

**Fenótipos de Astrócitos reativos na fase pré-amiloide**  
*(Reactive astrocyte phenotypes in the pre-amyloid phase)*

Projeto financiado pela agência Internacional *Alzheimer's association*  
**Coordenador:** Eduardo Rigon Zimmer, Departamento de Farmacologia, UFRGS

**LINHA DE PESQUISA:** Neuroquímica

**NOME DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Eduardo Rigon Zimmer

Endereço: Av. Ramiro Barcelos, 2600 – Prédio Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS.

Departamento de Bioquímica, Laboratório 28 Fone: (51) 3308-5558

E-mail: erzimmer@gmail.com

**OUTROS PESQUISADORES ENVOLVIDOS:**

Diogo Onofre Gomes de Souza (Professor titular, Departamento de Bioquímica, UFRGS)

Débora Guerini de Souza (Pós-doutoranda do PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS)

Bruna Bellaver (Pós-doutoranda do PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS)

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima (Pós-doutoranda do PPG em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica – UFRGS)

**FINALIDADE DO PROJETO:** Pesquisa

**LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO:**

**1. Obtenção dos animais:** Os animais adultos serão obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS;

**2. Manutenção dos animais:** Biotério do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS;

**3. Transporte dos animais:** Os animais serão transportados para o Biotério do Departamento de Bioquímica através do veículo disponibilizado pelo CREAL com motorista habilitado para este tipo de transporte;

**4. Experimentos neuroquímicos:** serão realizados nas dependências do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS.

**PRAZO DE EXECUÇÃO:** 36 meses

**FONTE DE FINANCIAMENTO:** Alzheimer's Association.

**1. Introdução**

A doença de Alzheimer (DA) é patologicamente caracterizada pela deposição de placas de beta-amiloide (A $\beta$ ) e pela formação de emaranhados neurofibrilares (NFT) compostos de

tau hiperfosforilada (POLANCO *et al.*, 2018). Atualmente, acredita-se que o acúmulo de A $\beta$  desencadeie uma cascata de eventos patológicos, levando à neurodegeneração, ao aparecimento de declínio cognitivo e, por fim, demência (JACK JR *et al.*, 2013). Nos últimos anos, a pesquisa da DA tem se concentrado na compreensão das marcas neuropatológicas e dos aspectos neuronais da doença. No entanto, os ensaios clínicos que visam essas características patológicas têm falhado repetidamente (HONIG *et al.*, 2018; OSTROWITZKI *et al.*, 2017; SALLOWAY *et al.*, 2014). Além disso, os medicamentos aprovados com o objetivo de restaurar a homeostase da neurotransmissão basicamente melhoraram os sintomas - por um período limitado - em vez de interromper a progressão da doença (KUMAR; SINGH, 2015). É hora de expandir essa visão neurocêntrica para uma visão mais integrativa da DA, na qual outros tipos de células cerebrais estão incluídos.

As células gliais - astrócitos, microglia e oligodendrócitos - são essenciais para o funcionamento adequado do sistema nervoso central (SNC) (JÄKEL; DIMOU, 2017), mas seus papéis na DA não são bem compreendidos. Nos últimos anos, considerável atenção tem sido dada à ativação microglial como um índice de alterações neuroinflamatórias na DA (HENEKA *et al.*, 2015). No entanto, as alterações dos astrócitos na fisiopatologia da DA têm sido menos exploradas. Astrócitos são fisicamente intercalados com neurônios, e um único astrócito é capaz de trocar informações simultaneamente com vários neurônios. São as células homeostáticas do cérebro, desempenhando papéis críticos em: I) controlar a neurotransmissão: através da recaptação de glutamato e GABA; II) captar glicose e liberar lactato para os neurônios durante períodos de altas demandas energéticas dos neurônios; III) manter a homeostase do equilíbrio iônico e hídrico do SNC: por seus canais iônicos e de aquaporina-4; e IV) liberar moléculas neuroativas: gliotransmissores - como D-serina e ATP - impactando diretamente a força e o tempo das sinapses (SOUZA *et al.*, 2019). Portanto, é muito provável que eles estejam fortemente envolvidos na fisiopatologia da DA.

Na DA, os astrócitos sofrem alterações morfológicas, moleculares e funcionais, coletivamente denominadas de “reatividade astrocitária” (ESCARTIN *et al.*, 2021). Mais especificamente, eles mudam sua função, tornam-se atróficos ou hipertróficos e superexpressam marcadores gliais, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina e monoamina oxidase-B (MAO-B) (CARTER *et al.*, 2019). Até onde sabemos, fomos os primeiros a fornecer evidências *in vivo* de que a tomografia por emissão de pósitrons (PET) [18F]FDG também reflete o metabolismo da glicose dos astrócitos (ZIMMER *et al.*, 2017), que agora é um consenso na área (CHÉTELAT *et al.*, 2020). Poucos biomarcadores de astrócitos foram investigados na DA e se eles fornecem ganho de informação na fase pré-

clínica da DA assintomática ainda é desconhecido.

Estudos experimentais forneceram evidências sólidas de que a reatividade dos astrócitos é desencadeada por oligômeros A $\beta$  (FONTANA *et al.*, 2020). As formas oligoméricas de A $\beta$  são a patologia central da fase pré-amiloide da DA, recentemente proposta (UHLMANN *et al.*, 2020). A fase pré-amiloide tem sido sugerida como a fase ideal para o diagnóstico precoce e intervenção terapêutica. Assim, os primeiros astrócitos reativos parecem altamente adequados para o desenvolvimento de novos candidatos a biomarcadores. Um artigo interessante recente usando sequenciamento de células únicas investigou fenótipos de astrócitos em camundongos 5xFAD em várias idades, mas esses camundongos já apresentavam placas de A $\beta$  maduras com 1,5-2 meses (HABIB *et al.*, 2020). Portanto, ainda falta a caracterização dos fenótipos astrocitários na fase pré-amiloide.

Nas últimas duas décadas, muitos modelos transgênicos em camundongos foram criados para contribuir para um melhor entendimento da DA. Entretanto, nenhum desses modelos havia sido capaz de mimetizar completamente a patologia característica apresentada na DA, especialmente a presença dos NTFs e a atrofia cerebral. Esta foi a situação até 2013, quando um grupo de pesquisadores produziu o rato TgF344-AD (background Fischer 344 Wild Type: F344-WT), o primeiro modelo animal da DA, utilizando mutações da forma familiar, a apresentar os dois marcadores neuropatológicos característicos –  $\beta$ A e NTFs – em associação com extensa atrofia cerebral (COHEN *et al.*, 2013). Esse modelo apresenta as características clássicas da doença, incluindo amiloidose e deposição de NFTs da proteína e comprometimento de memória. As modificações patológicas identificadas parecem iniciar aos 6 meses de idade e se agravar entre 10 e 24 meses, seguindo uma evolução dependente da idade que inicialmente reproduz o período cognitivamente assintomático da doença visto em humanos (JACK JR *et al.*, 2013). Apesar de algumas características da patologia dos TgF344-AD já terem sido investigadas, como atrofia e conectividade cerebral (ANCKAERTS *et al.*, 2019; DAIANU *et al.*, 2015), disfunções vasculares (JOO *et al.*, 2017), comportamento (BERKOWITZ *et al.*, 2018; PENTKOWSKI *et al.*, 2018) e até mesmo alterações oculares (TSAI *et al.*, 2014), vários aspectos importantes ainda seguem totalmente inexplorados.

Além disso, a compreensão sobre a potencial influência que a microbiota intestinal exerce sobre a DA ainda segue pouco explorada. O papel da microbiota intestinal em doenças neurodegenerativas, como a DA, tem se tornado um campo de pesquisa emergente. Evidências recentes demonstram a importância da influência que a microbiota intestinal exerce sobre o cérebro através do chamado eixo intestino-cérebro (DINAN; CRYAN, 2017). A microbiota e o cérebro se comunicam por várias vias, incluindo o sistema imunológico, o metabolismo do

triptofano, o nervo vago, o sistema nervoso entérico (ENS), o sistema neuroendócrino, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e os metabólitos derivados de bactérias (CRYAN *et al.*, 2019; MORAIS; SCHREIBER; MAZMANIAN, 2021; SANDHU *et al.*, 2017). A comunicação bidirecional ao longo do eixo intestino-cérebro é um aspecto fundamental da sinergia entre a microbiota e o hospedeiro no acesso às vias de sinalização do intestino-cérebro para modular o cérebro e o comportamento do hospedeiro (CRYAN *et al.*, 2019). Uma das principais funções das comunidades microbianas do intestino está associada à manutenção do equilíbrio homeostático das funções fisiológicas do organismo. Qualquer desequilíbrio nesta população, seja na forma de disbiose taxonômica e/ou funcional, está associada a distúrbios na saúde (DAS; NAIR, 2019).

Na DA, as mudanças na composição microbiana intestinal podem ter relação com o aumento da deposição das proteínas  $\beta$ -amilóide e TAU, e por consequência estarem associadas com a progressão da doença. Indivíduos com DA apresentaram um aumento da abundância do filo Bacteroidetes e uma redução de Firmicutes e Actinobactérias (WANG *et al.*, 2018). O aumento da abundância de determinados gêneros bacterianos, particularmente *Blautia* e *Bacteroides*, e redução de *SMB53*, *Dialister* e *Turicibacter* foram correlacionados com aumento da expressão de proteínas amiloides (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40), p-tau, p-tau/A $\beta$ 42 e YKL-40 e maior patologia da DA (WANG *et al.*, 2018). Além do acúmulo de proteína A $\beta$  e da hiperfosforilação da proteína tau no cérebro, a presença de determinados grupos de microrganismos pode estar associada aos processos inflamatórios que levam à neurodegeneração. A redução da abundância do táxon anti-inflamatório, *Eubacterium rectale* e o aumento na abundância do táxon pró-inflamatório *Escherichia/Shigella* foi correlacionado positivamente com o aumento dos níveis elevados de citocinas inflamatórias CXCL2, NLRP3 e IL-1 $\beta$  no líquido, estando possivelmente associados a um estado inflamatório periférico em pacientes com comprometimento cognitivo e amiloidose cerebral (CATTANEO *et al.*, 2017). Uma variedade de bactérias do microbioma tem a capacidade de produzir grandes quantidades de peptídeos amiloides, lipopolissacarídeos (LPS) e outros metabólitos patogênicos pró-inflamatórios relacionados, que podem contribuir com a carga amiloide sistêmica e do sistema nervoso central (SNC) em idosos (HILL; LUKIW, 2015; ZHAO; LUKIW, 2015). A caracterização da microbiota intestinal na DA pode contribuir com a maior compreensão da relação microbiana com a amiloidose cerebral, e pode ser usada como uma ferramenta de triagem pré-clínica não invasiva na DA e para o direcionamento da modulação da microbiota intestinal como estratégia terapêutica na prevenção do declínio cognitivo relacionado a DA (SHENG *et al.*, 2022). Compreender o papel da microbiota em um modelo transgênico de DA

pode fornecer pistas sobre novos alvos terapêuticos com o objetivo de retardar o desenvolvimento e progressão da doença, e auxiliar na potencial reversão do quadro clínico da DA.

Com base nas evidências apresentadas acima, nossa hipótese central é que os astrócitos reativos assumem fenótipos associados à doença na fase pré-amiloide da DA e podem ter relação com a desvios intestinal, potencialmente servindo como um alvo para o diagnóstico e tratamento precoces. Nosso estudo tem o potencial de definir alvos de biomarcadores de astrócitos com alto valor translacional para capturar a fase pré-amiloide da DA e realizar uma caracterização longitudinal da microbiota do modelo TgF344-AD.

## **2. Objetivos**

Usando uma combinação de técnicas moleculares, celulares e bioquímicas, pretendemos determinar o fenótipo regional de astrócitos e a caracterização longitudinal da microbiota intestinal na fase pré-amiloide da DA em um modelo transgênico da DA, destacando potenciais novos alvos de biomarcadores. Esses alvos potenciais serão validados em tecido *post-mortem* e fluidos biológicos [líquido cefalorraquidiano (LCR) e plasma] de ratos.

### **2.1. Objetivos específicos**

- a) Definir fenótipos regionais de astrócitos na fase pré-amilóide da DA;
- b) Identificar mudanças nos processos biológicos astrocíticos;
- c) Validar as alterações dos astrócitos na fase pré-amiloide;
- d) Definir a modalidade de biomarcador mais adequada;
- e) Estabelecer a relação da caracterização longitudinal da microbiota intestinal com as alterações astrocíticas em modelo TgF344-AD.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Animais**

Serão utilizados ratos machos e fêmeas transgênicos TgF344-AD heterozigotos e controles de quatro meses de idade de nossa colônia estabelecida no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Este modelo de DA tem mutações de APP e PSEN1 humanas e desenvolve

as primeiras placas A $\beta$  detectáveis, conformação rica em folhas  $\beta$ , em seis meses (COHEN *et al.*, 2013). Calculamos 8 animais por grupo, totalizando 32 animais para os experimentos descritos nas sessões 3.2 e 3.4 e adicionais 32 animais para os experimentos descritos na seção 3.5. O embasamento do cálculo amostral é descrito na sessão 3.9.

### **3.2. Definir fenótipos regionais de astrócitos na fase pré-amilóide da DA**

Serão utilizados ratos machos e fêmeas transgênicos TgF344-AD heterozigotos de quatro meses de idade de nossa colônia estabelecida no Centro Experimental e de Reprodução Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Este modelo tem mutações de APP e PS1 humanas e desenvolve as primeiras placas A $\beta$  detectáveis, conformação rica em folhas  $\beta$ , em seis meses (COHEN *et al.*, 2013). Os cérebros dos animais serão dissecados para obtenção dos córtices pré-frontal e temporoparietal, hipocampo e cerebelo. O hemisfério direito de cada região será usado para o isolamento de astrócitos usando um classificador FACSMelody (BD Biosciences) com o marcador de superfície celular GLAST (ACSA-2 PE) (G. KANTZER *et al.*, 2017). O enriquecimento de astrócitos será confirmado com RT-PCR quantitativo utilizando marcadores astrocitários, microgliais e neuronais. O RNA dos astrócitos classificados será extraído usando RNAeasy Plus Micro (Qiagen) e a qualidade de extração (RIN) testada com o Agilent Bioanalyser System. Posteriormente, o cDNA será gerado usando o método de Nugen RNA-Seq para amostras de RNA de baixa entrada, Ovation RNA-Seq Systemv2 (NuGEN), e posteriormente processado usando o TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 da Illumina (Illumina). Finalmente, o sequenciamento de próxima geração será realizado no sistema Illumina NovaSeq 6000 (WU *et al.*, 2019). O alinhamento de RNAseq e transcrito de expressão diferencial de dados brutos será realizado usando o algoritmo Salmon (v1.3.0) (PATRO *et al.*, 2017), mapeado para o genoma de referência de *Rattus norvegicus* Ensembl build 96 (<ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-96>). As leituras alinhadas serão resumidas usando o pacote tximport (v1.12.3) (SONESON; LOVE; ROBINSON, 2015) e os genes com contagem média <10 serão filtrados. Por fim, os dados de expressão processados serão submetidos ao método DESeq2 (v1.28.1) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) para avaliação de expressão diferencial. Genes significativamente alterados entre animais WT e TgF344-AD serão considerados diferencialmente expressos (p-ajustado <0,05). O hemisfério esquerdo do cérebro será utilizado para as análises descritas abaixo. Nesta parte da metodologia, o grau de severidade é classificado como sem recuperação.

### **3.3. Identificar mudanças nos processos biológicos astrocíticos na fase pré-amilóide**

Mudanças em genes individuais podem fornecer informações limitadas, enquanto a replicação de mudanças transcriptômicas no nível da via é mais consistente e tem o potencial de oferecer insights sobre os processos biológicos perturbados na DA. Na verdade, a avaliação do perfil funcional de conjuntos de genes tem maior probabilidade de indicar processos e mecanismos fisiopatológicos subjacentes envolvidos na doença (YU *et al.*, 2012). Assim, podemos usar conjuntos de DEGs alterados pela doença para identificar e investigar os processos biológicos associados à fase pré-amiloide, o que pode fornecer informações valiosas para avançar ainda mais em nossa compreensão sobre os desencadeadores da doença. Para avaliar os conjuntos de DEGs, realizaremos análises de enriquecimento funcional dos processos biológicos da Ontologia Genética (GO) e das vias KEGG utilizando os genes obtidos na análise de expressão diferencial. Além disso, a similaridade semântica dos termos GO será usada para inferir relações entre genes no contexto de sua funcionalidade biológica com o pacote GOSemSim (v2.0.0) (YU *et al.*, 2010). Nesta etapa do estudo, o grau de severidade não se aplica, por ser uma análise computacional.

#### **3.4. Validar as alterações dos astrócitos na fase pré-amiloide**

Os alvos de astrócitos identificados com base nos objetivos específicos “a” e “b” fornecem uma estrutura excepcional para desenvolver novos biomarcadores de DA. No entanto, uma etapa de validação é crítica para garantir essas mudanças nos níveis de gene e proteína. Nosso objetivo é validar nossa análise transcriptômica usando expressão gênica quantitativa e western blotting. Usaremos as regiões do cérebro de interesse definidas nos objetivos específicos “a” e “b” para este conjunto de experimentos. I) Estudos de expressão gênica: O mRNA total será isolado das regiões de interesse de ratos TgF344-AD e WT e os RNAs dos genes definidos nos objetivos I e II serão quantificados usando um master mix SYBR green. O RT-PCR quantitativo será realizado utilizando o Applied Biosystems 7500 Fast System. Controles serão incluídos em cada ensaio. Os níveis de mRNA alvo serão normalizados usando  $\beta$ -actina e GAPDH como genes domésticos. Os resultados serão expressos como variação de dobra em relação ao grupo WT usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (BELLAVAR *et al.*, 2019); II) Western blotting: O tecido será lisado em uma solução contendo 4% de SDS, 2 mM de EDTA e 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8). As amostras serão separadas por SDS / PAGE (20 mg de proteína por amostra), e transferidas para membranas de nitrocelulose, que serão incubadas com anticorpos primários definidos com base nos achados de RNA-seq. Em seguida, as membranas serão incubadas com imunoglobulina anti-coelho ou anti-

camundongo conjugada com peroxidase. Os sinais de quimioluminescência serão detectados em um sistema Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare) usando um kit ECL. Esta é uma etapa importante, pois fornecerá uma estimativa dos níveis de proteína e atividade (estados de fosforilação). Nesta etapa do estudo, o grau de severidade é classificado como sem recuperação.

### **3.5. Definir a modalidade de biomarcador mais adequada**

Potenciais alvos de astrócitos definidos no objetivo específico “c” serão medidos em tecido *post-mortem* e fluido de ratos. Essa estratégia permite avaliar se esses marcadores são alvos adequados para o desenvolvimento de traçadores PET ou biomarcadores fluidos. Caracterização histológica e imunohistoquímica em tecido cerebral de ratos TgF344-AD e WT com quatro meses de idade será usada neste conjunto de experimentos. A ausência de placas A $\beta$  e a presença de oligômeros A $\beta$  serão confirmadas com a coloração com tioflavina e anticorpo anti-oligomérico (AB9234), respectivamente. Em seguida, marcadores astrocitários validados no objetivo específico “c” serão caracterizados histológica e imunohistoquimicamente. Além disso, iremos colocalizá-los com anticorpos clássicos de astrócitos, incluindo os filamentos intermediários (GFAP e Vimentina), citosólicos (S100 e ALDh111) e marcadores de proteína de membrana (GLT-1 e GLAST) (O’LEARY; MECHAWAR, 2021). Além disso, as amostras de plasma e LCR serão preparadas usando protocolo de extração em fase sólida (SPE) para enriquecimento de proteínas de frações de interesse (KORECKA *et al.*, 2014). O método SPE é usado para concentrar a amostra e melhorar os limites de detecção e eliminar as interferências da matriz (Korecka, Waligorska et al. 2014). As análises serão realizadas usando um gradiente de acetonitrila de 10% a 45% (v/v) por 12,0 min a uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min diretamente injetada em um Xevo TQ-XS Triplo Quadrupolo (Waters) operando em modo positivo. O espectrômetro de massa será configurado para isolar o precursor carregado e os pares de íons do fragmento de proteínas de interesse (KORECKA *et al.*, 2014). Para quantificação será utilizado o íon com maior intensidade. Nesta etapa do estudo, o grau de severidade é classificado como sem recuperação.

### **3.6. Caracterização longitudinal da microbiota intestinal do modelo TgF344-AD**

Amostras de fezes de cada animal WT e modelo TgF344-AD serão coletadas quando os animais alcançarem 3, 6 e 12 meses de idade. A extração de DNA das amostras fecais será realizada utilizando o kit QIAamp® PowerFecal® Pro DNA (MO BIO Laboratories, Inc.

EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A análise da qualidade e concentração de ácidos nucleicos extraídos será realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e da quantificação em NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). O sequenciamento de DNA será realizado a partir das regiões variáveis V3-V4 do gene 16S rRNA seguindo o protocolo da plataforma MinION™ (Oxford Nanopore Technologies) utilizando os seguintes primers internos (MATSUO *et al.*, 2021): 341F: 5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCCCTACGGGNGGCWGCAG-3' e 806R: 5'-ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'. A amplificação por PCR dos genes 16S rRNA será realizada usando o kit KAPA2G™ Robust HotStart ReadyMix PCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA) em um volume total de 25 µl contendo pares de primers internos (50 nM cada) e a mistura de primers externos com código de barras (3%) do PCR Barcoding Kit (SQK-PBK004; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). A reação de PCR será realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 5 ciclos de 95°C por 15s, 55°C por 15s e 72°C por 30s, 30 ciclos de 95°C por 15s, 62°C por 15s e 72°C por 30s, seguido de uma extensão final a 72°C por 1 min. O DNA amplificado será purificado usando AMPure® XP (Beckman Coulter) e quantificado por um Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Um total de 100 ng de DNA será incubado com 1 µl de adaptador “*Rapid Adapter*” em temperatura ambiente por 5 min. A biblioteca de DNA preparada (11 µl) será misturada com 34 µl de tampão de sequenciamento, 25,5 µl de esferas de carregamento e 4,5 µl de água, carregada na célula de fluxo R9.4 (FLO-MIN106; Oxford Nanopore Technologies) e sequenciada no MinION™ Mk1B. Software MINKNOW ver. 1.11.5 (Oxford Nanopore Technologies) será utilizado para a aquisição de dados. Nesta etapa do estudo, o grau de severidade não se aplica, pois serão coletadas apenas amostras de fezes dos animais.

### **3.7. Análises de bioinformática**

Para as análises de bioinformática serão utilizados o software Albacore versão 2.3.4 (Oxford Nanopore Technologies) para a seleção das bases de dados do sequenciamento MinION™ a partir de arquivos FAST5 para gerar as leituras no formato de passagem FASTQ. As sequências dos adaptadores e códigos de barras serão excluídas utilizando o fluxo de trabalho EPI2ME Fastq Barcoding ver. 3.10.4 (Oxford Nanopore Technologies). As leituras serão filtradas pelo tamanho das sequências da região V3-V4 do gene 16S rRNA de 350-600pb usando o software SeqKit versão 0.10.0 (SHEN *et al.*, 2016) com base no banco de dados

SILVA versão 132 (QUAST et al., 2013). A pontuação média de qualidade Phred será avaliada usando NanoPlot versão 1.27.0 (DE COSTER et al., 2018). Os arquivos FASTQ serão convertidos em arquivos FASTA e as análises do microbioma serão realizadas na plataforma QIIME 2™. Para a realização da predição metagenômica será utilizado o programa PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) na plataforma Galaxy versão 1.1.1 (LANGILLE et al., 2013). Um metagenoma virtual de cada amostra será gerado usando o banco de dados de abundância ortológica KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A partir dos resultados previstos do metagenoma, os dados serão agrupados em níveis hierárquicos por categorização de função. Nesta etapa do estudo, o grau de severidade não se aplica, por ser uma análise computacional.

### **3.8. Eutanásia dos animais**

De acordo com a Lei 714, de 20/06/2002 que estipula os procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras providências, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e estando ciente da Lei 11.794 de 08/10/2008 e da Resolução Normativa número 37 - Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA, todos os roedores serão eutanasiados com sobredose anestésica de isoflurano (6-9%). Previamente à eutanásia, haverá a coleta de sangue e LCR para utilização nos testes bioquímicos. A eutanásia dos animais será realizada por um experimentador com experiência prática no método de decapitação de roedores e o experimentador manterá suas luvas sempre limpas. Além disso, visando sempre manter os princípios éticos na utilização de animais em pesquisa, os animais serão mantidos em ambiente separado até serem eutanasiados individualmente na sala de experimentação. Nesta etapa do estudo, o grau de severidade é classificado como sem recuperação.

### **3.9. Cálculo do tamanho amostral**

Visando atender ao princípio “Redução” dos 3Rs (Redução, Substituição e Refinamento), o cálculo do tamanho amostral foi realizado de modo que o menor número de animais possível seja utilizado, considerando a confiabilidade dos resultados. Assim, o cálculo de amostra baseou-se nos achados recentes do grupo (ZIMMER *et al.*, 2020). Mais especificamente, calculamos 8 animais por grupo para um poder de 80% com  $\alpha < 0.05$ . Assim, serão utilizados 32 animais (8 machos transgênicos, 8 fêmeas transgênicas, 8 machos controle e 8 fêmeas controle) para os experimentos descritos nas sessões 3.2 e 3.4; e 32 animais adicionais (8 machos transgênicos, 8 fêmeas transgênicas, 8 machos controle e 8 fêmeas

controle) para os experimentos da sessão 3.5. Assim, utilizaremos no total 16 machos transgênicos de 4 meses, 16 fêmeas transgênicas de 4 meses, 16 machos WT de 4 meses e 16 fêmeas WT de 4 meses.

### **3.10. Cuidados de manutenção dos animais**

A manutenção dos animais será realizada de acordo com a Resolução Normativa número 30, de 2 de fevereiro de 2016. Os animais serão mantidos em condições padrão de biotério: ciclo claro/escuro de 12 horas controlado por fotoperíodo (ciclo claro com início às 7h e término às 19h), em temperatura constante de 22 +- 2 graus e controle de umidade. Os ratos serão acomodados em até 3 animais por caixa de policarbonato com dimensões de 41 x 34 x 16 cm forradas com maravalha. Será fornecido suprimento de ração padrão para roedores e água potável *ad libitum*.

### **3.11. Monitoramento dos animais e ponto final humanitário**

Os animais serão monitorados periodicamente pelo pesquisador durante a estadia no biotério, visando a garantia do seu bem-estar. Os sinais de alteração no comportamento normal do animal (situações não previstas) incluem: mudanças na aparência física (ex.: ferimentos, postura diferente da normal, textura do pelo, higiene, dentre outros); mudanças no peso corporal e outras relacionadas ao consumo de alimento e água; mudanças nos padrões fisiológicos (ex.: frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura corporal); mudanças no comportamento normal (ex.: vocalização anormal, inatividade, automutilação, padrão de sono, comportamento exploratório, agressivo ou anormal, dentre outros); mudanças nas respostas a estímulos (ex.: agressividade, excitabilidade, resposta aversiva à palpação da área afetada); condições patológicas, tais como pneumonia, infecção parasitária, ferimento com impossibilidade de tratamento ou qualquer outra alteração morfofuncional que acarrete algum sofrimento para o animal. Caso alguma alteração ou problema seja identificado, a depender da gravidade do caso, será realizada (1) intervenção, necessária para aliviar e monitorar possíveis complicações, visando evitar a dor, desconforto ou estresse do animal. Tais intervenções poderão incluir: promoção do conforto do animal fornecendo tratamentos de apoio (ex.: calor, higiene, fluidos, nutrição) e/ou consulta a um médico veterinário; (2) tratamento: administração de medicamentos visando a cura, a melhora dos sintomas e/ou interrupção da dor (ex.: um agente analgésico); (3) retirada do animal do projeto; (4) eutanásia humanitária (utilizando métodos recomendados) caso o bem-estar do animal estiver comprometido de forma

irreversível, sendo um meio de eliminar a dor e/ou sofrimento, o qual não pode ser controlado por meio de analgésicos, sedativos ou de outros tratamentos. O pesquisador irá agir prontamente para aliviar a dor ou sofrimento, o que pode determinar a continuação ou interrupção do projeto. Ainda, irá comunicar o responsável técnico pelo biotério sobre a situação encontrada, a fim de que sejam tomadas as medidas necessárias em caso de qualquer emergência (Fabíola Meyer – +55 51 998046721). Tais ações vão de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº 37 – Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais incluídos em atividades de ensino ou pesquisa científica e de acordo com o § 1º do art. 14 da Lei nº. 11.794, de 2008.

### **3.12. Análise estatística**

As análises estatísticas serão executadas utilizando os seguintes softwares: PAWS versão 18.0, GraphPad Prism versão 6 e MatLab versão 2014b. As análises dos dados serão por test-t ou ANOVA e o critério de significância estatística será  $p < 0,05$ . Os dados serão corrigidos por múltiplas comparações quando necessário com o teste de Bonferroni.

### **3.13. Descarte de rejeitos**

As carcaças dos animais serão devidamente recolhidas em sacos brancos e identificados para posterior recolhimento por empresa terceirizada, assim como os outros rejeitos biológicos. Todos os resíduos químicos gerados durante os procedimentos serão armazenados em frascos apropriados e identificados para posterior encaminhamento ao departamento responsável da UFRGS. O descarte de resíduos se adequará às réguas do Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) e da Comissão de Gestão Ambiental do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Todos os rejeitos químicos gerados durante a realização deste projeto serão armazenados em frascos apropriados e devidamente identificados para posterior encaminhamento ao CGTRQ do Instituto de Química da UFRGS. O material perfuro-cortante será acondicionado em caixas para descarte especial (tipo *Descarpack*®). Materiais como luvas, eppendorfs, Falcons e demais materiais descartáveis que tenham entrado em contato com amostras biológicas serão destinados ao lixo biológico, sendo acondicionados em sacos brancos devidamente identificados.

## **4. Considerações Éticas e Biossegurança**

O projeto deve ser aprovado em termos de ética e metodologia pelo Comitê de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Comitê de Pesquisa em Ciências Básicas da Saúde e Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Toda a manipulação animal e eutanásia serão realizadas com base na Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa 37, de 15 de fevereiro de 2018. Equipamentos de proteção individual serão utilizados de maneira apropriada de acordo com as medidas de biossegurança adotadas seguem as diretrizes da Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Federal do Rio Grande do Sul — CIBio/UFRGS.

## 5. Local de realização do projeto e prazo de execução

As atividades do projeto serão realizadas nos Departamentos de Bioquímica e Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. O prazo previsto de execução do presente projeto é de 36 meses.

## 6. Cronograma

**Início previsto: 01/02/2023**

Mês/Atividade	1-3	4-6	7-9	10-13	14-17	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36
<b>Aprovação no comitê de ética</b>										
Submissão e aprovação no CEUA	X	X	X	X	X	X				
<b>Isolamento e caracterização dos astrócitos</b>										
Isolamento de astrócitos por FACS		X	X	X	X	X				
Extração de RNA e síntese de cDNA		X	X	X	X	X				
Caracterização por qRT-PCR		X	X	X	X	X				
Sequenciamento de RNA			X	X	X	X	X	X		
Análise de genes diferencialmente expressos e enriquecimento funcional						X	X	X	X	X
<b>Caracterização da microbiota</b>										
Coleta de amostras fecais e extração de DNA	X	X		X						
Sequenciamento				X	X	X				
Análises de bioinformática						X	X	X		
Análises estatísticas									X	
<b>Avaliação histoquímica e de biomarcadores</b>										
Obtenção das fatias de tecido cortical		X	X	X	X	X				
Imunomarcagem com os anticorpos de interesse		X	X	X	X	X	X	X	X	
Obtenção das imagens em microscópio confocal					X	X	X	X	X	X
Análise e quantificação das imagens obtidas						X	X	X	X	X
Análise de fluidos biológicos em Triplo Quadrupolo						X	X	X	X	

Revisão, análise de dados e seminários										
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise de resultados			X	X	X	X	X	X	X	X
Apresentação dos resultados em congressos da área				X	X	X	X	X	X	X
Redação de artigos científicos							X	X	X	X

## 7. Referências bibliográficas

ANCKAERTS, Cynthia *et al.* Early functional connectivity deficits and progressive microstructural alterations in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's Disease: A longitudinal MRI study.

**Neurobiology of disease**, [s. l.], v. 124, p. 93–107, 2019.

BELLAVER, Bruna *et al.* Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 80, p. 879–888, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915911930039X>.

BERKOWITZ, Laura E *et al.* Progressive impairment of directional and spatially precise trajectories by TgF344-Alzheimer's disease rats in the Morris Water Task. **Scientific reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

CARTER, Stephen F *et al.* Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease. **Trends in molecular medicine**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 77–95, 2019.

CATTANEO, Annamaria *et al.* Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 49, p. 60–68, 2017.

CHÉTELAT, Gaël *et al.* Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 951–962, 2020.

COHEN, Robert M *et al.* A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric  $\text{A}\beta$ , and frank neuronal loss. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 33, n. 15, p. 6245–6256, 2013.

CRYAN, John F. *et al.* The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019.

DAIANU, Madelaine *et al.* Multi-shell hybrid diffusion imaging (HYDI) at 7 Tesla in TgF344-AD transgenic alzheimer rats. **PloS one**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. e0145205, 2015.

DAS, Bhabatosh; NAIR, G Balakrish. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. **Journal of biosciences**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 1–8, 2019.

DE COSTER, Wouter *et al.* NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 34, n. 15, p. 2666–2669, 2018.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 77–89, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>.

ESCARTIN, Carole *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.

FONTANA, Igor C *et al.* Amyloid- $\beta$  oligomers in cellular models of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 348–369, 2020.

G. KANTZER, Christina *et al.* Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. **Glia**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 990–1004, 2017.

HABIB, Naomi *et al.* Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 701–706, 2020.

HENEKA, Michael T *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.

HILL, James M; LUKIW, Walter J. **Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD)**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2015.

HONIG, Lawrence S *et al.* Trial of solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 378, n. 4, p. 321–330, 2018.

JACK JR, Clifford R *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. **The lancet neurology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 207–216, 2013.

JÄKEL, Sarah; DIMOU, Leda. Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. **Frontiers in cellular neuroscience**, [s. l.], v. 11, p. 24, 2017.

JOO, Illsung L *et al.* Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

KORECKA, Magdalena *et al.* Qualification of a surrogate matrix-based absolute quantification method for amyloid- $\beta$  42 in human cerebrospinal fluid using 2D UPLC-tandem mass spectrometry. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 441–451, 2014.

KUMAR, Anil; SINGH, Arti. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological reports**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015.

LANGILLE, Morgan G I *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 814–821, 2013.  
Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.

LOVE, Michael I; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 550, 2014.  
Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

MATSUO, Yoshiyuki *et al.* Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. **BMC microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021.

MORAIS, Livia H; SCHREIBER, Henry L; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 241–255, 2021.

O'LEARY, Liam Anuj; MECHAWAR, Naguib. Implication of cerebral astrocytes in major depression: a review of fine neuroanatomical evidence in humans. **Glia**, [s. l.], v. 69, n. 9, p. 2077–2099, 2021.

OSTROWITZKI, Susanne *et al.* A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. **Alzheimer's research & therapy**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–15, 2017.

PATRO, Rob *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature methods**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 417–419, 2017.

PENTKOWSKI, Nathan S *et al.* Anxiety-like behavior as an early endophenotype in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, [s. l.], v. 61, p. 169–176, 2018.

POLANCO, Juan Carlos *et al.* Amyloid- $\beta$  and tau complexity—towards improved biomarkers and targeted therapies. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 22–39, 2018.

QUAST, Christian *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

- SALLOWAY, Stephen *et al.* Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 370, n. 4, p. 322–333, 2014.
- SANDHU, Kiran *et al.* Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. **Translational Research**, [s. l.], v. 179, p. 223–244, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.10.002>.
- SHEN, Wei *et al.* SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. **PLoS one**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. e0163962, 2016.
- SHENG, Can *et al.* Combination of gut microbiota and plasma amyloid- $\beta$  as a potential index for identifying preclinical Alzheimer's disease: a cross-sectional analysis from the SILCODE study. **Alzheimer's research & therapy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–15, 2022.
- SONESON, Charlotte; LOVE, Michael I; ROBINSON, Mark D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. **F1000Research**, [s. l.], v. 4, 2015.
- SOUZA, Débora G *et al.* The astrocyte biochemistry. *In:* , 2019. **Seminars in cell & developmental biology**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 142–150.
- TSAI, Yuchun *et al.* Ocular changes in TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. **Investigative ophthalmology & visual science**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 523–534, 2014.
- UHLMANN, Ruth E *et al.* Acute targeting of pre-amyloid seeds in transgenic mice reduces Alzheimer-like pathology later in life. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1580–1588, 2020.
- WANG, Xiang-qian *et al.* Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease. **RSC advances**, [s. l.], v. 8, n. 74, p. 42380–42389, 2018.
- WU, Tiffany *et al.* Complement C3 is activated in human AD brain and is required for neurodegeneration in mouse models of amyloidosis and tauopathy. **Cell reports**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 2111–2123, 2019.
- YU, Guangchuang *et al.* ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 284–287, 2012.
- YU, Guangchuang *et al.* GOSemSim: an R package for measuring semantic similarity among GO terms and gene products. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 976–978, 2010.
- ZHAO, Yuhai; LUKIW, Walter J. Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). **Journal of nature and science**, [s. l.], v. 1, n. 7, 2015.

ZIMMER, Eduardo R *et al.* [18F] FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 393–395, 2017.

ZIMMER, Eduardo R *et al.* Amyloid pathology changes hippocampal GFAP-positive astrocytes phenotype: Molecular and cell biology/APP/Abeta/amyloid. **Alzheimer's & Dementia**, [s. l.], v. 16, p. e042027, 2020.