamato (GluR) (Luscher *et al.*, 1999; Ehlers *et al.*, 2000), sendo o proteassoma necessário para sua internalização (Burbea *et al.*, 2002).

A atividade do proteassoma atua, inclusive, na modulação da LTP. A inibição do UPS induz aumento da E-LTP, ao passo que suprime a L-LTP, etapa dependente de síntese proteica (Dong *et al.*, 2008). O UPS atua também em outra forma de plasticidade, similar à LTP em *Aplysia*, a facilitação de longa duração (LTF). A LTF também depende da ativação da PKA que, por sua vez, é mediada pela degradação de sua subunidade regulatória pelo proteassoma. Quando PKA ativa CREB, este realiza a transcrição, dentre outros genes, de Ap-Uch (UCH-L1 em *Aplysia*). Sem Ap-Uch funcional, a LTF é comprometida (Hedge *et al.*, 1997). Dessa forma, o UPS controla a degradação e a síntese proteica, regulando o fortalecimento das sinapses.

Corroborando esse trabalho, outros posteriores demonstraram que a LTP é prejudicada no hipocampo de ratos após injeção de lactacistina (Fonseca *et al.*, 2006; Karpova *et al.*, 2006); e que o proteassoma é necessário para a formação de novas espinhas dendríticas (Hamilton *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a localização do proteassoma parece desempenhar uma importante função. Após estímulo por atividade neuronal, ele é transportado da árvore dendrítica para as espinhas dendríticas, onde participa do remodelamento estrutural necessário para a plasticidade sináptica e memória (Bingol *et al.*, 2006; Tai e Schuman, 2008). Esse estímulo parece induzir aumento na atividade do proteassoma pela fosforilação da proteína Rpt6 da subunidade 19S e levar ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas (Ehlers, 2003; Djakovic *et al.*, 2009). Tanto o transporte do proteassoma para a sinapse quanto a fosforilação de Rpt6 parecem ser dependentes de CamKII α (Bingol *et al.*, 2006; Bingol *et al.*, 2010).

Já foi comprovado também o papel do UPS na consolidação da memória, onde um aumento de ubiquitinação e da atividade do proteassoma é visto no hipocampo de ratos após treino em teste de esquivas inibitórias. Ainda, a inibição do proteassoma com injeção de lactacistina no hipocampo desses animais causou amnésia retrógrada total quando foram submetidos à tarefa comportamental, após o treino (Lopez-Salon *et al.*, 2001).

Acredita-se atualmente que a perda de memória e sináptica características da DA (Ingelsson *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2005) são decorrentes dos A β Os (Selkoe, 2002). Essa perda pode ocorrer devido a alterações na regulação da tradução, possivelmente em consequência de alterações na degradação proteossomal. De fato, já foi demonstrado que a inibição do proteassoma causa redução da tradução global e de proteínas sinápticas em cultura de neurônios (Ding *et al.*, 2006; Bajic *et al.*, 2012). Também parece ocorrer redução da tradução global na DA, que parece estar relacionado, ao menos em parte, com a disfunção sináptica e, conseqüentemente, de memória (Ma *et al.*, 2013).

1.6. Tradução de proteínas

Para a síntese proteica, é necessário que ocorram os processos de transcrição e tradução. Na transcrição, o DNA serve de molde para a síntese de RNA, que ocorre no núcleo da célula. A fita de RNA então migra para o citoplasma, onde será traduzida. O RNA mensageiro (mRNA) contém o código para produção da cadeia polipeptídica, organizado em códons, e cada aminoácido é adicionado à fita com auxílio de um RNA transportador (tRNA), baseado na sequência desses códons. A tradução ocorre em complexos ribossomais através de três etapas: iniciação, alongamento e terminação.

A etapa de iniciação é a principal para o controle da tradução. Essa etapa se inicia quando o fator de iniciação eucariótico (eIF) 2 liga-se ao tRNA complexado a metionina. Com essa ligação, o complexo ternário se associa a subunidade menor do ribossomo (40S) e a outros fatores de iniciação (eIF1, eIF1A e eIF3), formando, então, o complexo de pré-iniciação 43S (Fig. 4A) (Buffington *et al.*, 2014).

Em seguida, o complexo 43S se liga ao mRNA, através de eIF3, *poly(A)-binding protein* (PABP) e eIF4F. O eIF4F é um complexo formado por eIF4E, eIF4A e eIF4G. A proteína adaptadora eIF4G se liga a PABP, levando à circularização do mRNA (Jackson *et al.*, 2010).

Assim, o complexo 43S percorre a fita de mRNA em busca do códon de iniciação AUG para formação do complexo de pré-iniciação 48S. Para seu reconhecimento, o códon AUG tem suas bases pareadas com o anti-códon do tRNA, no sítio P do ribossomo 40S. Esse processo leva à hidrólise de GTP do eIF2 pela GTPase eIF5B, fazendo com que eIF2-GDP perca a afinidade e se dissocie do ribossomo, junto com eIF1, eIF1A e eIF3 (Fig. 4B). Após essa dissociação, as subunidades 40S e 60S se associam, com auxílio de eIF5B, para formar o complexo 80S ribossomal.

A etapa seguinte, de alongamento, requer fatores de alongamento eucarióticos (eEF) da tradução para prolongar a fita polipeptídica. Os fatores eEF1A e eEF1B são recrutados para a transferência de aminoacil-tRNAs para o ribossomo.

Por fim, quando o ribossomo alcança o códon de terminação, os fatores de alongamento se soltam e a fita recém-sintetizada é liberada do mRNA e do ribossomo através de códons de terminação (Fig. 4C) (Buffington *et al.*, 2014).

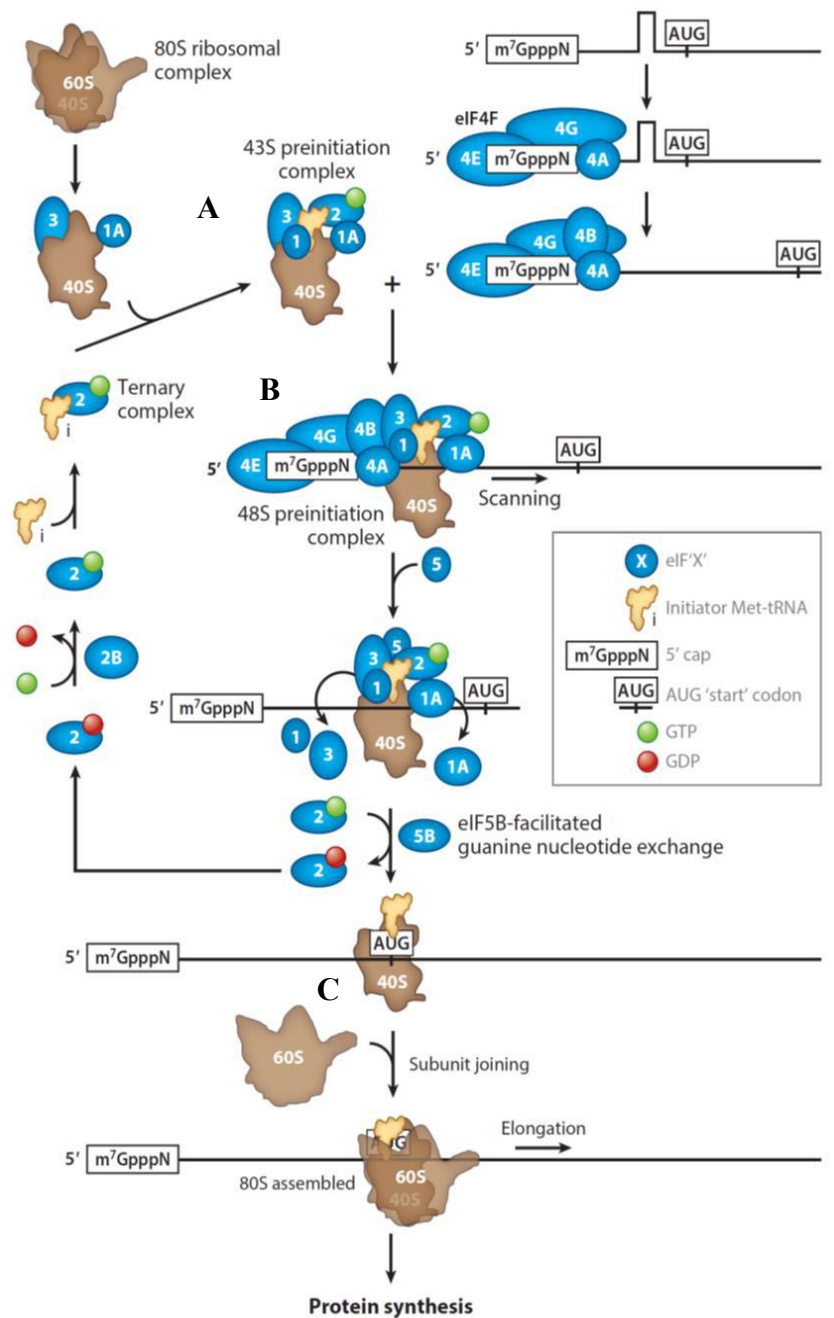


Figura 4. Etapas da tradução. (A) A tradução de proteínas se inicia com a formação do complexo 43S a partir da ligação do complexo ternário com a subunidade 40S ribossomal. (B) O complexo 43S então se liga ao mRNA e o percorre, reconhecendo o códon de iniciação. (C) A subunidade 60S se une à 40S formando o complexo 80S ribossomal para começar a etapa de alongamento da fita polipeptídica. Quando o códon de terminação é encontrado, os fatores de alongamento se soltam e a fita recém-sintetizada é liberada através de fatores de terminação (Buffington *et al.*, 2014).

1.7. Mecanismos de regulação da tradução

A regulação da tradução ocorre através de todas as etapas. Durante a etapa de iniciação, pode se dar pela fosforilação da subunidade α do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 α) e pela ligação da proteína *Fragile-X mental retardation protein* (FMRP) em mRNAs específicos. Após essa ligação, FMRP recruta a proteína *cytoplasmic FMRP-interacting protein 1* (CYFIP1), que se associa a eIF4E e impede a montagem ribossomal (Fig. 5A).

A FMRP também é capaz de impedir a tradução na etapa de alongamento, ligando-se a região codificante do mRNA alvo (Fig. 5B). Essa proteína pode, ainda, se ligar em regiões de mRNAs alvo e recrutar componentes do *RNA-induced silencing complex* (RISC) ou microRNAs complementares para inibir a tradução (Santoro *et al.*, 2012). O complexo RISC também é capaz de inibir a tradução nas etapas de iniciação e alongamento (Carthew e Sontheimer, 2009) (Fig. 5C). Sua degradação, através do UPS, permite que ocorra um aumento de mRNAs prontos para tradução na sinapse seguida de estímulo neuronal (Banerjee *et al.*, 2009).

O mesmo ocorre para FMRP, que também é alvo do proteassoma (Hou *et al.*, 2006). Após estímulo neuronal na sinapse, seus níveis diminuem, enquanto os níveis e a atividade do proteassoma aumentam (Bingol e Schuman, 2006; Djakovic *et al.*, 2009; Bingol *et al.*, 2010), indicando a promoção da síntese proteica a partir de sua degradação. Sendo assim, essa proteína é atualmente considerada um dos principais reguladores da tradução mediada por atividade neuronal (Jr *et al.*, 2012).

Da mesma forma, existem outros repressores traducionais (ou moduladores negativos da tradução) importantes para regulação da síntese de proteínas relacionadas com a plasticidade sináptica e memória. O proteassoma, por sua vez, atua na regulação dos níveis desses repressores em neurônios (Dong *et al.*, 2014).

O proteassoma parece ter um papel em limitar a E-LTP e induzir a manutenção do L-LTP. A limitação da E-LTP parece ser pela degradação de eIF4E e eIF1A, ao passo que a manutenção da L-LTP parece ser pela degradação dos repressores traducionais *polyadenylate-binding protein interacting protein 2* (Paip2) e *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein* (4E-BP) (Dong *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2014).

As 4E-BPs inibem a tradução pela ligação constitutiva ao fator eIF4E. Somente através da ativação de mTOR que ocorre a dissociação desse repressor, permitindo a síntese proteica (Hoeffler e Klann, 2010).

Após a indução da LTP, outro repressor, *activating transcription factor 4* (ATF4), também sofre degradação proteossomal. Após sua degradação, torna-se possível a ativação de CREB e de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), um fator neurotrófico envolvido na expressão de LTP (Dong *et al.*, 2008).

Levando esses dados em consideração, é possível supormos que a inibição do proteossoma mediada pelos A β O resulta no acúmulo de repressores traducionais, tais como FMRP, 4E-BPs e ATF4. O acúmulo desses repressores impedindo a tradução pode ser, conseqüentemente, uma importante causa da redução seletiva dos níveis de proteínas sinápticas na DA.

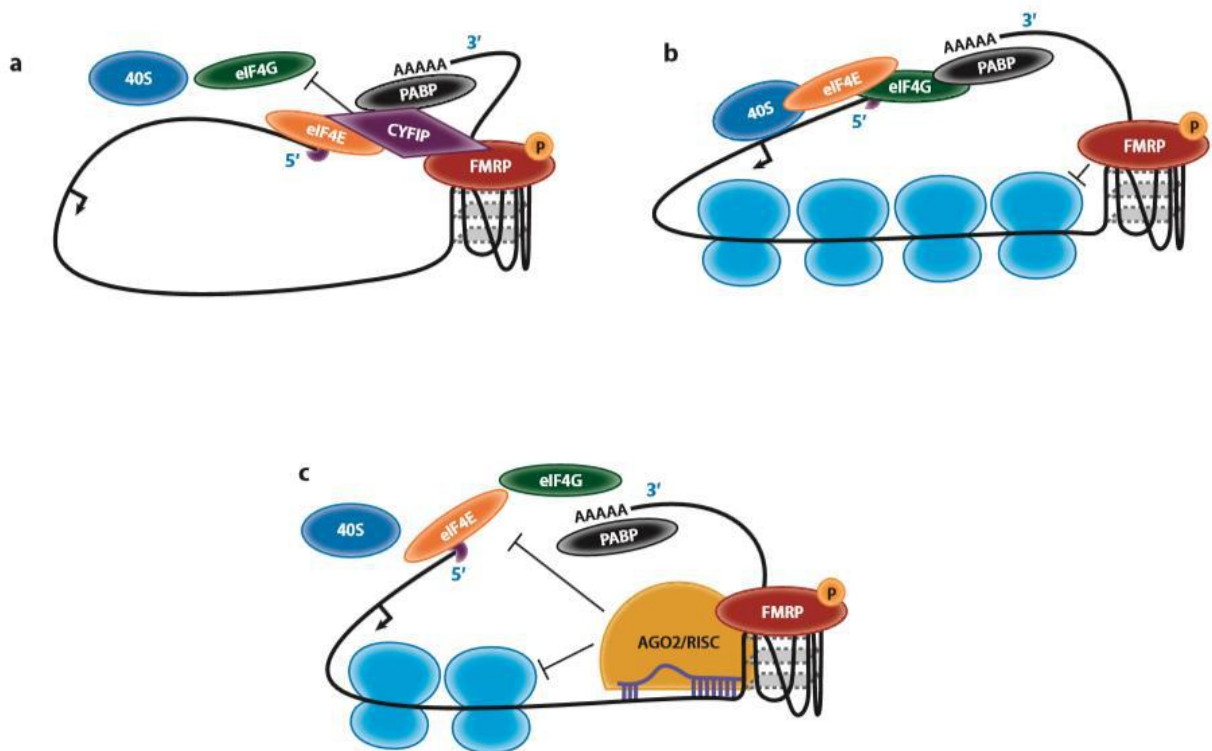


Figura 5. Mecanismos de repressão da tradução por FMRP. (A) FMRP recruta CYFIP1 para bloquear a formação do complexo eIF4F e impedir o início da tradução. (B) FMRP causa a desmontagem do complexo ribossomal durante a fase de alongamento. (C) FMRP recruta RISC para inibir a tradução na etapa de iniciação e alongamento (Adaptado de Santoro *et al.*, 2012).

1.8. FMRP e a via de mTOR

Quando em sua forma fosforilada, a FMRP inibe a síntese de proteínas sinápticas, como a PSD-95. A ativação dessa proteína repressora está acoplada à estimulação sináptica através de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) do tipo 1 e 5, por exemplo. Quando este estímulo ocorre, induz defosforilação de FMRP e ativação da tradução (Muddashetty *et al.*, 2011). Quando defosforilada, a FMRP é induzida à degradação por Cdh1-APC, uma E3 ubiquitina-ligase (Huang *et al.*, 2015).

O estímulo de mGluR é um dos mecanismos de indução de LTD e requer uma cascata de sinalização que culmina na internalização de receptores AMPA. A ativação tanto da via de ERK como de mTOR são necessárias para função normal da LTD. Portanto, como FMRP é um passo importante na mediação de mGluR-LTD, é possível supor que seja regulado por ambas as vias.

Além disso, estudos recentes indicam que a via de mTOR também é regulada negativamente por FMRP. Dessa forma, mTOR encontra-se *downstream* e *upstream* à FMRP. Já foi visto, por exemplo, que animais nocaute para *Fmr1*, gene que codifica FMRP, apresentam sinalização exagerada de mTOR. Esses animais apresentam também um aumento dos níveis de quinases de mTOR, aumento da fosforilação dos alvos de mTOR, como S6 quinase (S6K) e 4E-BP, e aumento dos níveis do complexo eIF4F (Sharma *et al.* 2010).

Em condições normais, o complexo 1 de mTOR (mTORC1), quando ativado, fosforila 4E-BP e impede que esse repressor se ligue e sequestre eIF4E. Essa fosforilação permite, então, que eIF4E se ligue ao complexo eIF4F e inicie a tradução. Por outro lado, a fosforilação de S6K em Thr389 a ativa, e essa proteína, por sua vez, age em diversos substratos, como a proteína ribossomal S6, fatores de transcrição e outras proteínas envolvidas na iniciação e alongamento da tradução (Fig. 6) (Sengupta *et al.*, 2010).

A mTOR é ativada por *phosphatidyl inositol 3 kinase* (PI3K) e Akt e apresenta um papel fundamental na sobrevivência, proliferação celular e na autofagia (Hay e Sonenberg, 2004). Outra via também importante para essas funções é a via de ERK1/2, que, como mTOR, fosforila S6K, mas em Thr421/Ser424 (Dufner e Thomas, 1999).

Em neurônios, mTOR está presente na sinapse, onde modula a tradução local de proteínas, e é essencial para diferentes formas de plasticidade sináptica, incluindo a LTP (Tang *et al.*, 2002; Cammalleri *et al.*, 2003).

Está claro na literatura que, na DA, a via de mTOR encontra-se alterada. No entanto, se a via está aumentada ou diminuída ainda está em discussão. Muitos grupos têm visto um aumento em diferentes modelos de DA (Oddo, 2012; Tramutola *et al.*, 2015), porém também existem trabalhos relatando uma diminuição (Lafay-Chebassier *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2010).

Caccamo e cols., por exemplo, mostraram que a fosforilação de mTOR e S6K está aumentada em células 7PA2, um modelo para DA, e no córtex e hipocampo de camundongos transgênicos. Eles, assim como outro grupo, também demonstraram que a inibição de mTOR, com rapamicina, leva à diminuição dos níveis de A β ₁₋₄₂ e recupera a perda de memória nos camundongos transgênicos (Caccamo *et al.*, 2010; Spilman *et al.*, 2010). Como mTOR suprime a autofagia, esses trabalhos propõem que a inibição dessa via e, portanto, indução da autofagia, facilita o *clearance* dos agregados de A β .

Por outro lado, dos trabalhos que vêem diminuição dessa via, já foi vista diminuição de mTOR e S6K fosforilada em células de neuroblastoma, após administração de A β ₁₋₄₂, no córtex de camundongos transgênicos e linfócitos de pacientes com DA (Lafay-Chebassier *et al.*, 2005). A fosforilação de S6K e 4E-BP também já foi vista em outros modelos, como em *slices* hipocâmpais e cultura de neurônios de camundongos transgênicos para modelo de DA, e *slices* hipocâmpais tratados com A β ₁₋₄₂ (Ma *et al.*, 2010). Nesse caso, essa diminuição poderia ser explicada como causa ou consequência de redução do controle traducional.

Recentemente, foi publicado um trabalho mostrando que a ativação de mTORC1 aumenta a degradação proteica dependente do UPS e promove a transcrição de genes do proteossoma através de NRF1 (Zhang *et al.*, 2014). Dessa maneira, é possível traçar uma conexão entre a via de mTOR e a disfunção proteossomal na DA. Pode ser que esse seja um dos mecanismos que levam à inibição do UPS na doença. Talvez ocorram alterações nessa via na DA que fazem com que mTOR deixe de ativar o proteossoma, diminuindo o *clearance* de A β . Contudo, essa abordagem ainda é recente e mais estudos precisam ser feitos para elucidar esse mecanismo.

Nesse trabalho, pretendemos investigar de que maneira os A β Os afetam a degradação proteossomal e a regulação da tradução, analisando FMRP e a via de mTOR. Acreditamos que a alteração desses dois eventos está relacionada na DA, onde uma inibição do UPS pelos A β Os estaria levando à desregulação da tradução e, por fim, à diminuição da síntese de proteínas sinápticas.

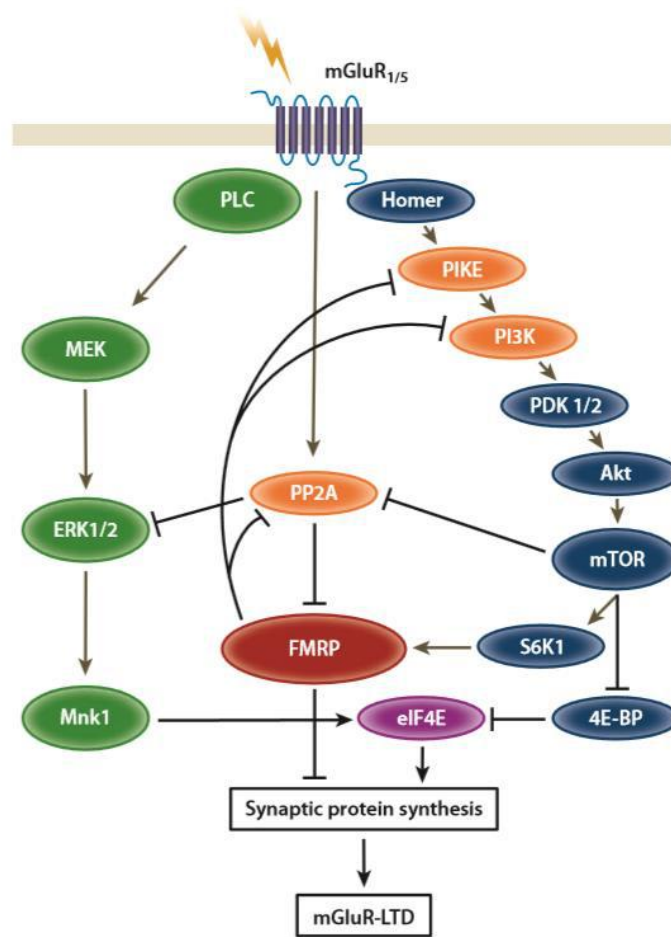


Figura 6. Sinalização de mGluR através das vias de ERK e mTOR. Interações entre FMRP e as vias de ERK e mTOR, mostrando a cascata de sinalização ativada pela indução da LTD (Santoro *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Devido às evidências que apontam para o envolvimento do UPS na patogênese da DA, torna-se de grande importância o estudo das alterações e dos mecanismos envolvidos na disfunção do proteossoma mediada pelos agregados tóxicos de A β .

Além disso, considerando-se a perda sináptica na DA e a importância da regulação dos níveis proteicos em neurônios, também é fundamental estudarmos as alterações na regulação traducional em função dos A β Os e da inibição proteassomal. Dessa forma, é possível fornecermos evidências dos mecanismos pelos quais os A β Os atuam na redução da síntese proteica, em especial de proteínas sinápticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a relação da inibição do proteossoma com a regulação da tradução de proteínas no contexto da DA.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar possíveis alterações nos níveis do proteossoma causadas pelos A β Os, em cultura de neurônios hipocámpais e camundongos injetados i.c.v.;
- Avaliar se a inibição do proteossoma leva a um acúmulo de repressores da síntese de proteínas, como FMRP e ATF4, também nos modelos de cultura neuronal e em camundongos injetados com A β OS;
- Investigar se os A β Os induzem alterações em vias de sinalização relacionadas com a regulação da tradução, como nas vias de ERK e mTOR;
- Avaliar se as alterações na síntese de proteína são mediadas pela disfunção no proteossoma.

4. METODOLOGIA

4.1. Considerações éticas

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos machos *Swiss*, com cerca de 3 meses de idade, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL-FIOCRUZ). Os procedimentos realizados têm a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFRJ (nº 137/15). Os animais foram acomodados em grupos de cinco por caixa com fornecimento de água filtrada e ração *ad libitum*. O ciclo claro/escuro foi de 12 h e a temperatura mantida em 22°C.

4.2. Preparação e caracterização de A β Os

A preparação e caracterização dos A β Os foram realizadas conforme descrito em Lambert e colaboradores, 2001. O peptídeo comercial A β ₁₋₄₂ humano (American Peptide, CA, USA) foi solubilizado à concentração de 1mM de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Merck, NJ, USA) gelado e a solução límpida resultante incubada à temperatura ambiente por 60 min. Em seguida, a solução foi deixada em gelo por 10 min, e então alíquotada em microtubos, em fluxo laminar, que foram mantidos abertos durante 12 horas para evaporação do HFIP. As alíquotas foram estocadas a -20°C para utilização posterior.

A partir do estoque, A β Os foram ressuspensos em dimetilsulfóxido anidro (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) para obtenção de uma solução 5mM, que foi diluída em 100 μ M de PBS estéril e incubada por 24 horas, a 4°C. Para o controle (veículo), foi utilizada uma amostra de DMSO 2% em PBS, incubada nas mesmas condições. Em seguida, as preparações foram centrifugadas a 14000g por 10 min, a 4°C, a fim de se remover os agregados insolúveis de A β . Os A β Os contidos no sobrenadante foram mantidos a 4°C até sua utilização, não excedendo o período máximo de 48 horas.

As preparações foram analisadas rotineiramente por cromatografia de gel filtração para caracterização das espécies oligoméricas, onde é usualmente visto um pico de oligômeros de alto peso molecular e um pico de baixo peso molecular, confirmado por *Western blot* (Fig. 7). As análises foram feitas através de cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*, HPLC) com detecção simultânea de absorção a 280nm e fluorescência com excitação a 275nm e emissão a 305nm; utiliza-se uma coluna de sílica GPC 100 com limite

de exclusão de proteínas na faixa de 3000 a 300000 kDa; fase móvel usada de PBS pH 7 e filtrada com membrana de nitrocelulose *Millipore* (Millipore, MA).

A coluna foi equilibrada com a fase móvel com fluxo de 0,5 ml/min por 1 h. Em seguida, foram injetados 50µl de veículo com o mesmo fluxo e tempo de corrida de 15 min. Por fim, a coluna foi reequilibrada com a fase móvel e foram injetados 50µl de AβOs, com o mesmo tempo de corrida.

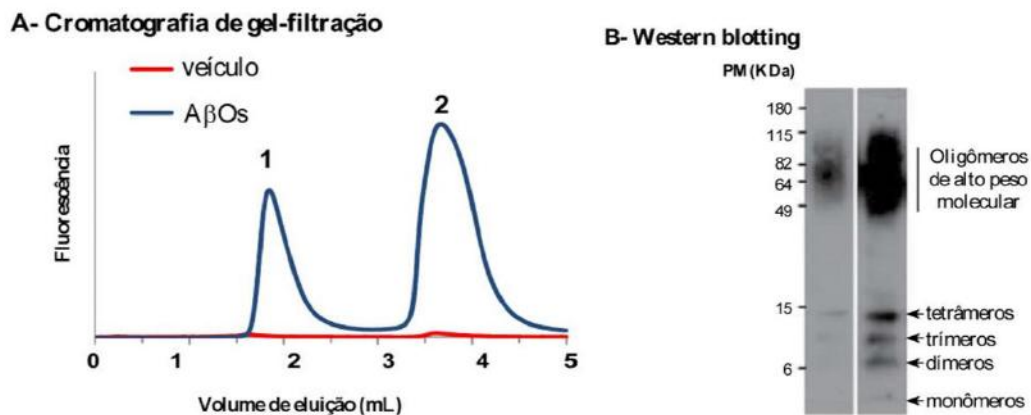


Figura 7. Caracterização dos AβOs. (A) Cromatografia por exclusão de tamanho mostrando os picos de eluição dos AβOs, pico 1=150 kDa e pico 2=10 kDa. (B) *Western blot* para marcação com anticorpo específico para AβOs (Lambert *et al.*, 2001) mostrando a presença de dímeros, trímeros, tetrameros e oligômeros de alto peso molecular (~50-10 kDa). O painel à esquerda mostra um filme menos exposto para melhor visualização dos oligômeros de alto peso. O painel à direita mostra o mesmo filme superexposto para melhor detecção dos oligômeros de baixo peso molecular (imagem fornecida por Sofia Jürgensen).

4.3. Injeção i.c.v. de AβOs em camundongos

Os camundongos foram anestesiados por inalação de Isoflurano (2,5%, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda.), através de um sistema de vaporização com fluxo controlado (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA), e submetidos a uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) *freehand* de AβOs (10 pmol/camundongo) ou veículo, diluídos em PBS estéril, em um volume final de 3µl (seringa *Hamilton*, ligada a uma agulha de 2,5mm de comprimento por um capilar). A injeção foi feita na altura de 1mm à esquerda da linha média traçada e 1mm posterior à linha horizontal. Em seguida, o camundongo foi colocado de volta em sua caixa.

4.4. Preparação enriquecida em sinaptossomas

Os camundongos injetados foram eutanasiados – através de asfixia por CO₂ seguida de deslocamento cervical – para dissecação do hipocampo, que, em seguida, foi homogeneizado em solução gelada de tampão Tris/sacarose (0,32M sacarose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10mM Tris-HCl, pH 7,4) com auxílio de um *potter* (Wheaton, Millville, NJ). As amostras foram avolumadas para 10ml e centrifugadas por 3 min a 4°C a 1330g, no rotor R20A2 na centrífuga Himac CR22GII (Hitachi). O sobrenadante foi em seguida transferido para outro tubo *falcon*.

No tubo contendo o *pellet*, foram acrescentados 10ml de solução tampão e o *pellet* foi homogeneizado com o *potter*. A solução foi mais uma vez centrifugada, como na condição anterior, e o sobrenadante transferido para o mesmo tubo do sobrenadante da primeira centrifugação.

Os tubos contendo os sobrenadantes foram então centrifugados por 10 min a 21200g a 4°C, o sobrenadante proveniente descartado e o *pellet* ressuspendido em 3ml de solução tampão manitol/sacarose com 15% de Percoll (225mM de manitol, 75mM de sacarose, 1mM de EGTA, 0,1% de BSA, 15% Percoll, 10mM de HEPES, pH 7,2).

Em um tubo de centrífuga, foi montado o gradiente de sacarose, pipetando-se 3ml de solução manitol/sacarose com 40% de Percoll, seguida da mesma solução com 23% de Percoll. A amostra diluída em 15% de Percoll foi, então, adicionada ao gradiente e centrifugada por 5 min a 30700g com aceleração 6 e desaceleração 4 a 4°C.

Com uma pipeta, a camada de sinaptossoma (a camada do meio, dentre 3 camadas) foi transferida para outro tubo, avolumada com 10ml de tampão Tris/sacarose para a limpeza do Percoll e centrifugada por 10 min a 17000g a 4°C com aceleração 9 e desaceleração 7. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* avolumado para 15 ml com tampão manitol (0,32M de manitol, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 0,2 mg/ml de BSA sem ácidos graxos e 10mM de Tris-HCl, pH 7,4) e a amostra centrifugada a 6900g por 10 min a 4°C com aceleração 9 e desaceleração 7 (adaptado de Dunkley *et al.*, 2008). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 150µl de tampão RIPA (25mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 1% triton) + coquetéis de inibidores de protease e de fosfatase (Pierce – Thermo scientific, Rockford, IL).

4.5. Preparo, cultivo e tratamento de culturas primárias de neurônios hipocampais

O hipocampo de embriões de ratas Wistar de 18 dias de gestação foi utilizado para preparação das culturas. A rata foi eutanasiada, através de asfixia por CO₂ seguida de deslocamento cervical, e os embriões removidos e colocados em placa de Petri com solução de PBS-glicose 2% estéril. A dissecação dos hipocampos foi realizada com auxílio de lupa e instrumentos cirúrgicos, dentro do fluxo laminar, e esses transferidos para um tubo *falcon*, junto com 2ml de PBS-glicose 2%. No tubo, foram adicionados 300µl de solução de tripsina 0,25% + EDTA 0,02% por 5 min. O meio foi então retirado e foram acrescentados 5ml de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 10% de soro fetal de cavalo, 2mM de glutamina, 500 µg/mL de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/mL de fungizona (Gibco, Grand Island, NY). Os hipocampos foram dissociados através de homogeneização com pipeta.

A solução foi transferida para outro tubo *falcon* e foi feita a contagem de células através da câmara de Neubauer. Para imunocitoquímica, foram plaqueadas 50000 células/ml em placas de 24 poços contendo lamínulas previamente tratadas com ácido nítrico e, para *Western blot*, foram plaqueadas 500000 células/ml em placas de 6 poços. As placas foram previamente tratadas com poli-L-lisina por 24 horas a 10 e 1 µg/ml, respectivamente. Após 1 hora, o meio de cultura foi substituído por Neurobasal, com 2% de B27, 2mM de glutamina, 500 µg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona. As culturas foram então mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 18 a 21 dias *in vitro* (DIV).

Após 18 DIV, as culturas foram tratadas com 500nM de AβO, 500nM de lactacistina, 500nM de AβO+500nM de lactacistina ou um volume equivalente de veículo (2% de Me₂SO em PBS) por 3 ou 24 h. Para imunocitoquímica, os neurônios foram fixados com paraformaldeído 4%; para *Western blot*, foram raspados com *cell scrapper* em tampão RIPA + inibidores; e, para PCR, foram homogeneizados com tampão de lise do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) para extração de RNA.

4.6. Ensaio de *Live/Dead*

Os poços de placa de 96 foram homogeneizados e avolumados para 100ul de meio Neurobasal acrescidos de lactacistina 100nM, 500nM ou 5µM, em duplicata. Cada duplicata foi tratada por 3, 6 ou 24 horas, a fim de se traçar uma curva dose-temporal. 40 min antes da captura de imagens, os poços foram tratados com 2µM de calceína (indicador de célula íntegra) e 1µM de brometo de

etédeo (indicador de célula morta) (*Viability/Cytotoxicity Kit* - Invitrogen). Para controle negativo, um poço não recebeu tratamento e, para controle positivo, um poço foi tratado com metanol 70% 10 minutos antes da adição das sondas. Para fotografar, foi utilizado o microscópio Nikon no aumento de 20 e foram capturadas 3 imagens por poço, em campo claro e nas frequências 488 (calceína) e 594 (etédeo). Para análise, foi utilizado o programa ImageJ (NIH, Bethesda, USA) para quantificar intensidade de fluorescência (calceína) e análise de partículas (etédeo).

4.7. Imunocitoquímica

Após fixação com paraformaldeído 4% com sacarose 4% por 10 min, as lamínulas foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 por 5 min, sendo lavadas com PBS novamente. O bloqueio foi realizado com 10% de soro de cabra (NGS) em PBS por 1 hora, o anticorpo primário foi diluído em 1% NGS em PBS e as lamínulas incubadas por 18 h a 4°C. O anticorpo primário utilizado foi anti-Rpt6 (1:200, Enzo Life Sciences).

Dado o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor (Invitrogen) por 2 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Novamente, as lamínulas foram lavadas e então montadas em lâminas com Prolong Gold com DAPI (Invitrogen).

As imagens das células foram capturadas com microscópio Zeiss LSM510 META com o módulo Apotome e foi traçado um limiar de intensidade no ImageJ (NIH, Bethesda, USA) para eliminar os sinais de fundo, analisando-se a densidade integrada de fluorescência das imagens.

4.8. Dosagem de proteínas totais e *Western blot*

A amostra obtida a partir de sinaptossoma ou cultura de células foi homogeneizada com tampão RIPA (25mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40 [Invitrogen], 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 5mM EDTA, 1% Triton X-100) e coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Pierce-Thermo Scientific). A concentração de proteínas totais foi realizada com *kit* Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) e a leitura espectrofotométrica feita em um leitor de ELISA (SpectraMax M2 – Molecular Devices).

A partir da dosagem, as amostras foram preparadas com tampão de amostra diluído 5 vezes (2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 62,5mM Tris e azul de bromofenol) na concentração de 5 μ g/ μ l, fervidas por 5 min e corridas em gel de poliacrilamida 10% de 1,5mm

com tampão de corrida Tris/Glicina/SDS a 100V em sistema da Biorad. A transferência para uma membrana de nitrocelulose foi realizada a 100V por 90 min com tampão de transferência Tris/Glicina contendo 10% de metanol.

As membranas foram bloqueadas com Odyssey Blocking Buffer (Licor) ou BSA 5% diluídos em tampão Tween-Tris (TBS-T) e incubadas por 18 h a 4°C com anticorpo primário diluído na solução de bloqueio. Os anticorpos primários utilizados foram anti-FMRP (1:300, Abcam), anti-ATF4 (1:1000, Abcam), anti-phospho eIF4E (1:2000, Abcam), anti-eIF4E (1:2000, BD Biosciences), anti-phospho S6K1 (1:1000, Abcam), anti-S6K1 (1:1000, Origene), anti-proteasome 20S C2 (1:1000, Abcam), anti-phospho S6 (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho 4E-BP1 (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho mTOR (1:1000, Cell Signaling), anti-beta actina (1:10000, Abcam), anti-ciclofilina (1:2000, Abcam).

Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T, incubadas com anticorpo secundário fluorescente (1:50000) por 1 h à temperatura ambiente e lavadas novamente para a detecção em scanner de infravermelho (Licor). As imagens foram analisadas pelo programa Image J (NIH, Bethesda, USA).

4.9. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada através do *kit SV Total RNA Isolation System* (Promega). Em microtubos autoclavados, 175µl de tampão de lise do *kit* e β-mercaptoetanol foram adicionados à amostra e homogeneizados por inversão. Em seguida, 350µl de tampão de diluição do *kit* foram acrescentados e homogeneizados por inversão. A solução foi centrifugada a 12000g por 3 min e o lisado transferido para outro microtubo. 200µl de etanol foram acrescentados e homogeneizados com pipeta. O lisado foi, então, transferido para o *Spin Basket Assembly* contido no *kit* e centrifugado a 12000g por 1 min, à temperatura ambiente.

Após adição de 600µl de solução de lavagem contida no *kit*, a amostra foi centrifugada mais uma vez a 12000g por 1 minuto e o eluente foi descartado. Foram adicionados, então, 50µl da solução de DNase (tampão central amarelo, 0,09M MnCl₂ e DNase I, todos contidos no *kit*) ao *Spin Basket Assembly*, que foi incubado por 15 min. Em seguida, foram adicionados 200µl de solução de encerramento da DNase. A amostra foi mais uma vez centrifugada a 12000g por 1 min.

Foram adicionados à amostra mais 600µl de solução de lavagem e centrifugada a 12000g por 1 min. O cesto foi esvaziado e mais 250µl de solução de lavagem são adicionados, seguido de uma

centrifugação a 12000g por 2 min.

O conteúdo restante foi transferido para o tubo de eluição do *kit* e 10µl de água livre de nuclease foram adicionados. Uma última centrifugação foi realizada a 12000g por 1 min para eluir o RNA que, em seguida, foi armazenado em freezer -80°C.

Para determinação da concentração de RNA, utilizamos espectrofotômetro NanoDrop (Thermo, Waltham, MA), pela densidade ótica a 260nm. Para verificação da pureza e integridade do RNA, analisamos a razão entre a densidade ótica a 260 e 280nm.

A síntese de cDNA a partir do RNA obtido foi realizada através do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para tal, o *mix* é preparado de acordo com as especificações abaixo:

Tabela 1. Preparação do *mix* para síntese de cDNA

Componente	Volume/Reação (µL)
<i>10x RT Buffer</i>	2
<i>25x dNTP Mix (100 mM)</i>	0,8
<i>10x RT Random Primers</i>	2
<i>Multiscribe® Reverse Transcriptase</i>	1
Inibidor de RNase	1
H ₂ O livre de nucleases	3,2
Total por reação	10

Cada amostra de RNA foi diluída em água DEPC para concentração de 1 µg/µl e 10µl desse RNA foram adicionados a 10µl do *mix*, em *eppendorfs*, que foram então colocados em termociclador, com a seguinte reação:

Tabela 2. Etapas de reação para síntese de cDNA

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo (min)	10	120	5	∞

Ao final da reação, o cDNA sintetizado foi armazenado em *freezer* -20°C.

4.10. PCR em Tempo Real

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada em termociclador *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Em uma placa de 96 poços para PCR (*MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate [Applied Biosystems]*), a amostra de cDNA diluída dez vezes foi pipetada em triplicata (3µl por poço). O *mix* previamente preparado (7,5µl de *SYBR® Green Master Mix*, 0,75µl de *primer forward* e *reverse* e 3µl de água DEPC), foi adicionado às amostras (12µl por poço).

Primers para o gene da β -actina foi utilizado para normalização e um poço contendo o *mix* sem o cDNA foi utilizado como controle negativo.

A placa foi rapidamente centrifugada para sedimentar o líquido no fundo e colocada no termociclador, com a seguinte reação:

Tabela 3. Etapas da reação de qPCR

Etapa	Temperatura	Tempo (ciclos)
Aquecimento inicial	95°C	10 min (1x)
Desnaturação	95°C	15 min (40x)
Amplificação	60°C	1 min (40x)
Finalização	95°C	7 min (1x)

A fluorescência foi registrada durante toda a etapa de amplificação. Ao término das ciclagens, a curva de dissociação foi dada para estimar a especificidade da amplificação. Para quantificação, foi calculado o $\Delta\Delta C_t$ de cada uma das amostras.

4.11. Análises estatísticas

A partir da quantificação, os dados obtidos foram dispostos em planilhas do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA) e analisados quanto à normalidade. Em vista da análise e das condições experimentais, o melhor teste estatístico foi escolhido e aplicado. Foram consideradas significativas quando as diferenças apresentam valor de p menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. A β Os causam diminuição da subunidade proteassomal Rpt6 em prolongamentos sinápticos

Inicialmente, fomos analisar os níveis do proteassoma em animais injetados i.c.v. com A β Os ou em cultura de neurônios. Para isso, realizamos um *Western blot* para a subunidade C2 do proteassoma 20S com amostras de hipocampo de camundongos 24 horas (Fig. 8A) e 7 dias (Fig. 8B) depois da injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os; e com amostras de cultura primária de neurônios hipocampais expostas por 24 horas com 500nM de A β Os ou lactacistina, inibidor do proteassoma (Fig. 8C). Os resultados mostram que não há diferença nos níveis desta subunidade do proteassoma entre os grupos, em nenhum dos modelos utilizados.

Poderíamos não ter visto diferenças uma vez que, no *Western blot*, a marcação é feita em todo o hipocampo e/ou em todas as células. Decidimos avaliar, então, os níveis do proteassoma em prolongamentos sinápticos de neurônios expostos a A β Os. Para isso, realizamos uma imunocitoquímica para Rpt6, uma das subunidades regulatórias do proteassoma, em cultura primária de neurônios hipocampais. Como resultado, vimos uma diminuição de marcação nas sinapses de neurônios expostos a A β Os, em relação ao veículo (Fig. 8A-E).

As imagens foram obtidas com o corpo celular com exposição estourada para que fosse possível a quantificação dos prolongamentos. Dessa forma, não foi realizada a quantificação da marcação no corpo celular dos neurônios. Assim, não podemos concluir se os níveis de Rpt6 diminuem somente nas sinapses ou se o proteassoma migra para o corpo celular. Por causa do resultado do *Western blot in vitro*, é improvável que os níveis caiam em todo o neurônio.

Nossos resultados mostram a diminuição do proteassoma na sinapse neuronal, contudo ainda não foi possível concluir seus níveis no corpo celular e sua localização nos neurônios.

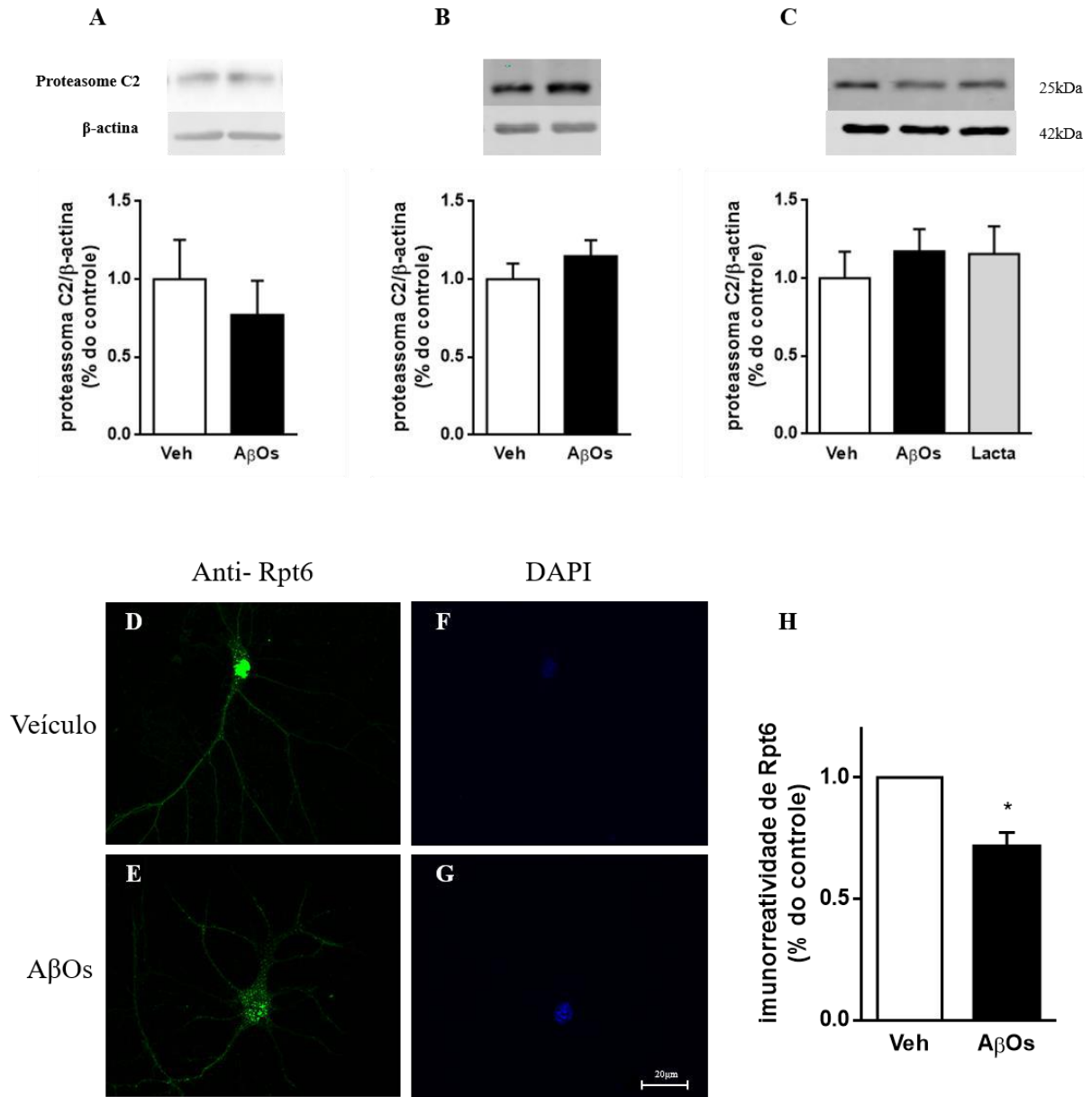


Figura 8. AβOs causam diminuição na marcação de Rpt6 em prolongamentos sinápticos. Nas imagens de cima, são mostradas bandas representativas e a quantificação do *Western blot* para proteassoma C2 em amostras de hipocampo 24 horas (A) e 7 dias (B) após injeção i.c.v. de 10pmol de AβOs e em amostras de cultura expostas a 500nM de AβOs ou lactacistina (C). Não há diferenças entre os níveis de proteassoma detectadas pelo *Western blot*. N=7, 10 e 3, respectivamente. Dados representados pela média ± erro médio. Abaixo, culturas primárias de neurônios hipocampais foram expostas por 24 horas a veículo (D e F) ou 500nM de AβOs (E e G). Em seguida, foi feita uma imunomarcagem para Rpt6 (em verde; painel à esquerda) e DAPI (em azul, para visualização do núcleo celular; painel à direita). (H) Quantificação da fluorescência de Rpt6. É vista uma diminuição da marcação de Rpt6 nas sinapses de culturas expostas aos AβOs. N=4 experimentos independentes, * indica $p < 0.05$ em teste t pareado. Veh=veículo; Lacta=lactacistina.

5.2. A concentração de lactacistina utilizada não causa morte em cultura de neurônios hipocampais

Em seguida, para testar se nosso tratamento de lactacistina não causa morte *in vitro*, traçamos uma curva dose-temporal em culturas primárias de neurônios hipocampais, em um ensaio Live/Dead. As culturas foram tratadas com três diferentes concentrações de lactacistina (100nM, 500nM e 5µM) por três diferentes intervalos de tempo (3, 6 e 24 horas). Posteriormente, foram tratadas com calceína e brometo de etídeo, indicadores de células íntegras (em verde) e células mortas (em vermelho), respectivamente. O controle negativo não recebeu lactacistina, enquanto o controle positivo recebeu tratamento com metanol 70% 15 minutos antes da captura das imagens. A partir da análise das imagens e da comparação com o controle positivo, observamos que o protocolo de tratamento utilizado (500nM por 24 horas) não é capaz de causar morte nas células (Fig. 9).

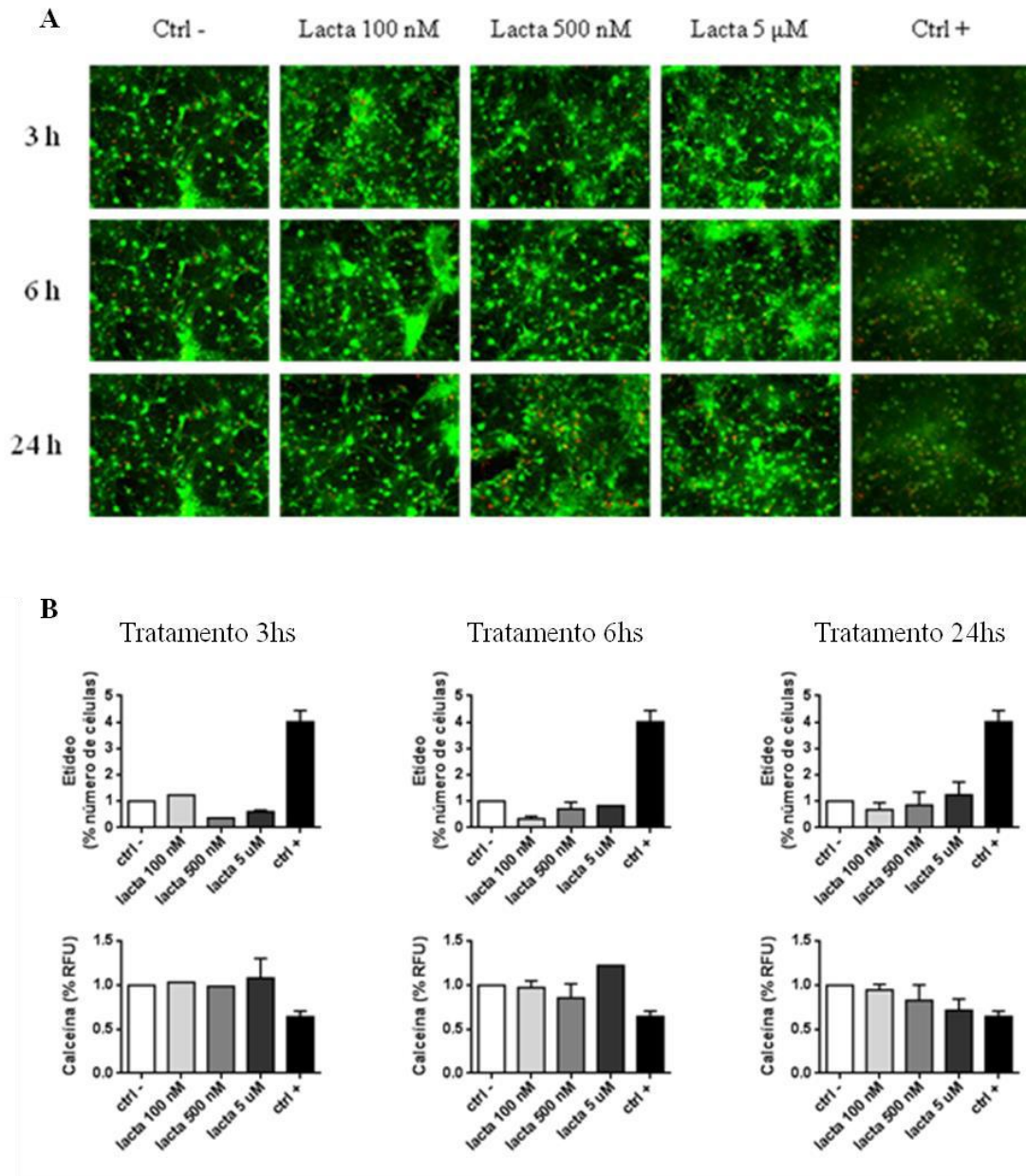


Figura 9. O tratamento de lactacistina utilizado não causa morte em cultura de neurônios hipocâmpais. Culturas primárias de neurônios hipocâmpais foram expostas por 3, 6 ou 24 horas a lactacistina, em diferentes concentrações (100nM, 500nM ou 5 μ M). O controle negativo (ctrl -) não recebeu tratamento e o controle positivo (ctrl +) foi exposto a metanol 70% 15 minutos antes da captura de imagens. Em (A), as imagens representativas de cada condição, mostrando marcação para calceína (em verde) e etídeo (em vermelho). As imagens foram capturadas no aumento de 20, com 3 imagens por poço. (B) Quantificação relativa às imagens. Concluímos que o protocolo utilizado (500nM por 24 horas) não causa morte neuronal. A quantificação de etídeo foi feita pelo número de células e de calceína por unidade arbitrária de fluorescência (RFU). As condições foram feitas em duplicata, N=1 ou 2 experimentos independentes. Dados representados pela média \pm erro médio. Lacta=lactacistina.

5.3. A β Os induzem aumento nos níveis e expressão de FMRP em cultura de neurônios hipocámpais e sinaptossomas isolados

Estudos recentes mostraram que a inibição do proteassoma leva ao acúmulo de repressores tradicionais, em estágios finais da L-LTP (Dong *et al.*, 2014). Sendo assim, sugerimos que a perda sináptica causada pelos A β Os seria, em parte, mediada pela inibição da atividade do proteassoma. Essa inibição causaria um acúmulo de repressores tradicionais que, por sua vez, levaria à diminuição da síntese de proteínas na célula.

Dentre os possíveis repressores que modulam a síntese de proteínas sinápticas, decidimos investigar FMRP. Essa proteína regula a tradução de diversos mRNAs dendríticos e é fundamental para função sináptica.

Para testar nossa hipótese, realizamos um *Western blot* para FMRP em amostras de cultura de neurônios expostos por 24 horas a 500nM de A β Os ou veículo, e sinaptossomas isolados do hipocampo de camundongos após 7 dias da injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os ou veículo. Em ambos os casos, A β Os causam uma tendência ao aumento dos níveis de FMRP, com valor de p inferior a 0,1 (Fig. 10A e C).

Por outro lado, para testar se a inibição do proteassoma também seria capaz de causar esse efeito, realizamos *Western blot* para FMRP em amostras de cultura expostas por 24 horas a 500nM de lactacistina, um inibidor farmacológico do proteassoma. Apesar de não haver diferença estatística (p=0.193), parece que a lactacistina também causa uma tendência ao aumento de FMRP (Fig. 11B). Esse resultado indica que o acúmulo de FMRP observado em culturas expostas a A β Os pode ser devido à inibição proteassomal.

A fim de avaliar também a expressão de *Fmr1*, gene que codifica FMRP, realizamos um PCR em Tempo Real com amostras de cultura. O resultado mostrou um aumento significativo na expressão de *Fmr1* nos neurônios expostos a A β Os (Fig. 10D).

Em conclusão, parece que os A β Os causam um aumento nos níveis e expressão de FMRP. Apesar da ausência de significância estatística, esse resultado nos permite sugerir o acúmulo de FMRP em decorrência da inibição do proteassoma mediada pelos A β Os. Contudo ainda são necessários experimentos que demonstrem uma causalidade, em vez de somente correlação.

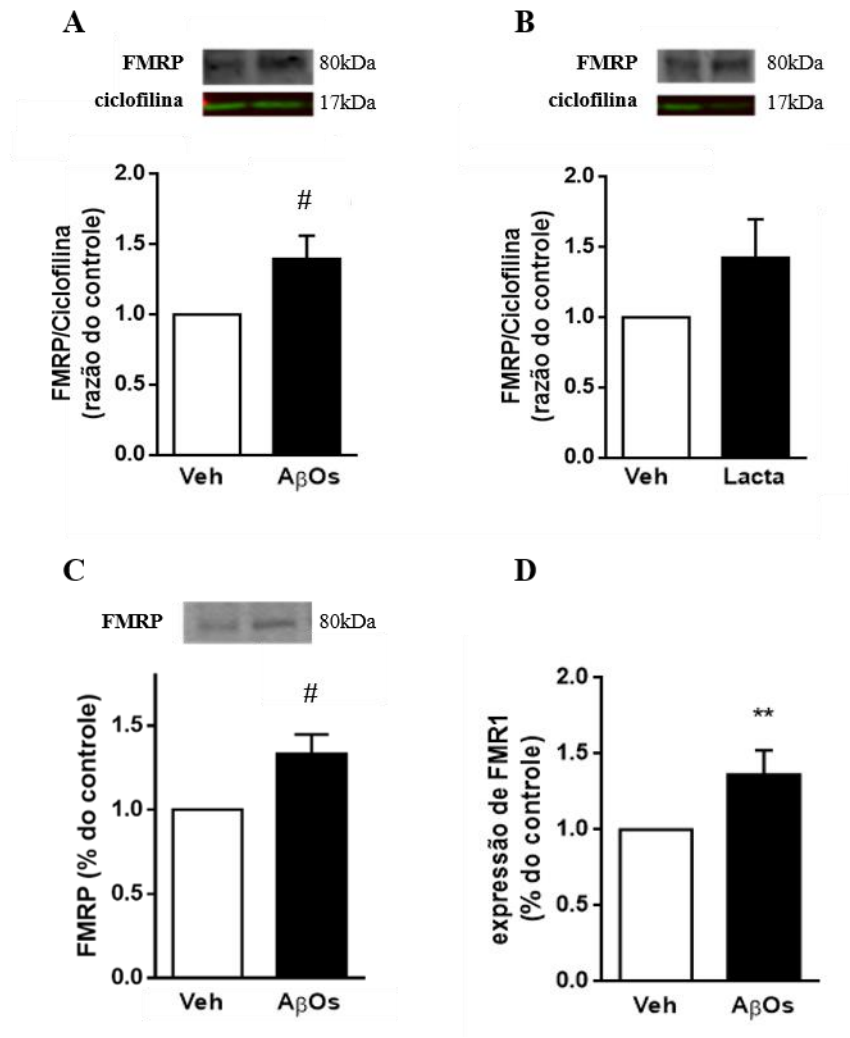


Figura 10. AβOs e lactacistina causam tendência ao aumento dos níveis e expressão de FMRP. (A-C) *Western blot* para FMRP com amostras provenientes de cultura de neurônios hipocâmpais expostas por 24 horas a veículo ou 500nM de AβOs (A) ou lactacistina (B). Em (C), com amostras provenientes de sinaptossomos isolados de hipocampo de camundongos 7 dias depois da injeção i.c.v. de veículo ou 10pmol de AβOs. É visto uma tendência ao aumento dos níveis de FMRP nas amostras tratadas com AβOs ou lactacistina. (D) PCR em Tempo Real de amostras de cultura de neurônios expostas a veículo ou 500nM de AβOs. O resultado mostra um aumento da expressão de *Fmr1*, gene que codifica FMRP, nos neurônios tratados com AβOs. A quantificação realizada foi referente ao controle. N=5 experimentos independentes, # indica $p < 0.1$, ** indica $p < 0.005$ em teste t. Dados representados pela média \pm erro médio. Veh=veículo, Lacta=lactacistina.

5.4. A β Os induzem tendência ao aumento nos níveis de ATF4 7 dias após injeção i.c.v.

Analisando outro repressor, realizamos um *Western blot* para ATF4 em amostras de hipocampo de camundongos 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os. Nesse caso, encontramos também uma tendência ao aumento em seus níveis ($p < 0.1$) (Fig. 11).

Realizamos o *Western blot* também com amostras de hipocampo 24 horas após injeção i.c.v. de A β Os. No entanto, precisamos repetir esse experimento pois o controle de carregamento utilizado pareceu muito disperso entre os grupos.

Pretendemos também repeti-lo com amostras de cultura primária de neurônios hipocampais tratadas com A β Os ou lactacistina, e analisar os níveis de seu mRNA, por PCR, assim como fizemos para FMRP (Fig. 10).

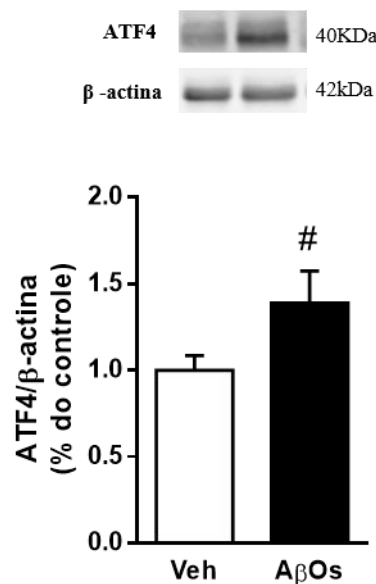


Figura 11. A β Os induzem tendência ao aumento nos níveis de ATF4 no hipocampo de camundongos 7 dias após injeção i.c.v. *Western blot* para ATF4 com amostras provenientes do hipocampo de camundongos 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os. Observamos uma tendência ao aumento dos níveis de ATF4 no grupo injetado com A β Os. N=5 experimentos independentes, # indica $p < 0.1$ em teste t. Dados representados pela média \pm erro médio. Veh=veículo.

5.5. Lactacistina causa tendência à diminuição da fosforilação de eIF4E

Tendo em vista que FMRP inibe a síntese de algumas proteínas e parece estar aumentado em neurônios tratados com A β Os ou lactacistina (Fig. 10), decidimos investigar os níveis de proteínas relacionadas com a tradução. Para isso, realizamos um *Western blot* para eIF4E fosforilada e total, em cultura de neurônios hipocampais tratadas por 24 horas com 500nM de A β Os ou lactacistina (Fig. 12A).

Essa proteína faz parte do complexo eIF4F de iniciação da tradução e da via de mTOR da regulação da síntese de proteínas sinápticas. Quando fosforilada, a eIF4E pode se ligar ao complexo eIF4F e, em seguida, ao mRNA. Além disso, de forma indireta, é nesse complexo que FMRP atua inibindo a tradução.

Apesar do n pequeno, parece haver uma diminuição dos níveis de eIF4E fosforilada em neurônios tratados com lactacistina, em relação aos níveis totais (Fig. 12B). Pela quantificação feita pela β -actina, controle de carregamento, a fosforilação também parece diminuída (Fig. 12D) e os níveis totais parecem aumentados (Fig. 12C).

Já os A β Os parecem causar um aumento da fosforilação de eIF4E em relação aos níveis totais (Fig. 12B). No entanto, pela quantificação pela β -actina, a fosforilação parece não mudar (Fig. 12D) e os níveis totais foram inconclusivos (Fig. 12C).

Devido ao n de 2, os resultados ainda são inconclusivos. O que podemos sugerir, por enquanto, é que lactacistina, ao inibir o proteassoma e levar ao aumento de FMRP, pode causar diminuição da síntese de proteínas sinápticas, mediada, em parte, pela fosforilação de eIF4E. Não podemos concluir nada em relação aos A β Os. Esse experimento será repetido para aumentar o n e para investigação de outras proteínas relacionadas com a tradução.

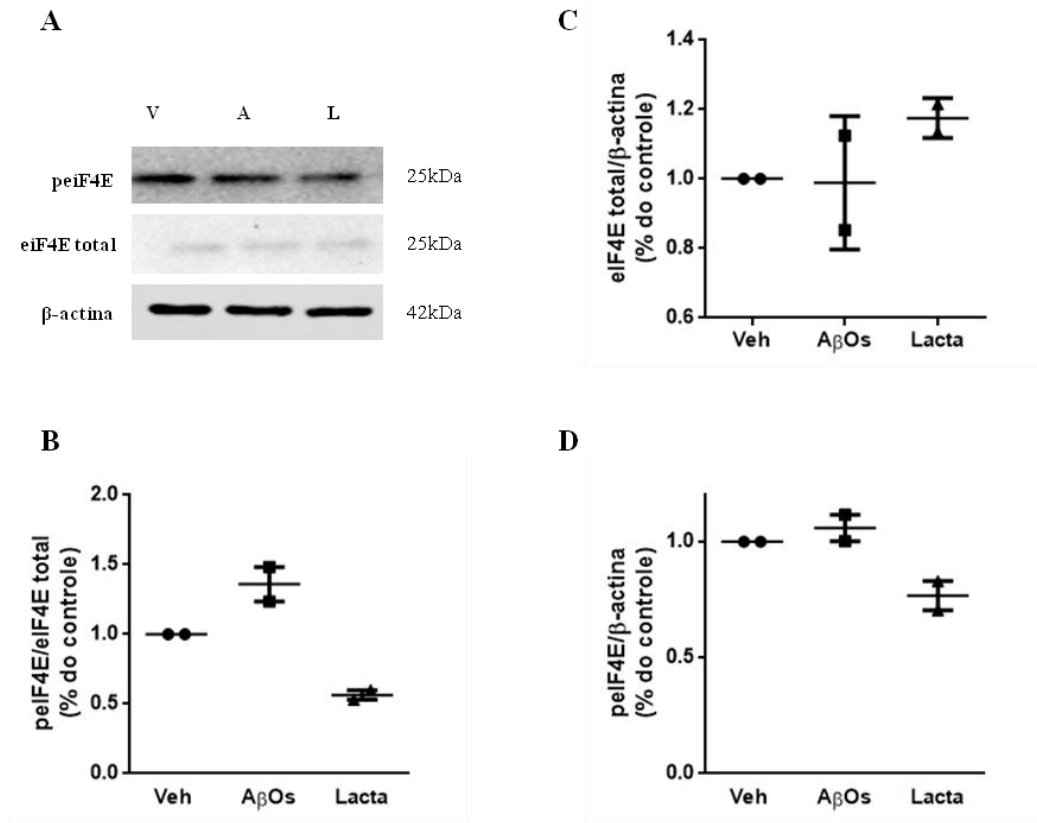


Figura 12. Lactacistina causa tendência à diminuição da fosforilação de eIF4E *in vitro*. Western blot para eIF4E fosforilada e total com amostras de cultura primária de neurônios hipocâmpais expostas por 24 horas a veículo ou 500nM de AβOs ou lactacistina. (A) Bandas representativas; peIF4E=eIF4E fosforilada, V=veículo, A= AβOs, L=lactacistina. (B) Quantificação dos níveis de eIF4E fosforilada pelos níveis totais. (C) Quantificação dos níveis totais de eIF4E pela β-actina, usada como controle de carregamento. (D) Quantificação de eIF4E fosforilada pela β-actina. Lactacistina parece causar uma tendência à diminuição da fosforilação de eIF4E. N=2 experimentos independentes. Veh=veículo, Lacta=lactacistina.

5.6. A β Os causam alterações nas vias de ERK e mTOR 7 dias após injeção i.c.v.

De acordo com o resultado anterior (Fig. 12), quisemos avaliar se e como os A β Os alteram os níveis das proteínas relacionadas com as vias de ERK e mTOR, ambas reguladoras da síntese de proteínas sinápticas.

Para tal, realizamos *Western blot* com amostras de hipocampo de camundongos 24 horas e 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os ou veículo.

Fizemos, inicialmente, marcação para eIF4E fosforilada e total. Como resultado, vimos que os níveis de eIF4E fosforilada estão diminuídos no hipocampo de animais coletados 7 dias depois da injeção com A β Os (Fig. 13B). Não vimos diferença nas amostras coletadas 24 horas após a injeção (Fig. 13A). Interpretando esse resultado junto com o anterior (Fig. 12), podemos sugerir que é necessário um tempo maior de exposição aos A β Os para que haja esse efeito.

Em seguida, então, buscamos avaliar os níveis da fosforilação de 4E-BP1. Essa proteína se liga a eIF4E, impedindo sua fosforilação e, dessa forma, atuando como um repressor da tradução. Através da sinalização da via de mTOR, a 4E-BP1 é fosforilada e deixa de se ligar a eIF4E, permitindo que a tradução ocorra.

Como esperado, os A β Os levaram à diminuição da fosforilação de 4E-BP1 7 dias após a injeção i.c.v. (Fig. 13D), mas não 24 horas (Fig. 13C). A fosforilação diminuída tanto de eIF4E quanto de 4E-BP indica inibição da síntese proteica.

Contudo, ainda falta a quantificação da fosforilação de 4E-BP1 pelos seus níveis totais para assegurar que somente a fosforilação encontra-se reduzida. Até o momento não conseguimos a marcação para 4E-BP1 total.

Passando a olhar as proteínas mais *upstream* à via de mTOR, realizamos em sequência *Western blot* para as proteínas S6 quinase (S6K) e S6. Quando fosforilada, S6K fosforila S6 em um braço da via e, em outro, fosforila eIF4E. Também nesse caso, a fosforilação promove a tradução.

Mais uma vez, vimos que, 7 dias depois da injeção i.c.v., os A β Os causam tendência à diminuição da fosforilação de S6K (Fig 14B) e S6 (Fig. 14D). Nenhuma diferença é vista 24 após a injeção (Fig. 14A e C).

Da mesma forma que para 4E-BP1, ainda não pudemos fazer marcação para os níveis totais de S6, e por isto ainda não é possível concluir se somente sua fosforilação é afetada ou se os níveis totais também mudariam.

Por fim, realizamos *Western blot* para fosforilação de ERK e mTOR também nessas amostras. Observamos que a fosforilação de ERK encontra-se diminuída tanto 24 horas quanto 7 dias após a injeção i.c.v. de A β Os (Fig. 15A e B). A fosforilação de mTOR também encontra-se diminuída 7 dias após a injeção de A β Os (Fig. 15C). O resultado 24 horas após a injeção ainda é inconclusivo, o controle de carregamento variou muito entre as amostras, por isso ainda vamos repetir o experimento para analisar melhor esse resultado.

Assim como nas figuras anteriores, também precisamos normalizar esses dados pela quantidade total da proteína respectiva para assegurar que essa diminuição é excluída da fosforilação e não dos níveis totais.

Nosso próximo passo é repetir esses experimentos *in vitro* e com amostras de animais injetados i.c.v. ou de culturas tratadas com lactacistina para tentar correlacionar esses eventos com a inibição proteossomal. Contudo, já é possível concluir, com esses resultados, que os A β Os causam redução das proteínas da via de mTOR e ERK em camundongos 7 dias após a injeção i.c.v.. Com isto, podemos sugerir que, nesse modelo, os A β Os levam à redução da síntese proteica, embora ainda precisemos fazer SUnSET (método não radioativo de análise de proteínas totais) para afirmarmos isso.

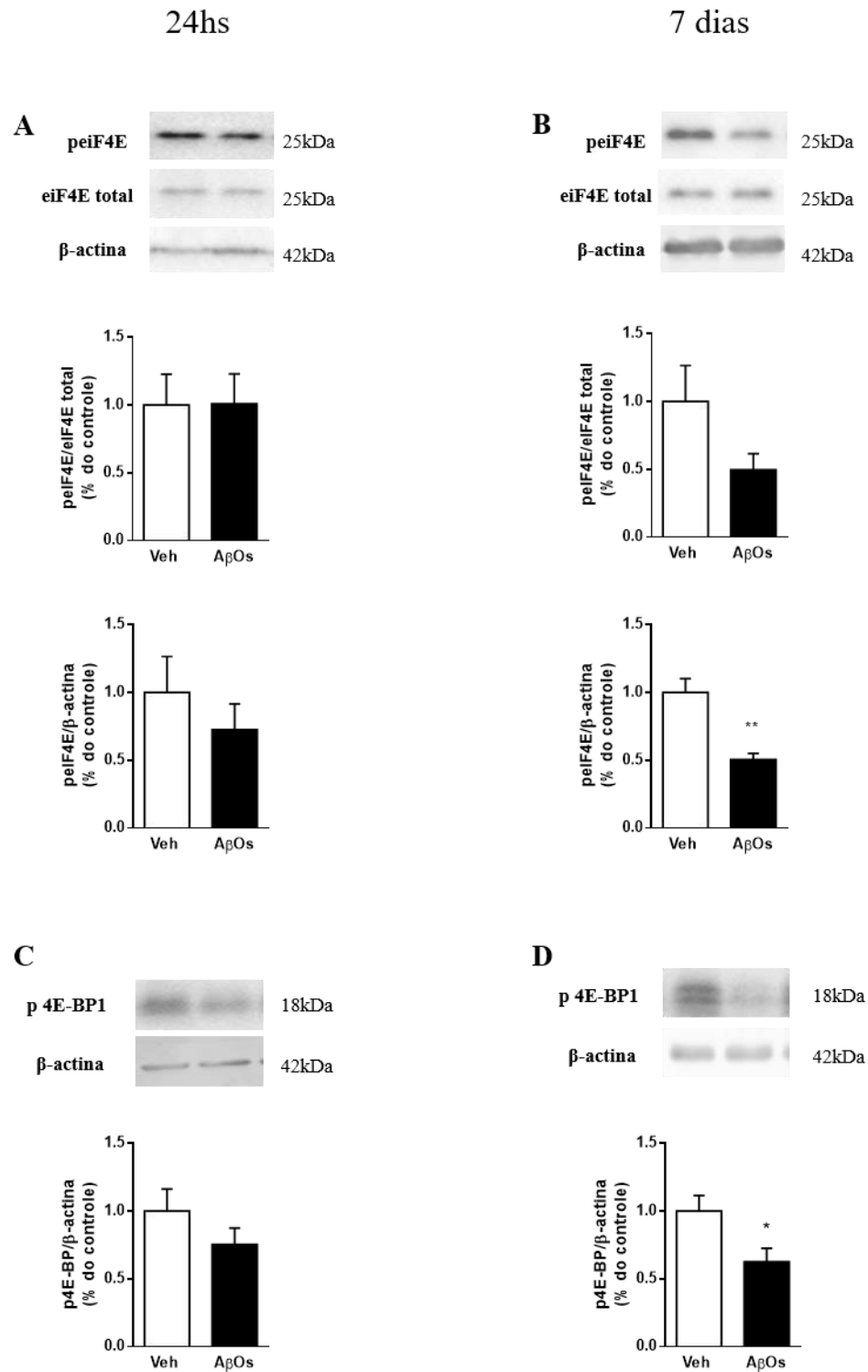


Figura 13. AβOs causam diminuição da fosforilação de eIF4E e 4E-BP1 7 dias após injeção i.c.v. Western blot para eIF4E fosforilada (peIF4E) e total e 4E-BP1 fosforilada (p4E-BP1) com amostras de hipocampo de camundongos 24 horas ou 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de AβOs ou veículo. São mostradas as bandas representativas em cima e a quantificação referente abaixo. Marcação para peIF4E e total 24 horas (A) e 7 dias (B) após injeção i.c.v. de AβOs. Marcação para p4E-BP1 24 horas (C) e 7 dias (D) depois de AβOs. É visto uma diminuição da fosforilação

das proteínas analisadas 7 dias depois da injeção i.c.v. de A β Os. N=5 a 7, * indica p<0.05, ** indica p<0.005 em teste t. Dados representados pela média \pm erro médio. Veh=veículo.

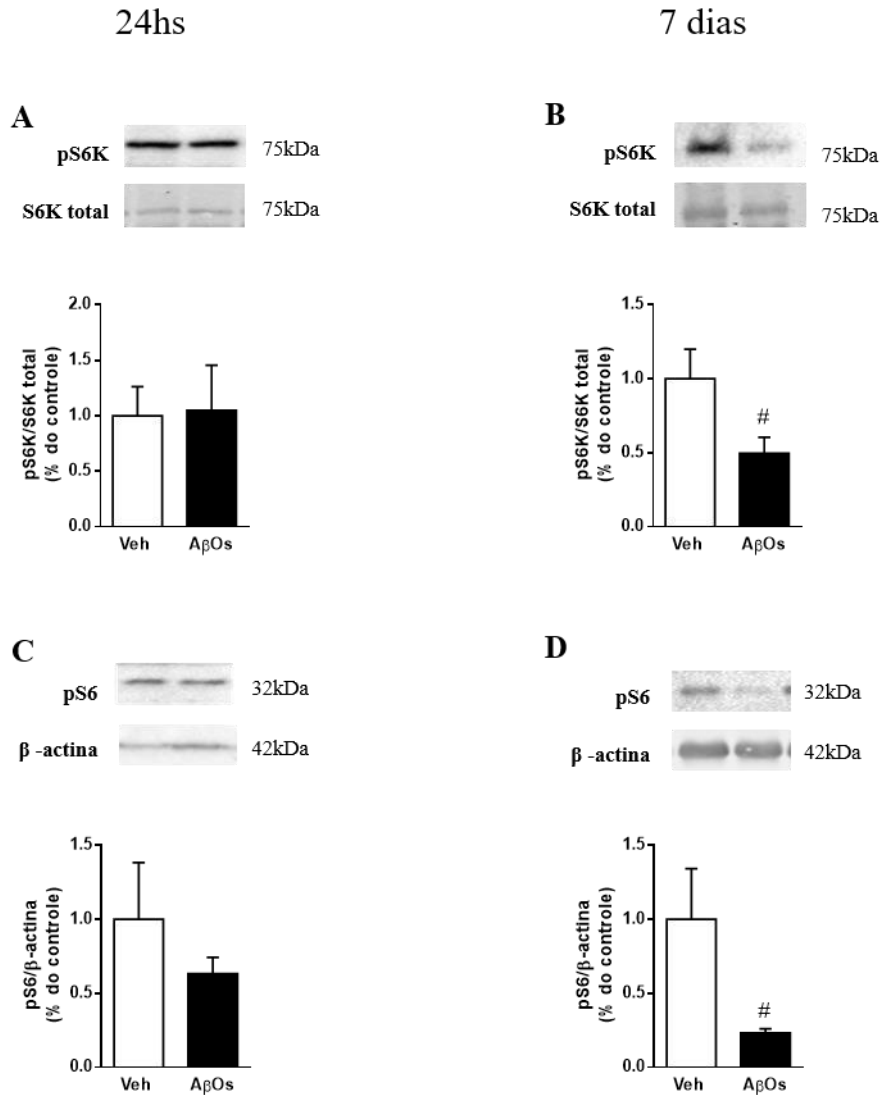


Figura 14. A β Os causam tendência à diminuição da fosforilação de S6K e S6 7 dias após injeção i.c.v. Western blot para S6K fosforilada (pS6K) e S6 fosforilada (pS6) com amostras de hipocampo de camundongos 24 horas ou 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de A β Os ou veículo. São mostradas as bandas representativas em cima e a quantificação referente abaixo. Marcação para S6K fosforilada (pS6K) e total 24 horas (A) e 7 dias (B) depois de A β Os. Marcação para S6 fosforilada (pS6) 24 horas (C) e 7 dias (D) depois de A β Os. Após 7 dias da injeção i.c.v. de A β Os, é visto uma tendência à diminuição da fosforilação das proteínas analisadas. N=5 a 7, # indica p<0.1, em teste t. Dados representados pela média \pm erro médio. Veh=veículo.

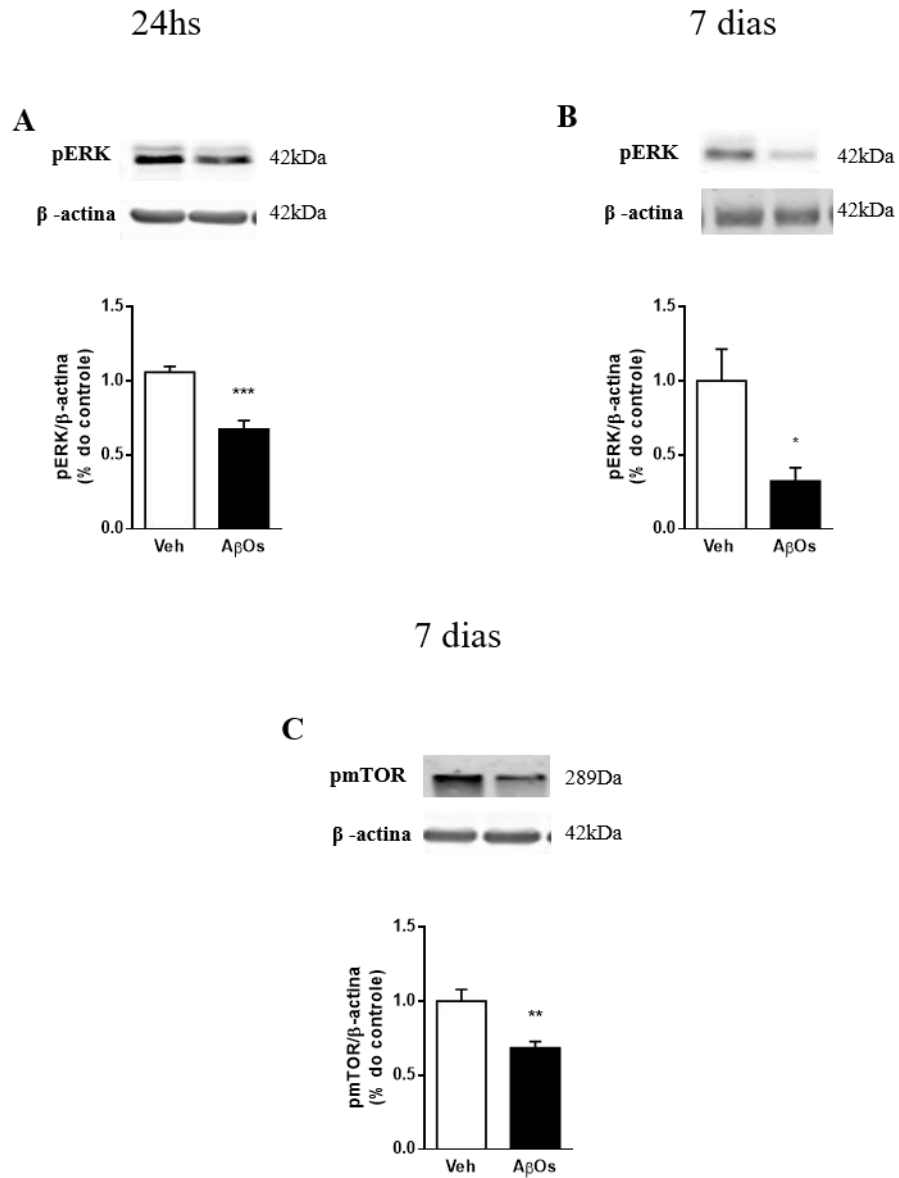


Figura 15. AβOs causam diminuição da fosforilação de ERK e mTOR após injeção i.c.v. *Western blot* para ERK fosforilada (pERK) e mTOR fosforilada (pmTOR) com amostras de hipocampo de camundongos 24 horas ou 7 dias após injeção i.c.v. de 10pmol de AβOs ou veículo. São mostradas as bandas representativas em cima e a quantificação referente abaixo. Marcação para pERK 24 horas (A) e 7 dias (B) depois de AβOs. Marcação para pmTOR 7 dias (C) depois de AβOs. Tanto 24 horas quanto 7 dias depois da injeção i.c.v. de AβOs, vimos uma diminuição da fosforilação de ERK. A fosforilação de mTOR encontra-se diminuída 7 dias após a injeção. N=5 a 7, * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.005$ em teste t. Dados representados pela média \pm erro médio. Veh=veículo.

6. DISCUSSÃO

Parece estar claro na literatura que a atividade do proteassoma encontra-se diminuída na DA, tanto em pacientes quanto em modelos transgênicos (Keller *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2008). Recentemente, foi visto pelo nosso grupo, em dados ainda não publicados, que os A β Os induzem redução das três atividades proteassomais, em modelo de cultura de neurônios hipocampais e em sinaptossomos isolados de camundongos após injeção i.c.v. de A β Os. Por isso, decidimos avaliar mais a fundo quais são as alterações no UPS causadas pelos A β Os. Inicialmente, olhamos para os níveis do proteassoma 20S no hipocampo de animais 24 horas e 7 dias após injeção i.c.v. e em cultura de neurônios expostas a A β Os ou lactacistina, inibidor farmacológico do proteassoma. Em nenhum dos casos vimos diferença em relação ao controle.

No entanto, o efeito poderia ser mascarado caso fosse específico para uma região da célula ou tipo celular, visto que no *Western blot* analisamos os níveis em todos os tipos celulares. Pensando nisso, decidimos avaliar os níveis do proteassoma em prolongamentos sinápticos neuronais, marcando-os para Rpt6, que faz parte da subunidade 19S proteassomal. Nesse caso, os A β Os causaram redução. Infelizmente, capturamos as imagens com o corpo celular em uma exposição estourada para que fosse possível a quantificação das sinapses. Isso significa que, mais tarde, quando tivemos o interesse em quantificar os níveis do proteassoma também no corpo celular, não era possível com as imagens adquiridas. Não foi possível também realizar uma nova captura de imagens, pois a fluorescência já havia se perdido. Dessa forma, não podemos concluir ainda se os A β Os levam a diminuição do proteassoma na sinapse ou se induz sua migração para o corpo celular. Nesse caso, veríamos seus níveis aumentados no soma.

Outra questão a ser ressaltada é a diferença de proteínas observadas nesses experimentos. Enquanto no *Western blot* olhamos para uma proteína da subunidade 20S do proteassoma, na imunocitoquímica olhamos para uma da subunidade 19S regulatória. Talvez a redução seja somente nessa subunidade, valendo a pena analisar, no futuro, Rpt6 por *Western blot* e a subunidade 20S por imunocitoquímica.

Seria interessante, também, investigar a fosforilação de Rpt6, que está relacionada com o aumento da atividade proteassomal. Já foi visto que na DA há uma diminuição na atividade de PKA e CamKII α , ambas enzimas associadas a translocação do proteassoma para sinapse e que

fosforilam Rpt6 (Zhang *et al.*, 2007, Bingol *et al.*, 2006). Sendo assim, esse pode ser um mecanismo pelo qual os A β Os induzem inibição da atividade proteassomal.

Além da inibição do UPS, já foi mostrado aumento de proteínas ubiquitinadas na DA (Almeida *et al.*, 2006, Tai *et al.*, 2012). Esse evento parece estar de acordo com as evidências da inibição proteassomal. Uma vez que o UPS diminui sua taxa de degradação, as proteínas ubiquitinadas se acumulam na célula.

Tentamos avaliar se esse efeito também é observado no nosso modelo de A β Os. No entanto, os resultados foram inconclusivos e o experimento precisa ser repetido com um n maior (dado não mostrado).

Em uma etapa seguinte, hipotetizamos que a inibição da degradação proteassomal causada pelos A β Os levaria ao acúmulo de repressores traducionais. Esses, por sua vez, levariam a inibição da síntese de certas proteínas. De fato, já foi demonstrado que a inibição do proteassoma leva ao acúmulo desses repressores (Dong *et al.*, 2014) e, por exemplo, que FMRP inibe a tradução de PSD-95, uma proteína pós-sináptica (Muddashetty *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostram que os A β Os induzem o aumento dos níveis e expressão de FMRP, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Podemos sugerir, então, que esse efeito é mediado pela inibição da degradação proteassomal. Apesar da falta de significância estatística, a lactacistina também parece causar um aumento dos níveis de FMRP, o que corrobora nossa hipótese.

Em último passo, o acúmulo de FMRP levaria à diminuição dos níveis de proteínas sinápticas, inibindo a tradução dos mRNAs. Analisamos os níveis de PSD-95 por *Western blot* e seu mRNA por PCR em Tempo Real, após tratamento com A β Os *in vitro*. Contudo, os resultados do PCR foram inconclusivos e o experimento precisa ser repetido (dados não mostrados).

Já em relação à análise dos níveis proteicos, não vimos diferenças em PSD-95 nem em hipocampo de camundongos injetados i.c.v. nem em sinaptossomos isolados tratados com A β Os. Em sinaptossomos isolados, porém, parece ter diminuição dos níveis de sinaptofisina, uma proteína pré-sináptica (dados não mostrados). Analisamos também os níveis de outra proteína pós-sináptica, SynGAP, em amostras de hipocampo de camundongos. Nesse caso, apesar do n ainda pequeno também, os A β Os parecem causar uma redução em seus níveis (dado não mostrado).

O n desses experimentos ainda é pequeno e vamos repetir para aumentá-lo e para avaliar outras proteínas sinápticas após tratamento com A β Os. Vamos também incluir um grupo injetado i.c.v. com lactacistina para correlacionar esses efeitos com a disfunção proteassomal.

Como dado prévio, resultados ainda não publicados do nosso grupo mostraram que os A β Os e lactacistina causam diminuição de espinhas dendríticas. Pretendemos avaliar, então, os níveis de mRNA e proteínas sinápticas isoladamente nas sinapses, a fim de descobrir se os A β Os modulam a tradução local através da realocização de mRNAs sinápticos.

Para verificarmos também os níveis de proteínas totais após tratamento com A β Os ou lactacistina, fizemos um ensaio de SUnSET *in vitro*, porém com um n de somente 2. Como resultado, vimos que uma das culturas de neurônio hipocampal que recebeu A β Os ou lactacistina apresentou redução das proteínas totais, enquanto que a outra apresentou aumento. Por isso, ainda estamos repetindo esse experimento (dado não mostrado).

Considerando-se a conexão entre FMRP e a sinalização por mTOR, fomos investigar cada proteína da via, a começar por eIF4E, um fator de iniciação importante para tradução, que encontra-se constitutivamente reprimido por 4E-BPs. Quando fosforilada, 4E-BP se solta de eIF4E, que pode então ser fosforilada e dar sequência à tradução. Em nosso modelo *in vitro*, os A β Os não parecem causar diferença nos níveis de fosforilação de eIF4E, podendo ser uma questão de dose e tempo do tratamento. Apesar do n, a lactacistina parece causar uma redução, o que pode indicar redução da síntese proteica. Infelizmente, ainda não conseguimos aumentar o n desse experimento ou analisar, nessas amostras, as demais proteínas da via.

Também, até o momento, não possuímos amostras de camundongos injetados i.c.v. com lactacistina. Entretanto, nesse modelo, os A β Os parecem causar diminuição da fosforilação das proteínas da via de ERK e mTOR, 7 dias após a injeção i.c.v. Nesse mesmo período, vimos também aumento do repressor ATF4. Esses resultados podem significar que a redução da síntese proteica ocorre em uma fase um pouco mais tardia da toxicidade dos A β Os, talvez após a inibição do proteossoma. É importante que façamos uma curva temporal com A β Os, *in vitro* ou *in vivo*, a fim de determinar em qual momento observamos a inibição do proteossoma, a redução das proteínas da via de mTOR e a redução das proteínas sinápticas. Assim, poderíamos encontrar evidências para causalidade dos eventos.

Como diversos trabalhos na literatura mostraram aumento da via de mTOR em diferentes regiões cerebrais e diferentes modelos de DA (Oddo, 2012; Tramutola *et al.*, 2015), a diminuição que vimos no nosso modelo pode estar relacionada com o tempo e a região que estamos observando. Por isso, também pretendemos investigar as proteínas dessa via em outras regiões, como no córtex pré-frontal, e em outros modelos, como em células de neuroblastoma (SH-SY5Y),

camundongos transgênicos e *slices* humanos tratados com A β Os, em diferentes tempos. É possível, por exemplo, que em um estágio inicial da DA ocorra uma diminuição da sinalização de mTOR e, conforme a progressão da doença, ocorra um aumento como mecanismo de compensação.

O mesmo acontece com ERK1/2 – existem trabalhos na literatura mostrando sua superativação com inibição proteassomal e na DA (Agholme *et al.*, 2014; Feld *et al.*, 2014). Da mesma forma, vamos avaliar seus níveis em diferentes condições e modelos.

Curiosamente, parece que mTOR participa na ativação da degradação proteassomal através da ativação de NRF1 (Zhang *et al.*, 2014). Dentro do nosso contexto, faria sentido vermos essa via diminuída, visto que também vemos diminuição da atividade proteassomal com os A β Os (dado não mostrado). Essa diminuição também estaria de acordo com a diminuição da síntese proteica encontrada na DA, inclusive pelo nosso grupo (dados não publicados).

Passa a ser interessante, então, analisarmos os níveis de NRF1 e seu mRNA no nosso modelo com A β Os e lactacistina. Talvez essa seja a ponte relacionando os nossos resultados.

Por fim, apesar de ainda não estar claro quais as alterações que ocorrem na via de mTOR na DA, demonstramos o momento, em nosso modelo, em que os A β Os levam à diminuição de cada uma das proteínas. Além disso, com base em experimentos do grupo e dados da literatura, acreditamos que a disfunção em mTOR e no UPS desempenham um papel fundamental na disfunção sináptica e perda de memória na DA. Como próximos passos, portanto, pretendemos investigar mais detalhadamente esses eventos para elucidar suas causas, além de correlações para tentar comprovar nossa hipótese.

7. CONCLUSÃO

A partir da interpretação dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Os A β Os induzem diminuição do UPS nos prolongamentos sinápticos em cultura de neurônios hipocampais, mas não em todo o neurônio ou no hipocampo de camundongos que receberam injeção i.c.v. com A β Os;
- Nosso tratamento de lactacistina não induz morte celular e parece causar um aumento dos níveis de FMRP em cultura de neurônios. Da mesma forma, os A β Os causam aumento dos níveis e expressão de FMRP, tanto *in vitro* como *in vivo*, possivelmente através da inibição do proteassoma;
- Assim como FMRP, ATF4 parece estar aumentado *in vivo*, 7 dias após injeção i.c.v. de A β Os;
- A lactacistina, mas não A β Os, parece induzir diminuição da fosforilação de eIF4E *in vitro*;
- *In vivo*, os A β Os causam diminuição da fosforilação de diversas proteínas relacionadas com a regulação da síntese de proteínas sinápticas, possivelmente por intermédio de FMRP;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agholme, L., Nath, S., Domert, J., Marcusson, J., Kagedal, K. e Hallbeck, M. (2014). Proteasome inhibition induces stress kinase dependent transport deficits-implications for Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurosciences* 58, 29-39.
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H. e Gouras, G. K. (2006). β -amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *Journal of Neuroscience* 26, 4277–4288.
- Aso, E., Lomoio, S., López-González, I., Joda, L., Carmona, M., Fernández-Yagüe, N. ... e Ferrer, I. (2012). Amyloid generation and dysfunctional immunoproteasome activation with disease progression in animal model of familial Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 22, 636–653.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G. ... e Wisniewski, H. M. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research* 477, 90-99.
- Banerjee, S., Neveu, P. e Kosik, K. S. (2009). A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron* 64, 871-884.
- Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., ... e Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 12, 32-46.
- Berndsen, C. E. e Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology* 21, 301-307.
- Bingol, B. e Schuman, E. M. (2006). Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* 441, 1144–1148.
- Bingol, B. e Sheng, M. (2011). Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron* 69, 22-32.
- Bingol, B., Wang, C., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J. e Sheng, M. (2010). Autophosphorylated CaMKII α acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. *Cell* 140, 567–578.
- Buffington, S. A., Huang, W. e Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annual Review of Neuroscience* 37, 17-38.
- Burbea, M., Dreier, L., Dittman, J. S., Grunwald, M. E. e Kaplan, J. M. (2002). Ubiquitin and AP180 regulate the abundance of GLR-1 glutamate receptors at postsynaptic elements in *C. elegans*. *Neuron* 35, 107-120.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. e Yankner, B. A. (1995). Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-888.
- Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R. e Oddo, S. (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and tau. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 13107-13120.
- Cammalleri, M., Lutjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W. e Sanna, P. P. (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6k pathway in the induction of late -phase long-term potentiation in the CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 14368-14373.
- Carthew, R. W. e Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Castaño, E. M., Ghiso, J., Prelli, F., Gorevic, P. D., Migheli, A. e Frangion, B. (1986). *In vitro* formation of amyloid

fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous of Alzheimer's disease β -protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141, 782-789.

Chafekar, S. M., Hoozemans, J. J., Zwart, R., Baas, F. e Scheper, W. (2007). Abeta 1-42 induces mild endoplasmic reticulum stress in an aggregation state-dependent manner. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 2245-2254.

Cho, M. H., Cho, K., Kang, H. J., Jeon, E. Y., Kim, H. S., Kwon, H. J., Kim, H. M., Kim, D. H. e Yoon, S. Y. (2014). Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 10, 1761-1775.

Choi, J., Levey, A. I., Weintraub, S. T., Rees, H. D., Gearing, M., Chin, L. S. e Li, L. (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13256-13264.

Citri, A. e Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33, 18-41.

Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M. F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., Klein, W. L., Epstein, A. L., De Felice, F. G., Jerusalinsky, D. e Ferreira, S. T. (2010). N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic A β oligomers. *Journal of Neurochemistry* 115, 1520-1529.

De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T. e Klein, W. L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 11590-11601.

Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I. e Glabe, C. G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 17294-17300.

Dennissen, F. J. A., Kholod, N., Hermes, D. J. H. P., Kemmerling, N., Steinbusch, H. W. M., Dantuma, N. P. e Leeuwen, F. W. Van. (2011). Mutant ubiquitin (UBB+1) associated with neurodegenerative disorders is hydrolyzed by ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (UCH-L3). *FEBS Letters* 585, 2568-2574.

Ding, Q., Dimayuga, E., Markesbery, W. R. e Keller, J. N. (2006). Proteasome inhibition induces reversible impairments in protein synthesis. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2, 1055-1063.

Djakovic, S. N., Schwarz, L. A., Barylko, B., Demartino, G. N. e Patrick, G. N. (2009). Regulation of the proteasome by neuronal activity and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 26655-26665.

Dong, C., Bach, S. V, Haynes, K. A. e Hegde, A. N. (2014). Proteasome modulates positive and negative translational regulators in long-term synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience* 34, 3171-3182.

Dong, C., Upadhyay, S. C., Ding, L., Smith, T. K. e Hegde, A. N. (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning and Memory* 15, 335-347.

Dufner, A. e Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental Cell Research*, 253, 100-109.

Dunkley, P. R., Jarvie, P. E. e Robinson, P. J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols* 3, 1718-1728.

Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28, 511-525.

- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience* 6, 231-242.
- Fawzi, N. L., Ying, J., Torchia, D. A. e Clore, G. M. (2010). Kinetics of amyloid-beta monomer-to-oligomer exchange by NMR relaxation. *Journal of the American Chemical Society* 132, 9948-9951.
- Feld, M., Krawczyk, M. C., Sol Fustiñana M., Blake, M. G., Baratti, C. M., Romano, A. e Boccia, M. M. (2014). Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 40, 69-82.
- Ferreira, S. T. e Klein, N. L. (2011). The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 529-543.
- Figueiredo, C. P., Clarke, J. R., Ledo, J. H., Ribeiro, C. F., Costa, C. V., Melo, H. M. e Ferreira, S. T. (2013). Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight A β oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *The Journal of Neuroscience* 33, 9626-9634.
- Fonseca, R., Vabulas, R. M., Hartl, F. U., Bonhoeffer, T., e Nagerl, U. V. (2006). A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron*, 52, 239-245.
- Fu, H., Liu, B., Frost, J. L., Hong, S., Jin, M., Ostaszewski, B., Shankar, G. M., Costantino, I. M., Carroll, M. C., Mayadas, T. N. e Lemere, C. A. (2012). Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A β by microglia. *Glia* 60, 993-1003.
- Glenner, G. G. e Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890.
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E. e Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 4051-4055.
- Gong, B., Cao, Z., Zheng, P., Vitolo, O. V, Liu, S., Staniszewski, A., ... e Arancio, O. (2006). Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues β -amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. *Cell* 127, 775-788.
- Gu, Y., Sanjo, N., Chen, F., Hasegawa, H., Petit, A., Ruan, X., ... e Fraser, P. E. (2004). The presenilin proteins are components of multiple membrane-bound complexes that have different biological activities. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 31329-31336.
- Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-ramirez, H., Stein, I. S., Johannes, W., Patrick, G. N. e Zito, K. (2012). Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron* 74, 1023-1030.
- Hardy, J. A. e Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256,184-185.
- Hardy, J. e Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297,353-356.
- Hay, N. e Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development* 18, 1926-1945.
- Hegde, A. N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D. G., ...e Schwartz, J. H. (1997). Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 89, 115-126.
- Herrera, E. J., Caramelli, P., Silveira, A. A. S. e Nitrini, R. (2002). Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 16, 103-108.
- Hershko, A. e Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-479.

- Hoeffler, C. A. e Klann, E. (2010). mTOR Signaling: At the Crossroads of Plasticity, Memory, and Disease. *Trends in Neurosciences* 33, 67.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R. e Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51, 441–454.
- Huang, J., Ikeuchi, Y., Malumbres, M. e Bonni, A. (2015). A Cdh1-APC/FMRP Ubiquitin Signaling Link Drives mGluR-Dependent Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain. *Neuron* 86, 726-739.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., Albert, M. S., Hyman, B. T. e Irizarry, M. C. (2004). *Neurology* 23, 925-931.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. e Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biolog.* 11, 113-127.
- Jr, M. A., Mukherjee, N., Bandaru, P., Miller, J. B., Corcoran, D. L., Langlois, C., ... e Tuschl, T. (2012). FMR1 targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* 492, 382–386.
- Karpova, A., Mikhaylova, M., Thomas, U., Knopfel, T. e Behnisch, T. (2006). Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *Journal of Neuroscience* 26, 4949–4955.
- Keller, J. N., Hanni, K. B. e Markesbery, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 75, 436–439.
- Lafay-Chebassier, C., Paccalin, M., Page, G., Barc-Pain, S., Perault-Pochat, M. C., Gil, R., Pradier, L. e Hugon, J. (2005). mTOR/p70S6k signalling alteration by Ab exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 94, 215-225.
- Laferla, F. M., Green, K. N. e Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 499–509.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... e Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6448-6453.
- Lambert, M. P., Viola, K. L., Chromy, B. A., Chang, L., Morgan, T. E., Yu, J. e Klein, W. L. (2001). Vaccination with soluble A β oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *Journal of Neurochemistry* 79, 595-605.
- Liu, S. J., Gasperini, R., Foa, L. e Small, D. H. (2010). Amyloid-beta decreases cell-surface AMPA receptors by increasing intracellular calcium and phosphorylation of GluR2. *J. Journal of Alzheimers Disease* 21, 655–666.
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., ... e Medina, J. H. (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience* 14, 1820–1826.
- Luscher, C., Xia, H., Beattie, E. C., Carroll, R. C., Von Zastrow, M., Malenka, R. C. e Nicoll, R. A. (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*, 24, 649-658.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* 84, 87-136.
- Ma, T., Hoeffler, C.A., Capetillo-Zarate, E., Yu, F., Wong, H., Lin, M.T., Tampellini, D., Klann, E., Blitzer, R.D. e Gouras, G.K. (2010). Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, 1-10.

- Ma, T., Trinh, M. A., Wexler, A. J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D. R. e Klann, E. (2013). Suppression of eIF2alpha kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nature Neuroscience* 16, 1299-1305.
- Mabb, A. M. e Ehlers, M. D. (2010). Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26, 179-210.
- Maurer, K., Volk, S. e Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* 349, 1906–1909.
- Melnikova, I. (2007). Therapies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 341-342.
- Miners, J. S., Barua, N., Kehoe, P. G., Gill, S. e Love, S. (2011). Abeta-Degrading Enzymes: Potential for Treatment of Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 70, 944-959.
- Möller, H. J. e Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 248, 111-122.
- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T. e Bassell, G.J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Molecular Cell* 42, 673-688.
- Murata, S., Yashiroda, H. e Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 104-115.
- Myeku, N., Clelland, C. L., Emrani, S., Kukushkin, N. V, Yu, W. H., Goldberg, A. L. e Duff, K. E. (2015). Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nature Medicine* 6, 1–11.
- Oddo, S. (2012). The role of mTOR signaling in Alzheimer Disease. *Frontiers Bioscience* 4, 941-952.
- Oh, S., Seok, H., Hwang, E., Jin, H., Lee, W., Jeon, S. e Mook-jung, I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 1292–1299.
- Osaka, H., Wang, Y., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., ... e Wada, K. (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Human Molecular Genetics*,12, 1945–1958.
- Perry, G., Friedman, R. e Shawt, G. (1987). Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 3033–3036.
- Pigino, G., Morfini, G., Atagi, Y., Deshpande, A., Yu, C., Jungbauer, L. e Brady, S. (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5907-5912.
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C. e Pearson, H. A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of Neuroscience* 23, 5531-5535.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fal, M., Staniszewski, A., Palmeri, A. e Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 28, 14537-14545.
- Radhakrishnan, S. K., Lee, C. S., Young, P., Beskow, A., Jefferson, Y. e Deshaies, R. J. (2010). Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Molecular Cell* 38, 17–28.

- Reddy, P. H., Mani, G., Park, B. S., Jacques, J., Mudoch, G., Whetsell, W. Jr., Kaye, J. e Manczak, M. (2005). Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *Journal of Alzheimers Disease* 7, 103-117.
- Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L. e Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739-754.
- Richardson, J., Kendal, C., Anderson, R., Priest, F., Gower, E., Soden, P., ... e Rupniak, H. (2003). Ultrastructural and behavioural changes precede amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 122, 213-228.
- Ross, C. A. e Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* 10, 10-17.
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R. e Masters, C. L. (1989). Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 320, 1446-1452.
- Santoro, M. R., Bray, S. M. e Warren, S. T. (2012). Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annual Review of Pathology* 7, 219-45.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., ... e Youkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 2, 864-870.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791.
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioral Brain Research* 192, 106-113.
- Sengupta, S., Peterson, T. R. e Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell* 40,310-322.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. e Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1, 1-23.
- Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., Klann, E. e Zukin, R. S. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience* 30, 694-702.
- Shipton, O. A., Leitz, J. R., Dworzak, J., Acton, C. E., Tunbridge, E. M., Denk F. e Vargas-Caballero, M. (2011). Tau protein is required for amyloid β -induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 1688-1692.
- Sloane, J. A., Pietropaolo, M. F., Rosene, D. L., Moss, M. B., Peters, A., Kemper, T. e Abraham, C. R. (1997). Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. *Acta Neuropathologica* 94, 471-478.
- Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R. e Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid-b Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 5, 1-8.
- Tai, H. C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L. e Hyman, B. T. (2012). The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer disease is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System. *American Journal of Pathology* 181, 1426-1435.
- Tai, H. e Schuman, E. M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 826-838.

- Tan, Z., Sun, X., Hou, F. S., Oh, H., Hilgenberg, L. G. W. e Hol, E. M. (2007). Mutant ubiquitin found in Alzheimer's disease causes neuritic beading of mitochondria in association with neuronal degeneration. *Cell Death & Differentiation* 14, 1721-1732.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H. Gingras, A. C., Sonenberg, N. e Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 467-472.
- Texidó, L., Martín-Satué, M., Alberdi, E., Solsona, C. e Matute, C. (2011). Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 49, 184–190.
- Thies, W., Bleiler, L. e Alzheimer's, A. (2013). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dementia* 9, 208-245.
- Tokutake, T., Kasuga, K., Yajima, R., Sekine, Y., Tezuka, T., Nishizawa, M. e Ikeuchi, T. (2012). Hyperphosphorylation of tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 35222-35233.
- Tramutola, A., Triplett, J. C., Di Domenico, F., Niedowicz, D. M., Murphy, M. P., Coccia, R., Perluigi, M. e Butterfield, D. A. (2015). Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. *Journal of Neurochemistry* 133, 739-749.
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M. e LaFerla, F. M. (2008). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of Aging* 29, 1607-1618.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. e Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology* 70, 1-32.
- Varshavsky, A. (2005). Regulated protein degradation. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30, 8–11.
- Waltreit, R. e Weller, M. (2003). Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology* 27, 99–106.
- World Alzheimer Report 2015. London: Alzheimer's Disease International, 2015.
- Xie, Y. e Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 3056-3061.
- Yang, C. N., Shiao, Y. J., Shie, F. S., Guo, B. S., Chen, P. H., Cho, C. Y., Chen, Y. J., Huang, F. L. e Tsay, H. J. (2011). Mechanism mediating oligomeric Abeta clearance by naive primary microglia. *Neurobiology of Disease* 42, 221-230.
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A. J. e Kudlow, J. E. (2007). Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 22460-22471.
- Zhang, Y., Nicholatos, J., Dreier, J. R., Ricoult, S. J. H., Widenmaier, S. B., Hotamisligil, G. S., Kwiatkowski, D. J. e Manning, B. D. (2014). Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC. *Nature* 513, 440-443.
- Zhao, W. Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X. D., Stone, D. J., Ferrer, M., Townsend, M., Wolfe, A. L., Seager, M. A., ... e Ray, W. J. (2010). Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 7619–7632.