

RAQUEL DE SOUZA LIMA

**Efeito das chaperonas BAG2 e DNAJB6 na degradação proteica em
modelos celulares de doenças neurodegenerativas**

**Effects of BAG2 and DNAJB6 chaperones on protein degradation in
cell models of neurodegenerative diseases**

São Paulo

2019

RAQUEL DE SOUZA LIMA

**Efeito das chaperonas BAG2 e DNAJB6 na degradação proteica em
modelos celulares de doenças neurodegenerativas**

**Effects of BAG2 and DNAJB6 chaperones on protein degradation in
cell models of neurodegenerative diseases**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências pelo Programa de pós-graduação em
Ciências Biológicas - Biologia Genética.

Orientadora: Profª Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari.

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Carneiro Carrettiero.

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

De Souza Lima, Raquel
Efeito das chaperonas BAG2 e DNAJB6 na
degradação proteica em modelos celulares
de doenças neurodegenerativas
131p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Neurodegeneração. 2.BAG2 3.
DNAJB6 4. Autofagia 5.Chaperonas I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Merari F. R. Ferrari
Orientadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãs,
fontes da minha força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu gostaria de agradecer à minha querida orientadora professora Dr^a Merari F. R. Ferrari, vulgo Mera! Obrigada por ter me aceitado no laboratório de braços abertos, mesmo frente às dificuldades que uma graduação associada com uma jornada de 40 horas de trabalho traz no momento de inserção no universo científico. Eu agradeço de coração pelos ensinamentos, conversas, pelo incentivo para que eu saísse do país e tivesse essa experiência profissional e acadêmica ainda no mestrado. Obrigada de verdade! Fico muito feliz em ser a sua primeira aluna de mestrado no programa do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do nosso Instituto.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma me incentivaram durante a minha caminhada na profissão escolhida e também ao professor Daniel C. Carrettiero da UFABC pela co-orientação nesta pesquisa. Aqui eu estendo um agradecimento especial ao professor Renato Barboza da UNIFESP: obrigada pela companhia no laboratório e pelas conversas em torno de uma boa xícara de café. Obrigadíssima!

Aos membros da banca avaliadora agradeço a presença e o tempo dispendido na análise deste estudo.

Gostaria de agradecer também aos maravilhosos especialistas e técnicos os quais estive em contato durante a realização deste projeto: Waldir Caldeira, Thiago Alegria, Sandra Muxel, Teresa Auricchio e um obrigado especial para a Andressa Sakugawa! Muito obrigada Andressa pela ajuda no laboratório, pelos cafés, pelas conversas científicas sempre recheadas de ideias relevantes e pela companhia na bancada neste último ano de mestrado. Muito obrigada flor! Seu caminho na ciência é e será gigante!

Aos colegas de trabalho Karla Pacheco de Melo (brilha minha linda, brilha!), Rafaela Regina, Michael Fernandes, Rodrigo Chaves, Amajad Iqbal, Nathan Cogliatti, Natália Teruel (boa sorte nas terras canadenses!), Karen Rubim e tantos outros pelo ambiente descontraído, pela ajuda nos experimentos, e pelas conversas. Vocês são um arraso!

Gostaria de deixar registrado um obrigado especial para a pessoa que mudou a minha forma de ver a ciência e me fez apostar nesta área, que com certeza faz parte do hall de paixões da minha vida, e que eu tenho certeza de que me arrependeria se não tivesse ao menos tentado realizar essa empreitada: obrigada Thaiany Quevedo Melo, minha querida Thay! Obrigada pelas conversas que eram para durar 10 minutos e acabaram virando 6 horas durante

a minha preparação para a qualificação. Obrigada por me incentivar em todos os momentos! Obrigada por me mostrar a minha evolução, mesmo que pequeninha, a apontar os meus pontos fracos para que eu continuasse sempre a melhorar e obrigada por ser a minha amiga. Tenho orgulho de ser a sua aluninha e tenho certeza que o seu futuro nessa área tão linda que você escolheu será no mínimo brilhante! Aproveito e mando um abraço mara para o querido Jorgi. Vocês são incríveis!

Regarding my internship in the Netherlands at the University of Medical Centre Groningen, I would like to acknowledge:

Harm H. Kampinga. Dear Harrie, thank you for giving me the opportunity to work with your amazing team! I have learned so much with this experience, with the lab work and meetings, with our conversations about my project, and also with the observation of how you deal with the human aspect within your lab. Thank you!

Steven Bergink, thank you so much for your help, also for the time spent discussing my data and for always be friendly and patient with me.

The Kampinga and Steven's lab team, an amazing group of people (Elizabeth, Woulter, Els, Wu-Dy, Niels, and Hannah) who helped me a lot during my time in the lab. A special thanks for my Brazilian group of friends- the funniest girls Carol and Rafa (valeu amigasss!)- plus the most amazing Indian guy in the entire world! Dear Abinho! Thank you for your friendship and Megah's! I'm waiting for you guys here in Brazil (or in Costa Rica, who knows). Also a special thanks to Maria, Kampinga's lab technician. Thank you Maria for your hospitality, for your kindness, help, and care. You definitely made my stay in the Netherlands happier. I always talk about you to my family and I'm also waiting for you and your dear husband to come to visit me here in Sao Paulo. Thank you from all my heart.

E muito obrigada Eduardo Mattos! Você arrasa meu querido! Obrigada por ter me ensinado tanto em dois meses, sempre com paciência, carinho, propriedade e cuidado. Você é um excelente professor. E um obrigado maior ainda pela sua paciência em corrigir o meu *report* (uma tarefa árdua que durou alguns meses!). Senti que cresci muito ao longo do ano de 2018 como cientista e uma boa parte deste mérito é seu. Obrigada de coração.

Por fim, eu gostaria de agradecer as pessoas mais especiais da minha vida: aos meus pais queridos, os melhores, mais amorosos e lutadores pais deste planeta (Israel e Sônia), as minhas irmãs maravilhosas e sinceras (Bárbara, Dakla, Sara e Rayane) e ao meu amor da

vida, Bernardo Jiminez. Muito obrigada por sempre me incentivarem, me lembrarem dos meus sonhos e por serem os meus maiores exemplos. Essa conquista também é de vocês.

Às instituições de fomento as quais permitiram a realização deste trabalho e principalmente forneceram subsídios para possibilitar minha formação acadêmica, deixo aqui minha demonstração de gratidão.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP

Processos: 2016/04409-9 (bolsa de Mestrado), 2017/24722-6 (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE)), 2015/18961-2 (auxílio à pesquisa).

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
APOIO FINANCEIRO	viii
ÍNDICE	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
<i>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....</i>	<i>1</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Envelhecimento e doenças neurodegenerativas.....	1
1.2. Doenças neurodegenerativas e agregação proteica.....	2
1.3. O Sistema de controle de qualidade proteico e as doenças neurodegenerativas.....	10
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Gerais	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
<i>CAPÍTULO II – ANÁLISE DO PAPEL DA CO-CHAPERONA BAG2 SOBRE A AUTOFAGIA E A MITOFAGIA EM MODELO DE AGREGAÇÃO PROTEICA INDUZIDA POR ROTENONA</i>	<i>22</i>
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Modelo celular de neurodegeneração esporádica	25
2.2. Caracterização das culturas	27
2.3. Exposição das células em cultura à rotenona, cloroquina e rapamicina.....	28
2.4. Western Blot.....	29
2.5. Fluxo autofágico.....	30
2.6. Análise do papel da BAG2 sobre a autofagia.....	30
2.7. Análise estatística	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Caracterização e padronizações.....	31
3.1.1. Caracterização da cultura primária de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus	31

3.1.2.	Caracterização da cultura de células de linhagem SH-SY5Y	33
3.1.3.	Padronizações para a análise do processo autofágico	34
3.2.	Análise da autofagia e da superexpressão da co-chaperona BAG2 em cultura primária de células das regiões do hipocampo, substância negra e locus coeruleus	41
3.2.1.	Hipocampo	42
3.2.2.	Substância Negra e Locus Coeruleus	50
3.2.3.	Células da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y	58
4.	CONCLUSÃO	70
5.	FIGURA SUPLEMENTAR.....	72
<i>CAPÍTULO III – EFEITO DAS PROTEÍNAS DNAJs, EM ESPECIAL A DNAJB6, SOBRE A PROTEÍNA α-SINUCLÉINA SELVAGEM E MUTANTE EM CÉLULAS HEK293T E SH-SY5Y.....</i>		73
1.	INTRODUÇÃO	73
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1.	Cultura celular	74
2.2.	Plasmídeos utilizados.....	74
2.3.	Diferenciação neuronal das células SH-SY5Y	74
2.4.	Determinação da agregação da α -sin em células HEK293T e SH-SY5Y	75
2.4.1.	Protocolo de fracionamento proteico	75
2.4.2.	Ensaio Filter trap.....	76
2.4.3.	Inibição do proteassomo e autofagia.....	76
2.5.	Análise estatística	77
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1.	Efeitos da DNAJB6 sobre a expressão da proteína α -sinucleína.....	77
3.2.	Inibição da autofagia em diferentes modelos celulares.....	79
3.3.	Efeitos da chaperona DNAJB6b sobre a α -sinucleína com a presença de uma arginina na porção N-terminal	81
3.4.	A região rica em S/T da DNAJB6 é necessária para a degradação da α -sinucleína-arginina-GFP.....	84
3.5.	Efeito de outros membros do grupo DNAJs/HSP40 nos níveis proteicos de α -sinucleína-arginina-GFP.....	86
3.6.	Inibição do proteassomo com bortezomida e MG132 em células HEK293T para indução da agregação de α -sinucleína-arginina-GFP	87
4.	CONCLUSÃO	93
5.	FIGURAS SUPLEMENTARES.....	94
.....		94
<i>CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES FINAIS</i>		98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		100

ANEXO I	108
BIOGRAFIA	109
ARTIGOS EM ELABORAÇÃO	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes associados com a Doença de Parkinson.

Tabela 2: Diluição e condições de incubação padronizadas para os anticorpos primários utilizados.

Tabela 3: Caracterização da cultura de células de hipocampo, locus coeruleus e substância negra.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da proteína α -sinucleína.

Figura 2: Localização cromossômica e estrutura da proteína associada ao microtúbulo Tau.

Figura 3: Fosforilação da proteína tau é fundamental para a estabilização dos microtúbulos.

Figura 4: Processamento da proteína precursora amiloide (APP).

Figura 5: Respostas celulares à presença de proteínas danificadas.

Figura 6: Consequências celulares da inibição do proteassomo.

Figura 7: A via autofágica.

Figura 8: Modelo canônico da maquinaria da HSP70.

Figura 9: A co-chaperona BAG2 e suas interações proteicas.

Figura 10: Efeito do tratamento com diferentes concentrações de rotenona em cultura primária de hipocampo, locus coeruleus e substância negra

Figura 11: Imagens representativas das áreas da região do encéfalo de ratos que foram dissecadas (quadro azul) e utilizadas na elaboração da presente pesquisa.

Figura 12 Cultura celular primária de neurônios e células da glia, 11 dias após plaqueamento.

Figura 13: Caracterização da cultura primária de células da glia e neurônios.

Figura 14: Caracterização da cultura de células da linhagem SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF.

Figura 15: Teste de viabilidade celular com azul de Tripán para diferentes concentrações de cloroquina em cultura de células primária do hipocampo.

Figura 16: Detecção da expressão das proteínas Beclina-1 e p62 em cultura de hipocampo exposta a diferentes concentrações de cloroquina.

Figura 17: Teste de viabilidade celular com azul de Tripán para diferentes concentrações de rapamicina em cultura de células primária de hipocampo, substância negra e locus coeruleus.

Figura 18: Padronização da transfecção com plasmídeo eGFPLC3mCherry em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis.

Figura 19: Padronização da transfecção com plasmídeo eGFPBAG2-Flag em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis.

Figura 20: Imagens digitais representativas da transfecção com plasmídeo eGFPBAG2-Flag ou GFP em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis.

Figura 21: Esquema ilustrativo do protocolo experimental das culturas de células expostas a rotenona (0,3nM e 0,5nM), cloroquina (3 μ M) e rapamicina (100nM).

Figura 22: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células do hipocampo expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3 μ M de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas.

Figura 23: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1, p62 e LC3, em cultura primária de células do hipocampo.

Figura 24: Expressão das proteínas p62, Beclina-1 e LC3 em cultura primária de células hipocampo transfectadas com BAG-2.

Figura 25: Expressão de proteínas da autofagia e mitofagia em cultura primária de células do hipocampo.

Figura 26: Expressão das proteínas pTau e tau total em cultura primária de células do hipocampo transfectadas com eGFPBAG2 e tratadas com 1nM rotenona por 48 horas.

Figura 27: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células de substância negra expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3 μ M de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas.

Figura 28: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células de locus coeruleus expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3 μ M de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas

Figura 29: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1e p62, em cultura primária de células da substância negra.

Figura 30: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1 e p62, em cultura primária de células do locus coeruleus.

Figura 31: Expressão das proteínas p62 e LC3 em cultura primária de células de substância negra e p62 em células do locus coeruleus transfectadas com BAG-2.

Figura 32: Níveis proteicos de pTau e tau total em células SH-SY5Y não diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF.

Figura 33: Níveis de BAG2 endógena em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF.

Figura 34: Análise dos níveis de proteínas associadas com a mitofagia em células SH-SY5Y não diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico.

Figura 35: Níveis da proteína LC3 células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico.

Figura 36: Análise dos níveis de proteínas associadas à autofagia e pTau em células SH-SY5Y não diferenciadas.

Figura 37: Análise dos níveis de proteínas associadas a autofagia e pTau em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e BDNF.

Figura 38: Expressão da proteína α -sinucleína selvagem e com a mutação A53T em células SH-SY5Y não diferenciadas transfectadas com eGFPBAG2flag.

Figura 39: Expressão da proteína α -sinucleína selvagem e com a mutação A53T em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e transfectadas com eGFPBAG2flag.

Figura 40: Protocolo de fracionamento proteico com diferentes detergentes.

Figura 41: DNAJB6b selvagem reduz os níveis proteicos de α -sin-GFP após 48 horas em células HEK293T e SH-SY5Y não-diferenciadas.

Figura 42: Efeito da DNAJB6 sobre os níveis proteicos de α -sin-arginina-GFP.

Figura 43: Diminuição nos níveis de α -sin(WT)-arginina-GFP e α -sin(A53T)-arginina-GFP em células superexpressando DNAJB6b.

Figura 44: Mutantes da proteína DNAJB6b são incapazes de reduzir os níveis proteicos de α -Sin(WT)-arginina-GFP em células HEK293T

Figura 45: DNAJB6b WT é a DNAJ mais eficiente em reduzir os níveis da proteína α -sin(A53T)-arginina-GFP em células HEK293T.

Figura 46: Inibição do proteassomo com bortezomida ou MG132 em células HEK293T transfectadas com os constructos α -sin-arginina-GFP

Figura 47: Efeito da inibição do proteassomo pela ação da bortezomida em células HEK293T superexpressando somente a α -sin-arginina-GFP ou em combinação com V5-DNAJB6b.

Figura S1: Revelação do teste de reatividade da proteína PINK-1.

Figura S2: Protocolo de fracionamento proteico com inibição da autofagia.

Figura S3: Inibição da autofagia por 12 e 24 horas.

Figura S4: Protocolo de diferenciação de células SH-SY5Y expressando, de forma transiente, constructos de α -sin.

Figura S5: Níveis de α -sin-arginina-GFP em células HEK293T selvagem (WT) ou *knouckot* (KO) para DNAJB6.

Figura S6: Padrões de solubilização de células HEK293T superexpressando α -sin-arginina-GFP sobre inibição do proteassomo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD Doença de Alzheimer

ALS Esclerose lateral amiotrófica

APP Proteína precursora amiloide

ATP Adenosina trifosfato

A β Peptídeo β -amilóide

BAG *Bcl-associated anthogene*

Bcl-2 Célula B de linfoma 2

BDNF Fator neurotrófico derivado do encéfalo

GSK-3 β Glicogênio sintase quinase 3

HD Doença de Huntington

HSPs *Heat shock proteins*

LDH Lactato desidrogenase

MAP Proteínas associadas ao microtúbulo

MAPT *microtuble-associated protein Tau gene*

MPP+ 1-methyl-4-phenylpyridinium

m-TOR *Mamalian target of rapamicin*

NAC Componente não-amilóide

NEFs Fatores de troca de nucleotídeos)

PD Doença de Parkinson

PQC Sistema de controle de qualidade proteica

pTau Proteína tau hiperfosforilada

ROS Espécie reativa de oxigênio

S/T Serina/treonina

SNAREs *Soluble NSF attachment receptor*

SNC Sistema Nervoso Central

TH Tirosina hidroxilase

UPS Sistema ubiquitina-proteassomo

WT *Wild-type*

α -sin α -sinucleína

RESUMO

O envelhecimento é uma questão de preocupação mundial e o entendimento dos eventos celulares decorrentes deste processo apresentam grande importância no estudo de patologias associadas à idade, dentre elas, as doenças neurodegenerativas. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o processo autofágico durante o curso de doenças neurodegenerativas, assim como verificar o papel das chaperonas BAG2 e DNAJB6 sobre a modulação da degradação de substratos específicos em diferentes modelos celulares.

A análise das proteínas autofágicas em cultura de células primárias expostas ao tratamento com rotenona apontou para um cenário de disfunção autofágica anterior à agregação proteica em células do hipocampo. A análise de células da linhagem SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF revelou uma disfunção na proteína tau com o tratamento com rotenona, assim como uma perturbação nas proteínas Pink-1 e Parkina, fundamentais no processo de degradação mitocondrial.

As co-chaperonas são fundamentais na seleção de substratos e no seu correto direcionamento para diferentes vias, como para degradação. A transfecção com a co-chaperona BAG2 – que transita entre os sistemas proteassomal e lisossomal- levou ao aumento dos níveis da proteína p62/SQSTM1 na região do hipocampo e do locus coeruleus, o que pode indicar um papel desta co-chaperona na modulação da degradação seletiva de substratos específicos. Curiosamente, um resultado oposto foi obtido para as células SH-SY5Y diferenciadas, o que aponta para o cenário em que a co-chaperona BAG2 apresenta papéis e funções específicos para o tipo celular, substrato proteico e região cerebral em que está sendo expressa. Para testar se esta hipótese também era válida para diferentes substratos, um teste com a proteína α -sinucleína selvagem (WT) e com a mutação de ponto (A53T) foi realizado. A superexpressão de BAG2 foi capaz de reduzir os níveis proteicos da proteína α -sinucleína A53T somente nas células diferenciadas, o que reforça um papel diferencial da BAG2 em células neuronais. A chaperona DNAJB6, por sua vez, foi eficiente em diminuir os níveis proteicos da α -sinucleína marcada com uma arginina na porção N-terminal, o que aponta um papel desta chaperona na via de degradação dependente da porção N-terminal, que depende da região rica em serina/treonina (S/T) da DNAJB6 para o reconhecimento do substrato.

Descritores: 1. Neurodegeneração. 2.BAG2 3. DNAJB6 4. Autofagia 5.Chaperonas

ABSTRACT

Aging is a worldwide issue and the understanding of the molecular and cellular events associated to this process are crucial for the study of age-related diseases, such as neurodegenerative disorders. The aim of this project was to evaluate the autophagy process in the sporadic neurodegenerative diseases, and also to verify the modulatory aspects of BAG2 and DNAJB6 chaperones upon degradation of specific substrates in different cell models.

Rotenone treatment led to autophagy dysfunction prior protein aggregation in hippocampal cells. Experiments using SH-SY5Y cells revealed that rotenone treatment caused tau protein dysfunction associated to a decrease in Pink1 and Parkin protein levels that are fundamental for mitochondrial degradation.

Chaperones are an essential component of protein quality control systems. Chaperones act to facilitate protein folding, transport across membranes, remodeling, disaggregation, refolding and/or degradation of clients. BAG2 transfection increased p52/SQSTM1 protein levels in cells from hippocampus and locus coeruleus, which may indicate a role of this co-chaperone to specific substrates degradation, interestingly; an opposite result was achieved with the SH-SY5Y differentiated cells, suggesting that BAG2 presents different functions depending on the region, cell type and substrate analyzed. To verify this hypothesis, BAG2 was co-transfected with the α -synuclein (wild-type, and the A53T mutant) in SH-SY5Y cells. BAG2 overexpression was able to decrease only the A53T protein levels in the differentiated cells, supporting the different role of BAG2 in neuron-like cells. DNAJB6 chaperone was efficient in modulating α -synuclein protein levels modified with an arginine in the N-terminus region of the protein. This specific result points to a role of the DNAJB6 chaperone in the N-end rule pathway together with the importance of the S/T rich region of the DNAJB6 to the substrate recognition.

Descriptors: 1. Neurodegeneration. 2. BAG2. 3. DNAJB6. 4. Autophagy. 5. Chaperones.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

I. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento e doenças neurodegenerativas

Sabe-se que o envelhecimento é um processo complexo, influenciado por diversos fatores, que culminam em inúmeras modificações fisiológicas. No Sistema Nervoso Central (SNC) há uma deterioração lenta do cérebro, declínio funcional e perda da memória (Donmez, 2013). Tais variações são dependentes de alguns fatores, dentre eles, estilo de vida, doenças e condições sociais e econômicas (Rommel Almeida Fechine, 2012).

A questão do envelhecimento é uma preocupação mundial que afeta tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. As Organizações Unidas (ONU - <http://www.un.org/en/globalissues/ageing/links.shtml>) salientam que o número de indivíduos com 60 anos ou mais deve alcançar dois bilhões em 2050. Logo, é impossível negar que o envelhecimento, e todo o processo envolvido, são de grande importância para o desenvolvimento de políticas públicas para melhor lidar com este fenômeno, assim como para o entendimento das modificações fisiológicas e celulares decorrentes da senescência e do desenvolvimento de patologias associadas à idade.

Em poucas palavras, o envelhecimento pode ser visto como uma manifestação do acúmulo de danos celulares. Existem nove candidatos utilizados como marcadores moleculares do envelhecimento: comunicação intracelular alterada, instabilidade genômica, esgotamento de células-tronco, encurtamento telomérico, alterações epigenéticas, senescência celular, disfunção mitocondrial, perda da proteostase e distúrbios no sensor de nutrientes (López-Otín et al., 2013).

Inúmeras modificações fisiológicas ocorrem ao longo do envelhecimento. Especificamente no SNC tem-se uma redução do número de neurônios, redução da intensidade dos reflexos, restrição das respostas motoras dentre outras modificações (Rommel Almeida Fechine, 2012), que são consideradas normais e acometem todos os indivíduos, modificações estas que também são compartilhadas, em diferentes níveis de gravidade, com as doenças neurodegenerativas. Uma meta-análise de 47 estudos epidemiológicos envolvendo a doença de Parkinson (PD) entre os anos de 1985 e 2010 demonstrou que a prevalência da

doença aumenta em aproximadamente 10 vezes entre as idades de 50 e 80 anos (Pringsheim et al., 2014). O envelhecimento é considerado, portanto, um dos fatores de risco associados ao surgimento de doenças neurodegenerativas. As evidências, cada vez mais fortes, mostrando a relação entre o envelhecimento e o aumento da susceptibilidade a diferentes doenças originou o termo denominado “doenças associadas ao envelhecimento”, que abrange inúmeras doenças que apresentam o envelhecimento como um dos principais fatores de risco, como: câncer, osteoporose, osteoartrite, diabetes, aterosclerose, osteoartrite e doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (PD) e Alzheimer (AD) (World Health Organization, 2011), que serão abordadas em mais detalhes a seguir.

1.2. Doenças neurodegenerativas e agregação proteica

Uma variedade enorme de doenças e processos fisiológicos são caracterizados pelo acúmulo de proteínas no meio intra ou extracelular (Grune et al., 2004). A oxidação de proteínas resulta em alterações nas estruturas terciárias que promovem a agregação proteica e a formação de placas. O processo de agregação, no entanto, é lento, uma vez que exige um complexo processo de interações intermoleculares (Grune et al., 2004). Ross e Poirier (2004), afirmam que doenças neurodegenerativas esporádicas, isto é, que não apresentam um componente familiar relacionado e estão associadas ao envelhecimento, que é acompanhado por modificações oxidativas nas proteínas.

Proteínas funcionais geralmente apresentam estruturas tridimensionais bem definidas. Problemas na conformação proteica, que são mais comuns ao longo do processo de envelhecimento, podem atuar gerando proteínas aberrantes que são propensas à agregação. Trzesniewska et al., (2004) afirmam que, durante o envelhecimento, temos a formação natural de agregados contendo diferentes tipos de proteínas, como: proteína tau hiperfosforilada (pTau), emaranhados neurofibrilares, peptídeo β - amiloide ($A\beta$) e α -sinucleína (α -sin).

A importância dos agregados está intimamente associada com as alterações causadas pela sua presença no ambiente celular ou tecidual. Os agregados proteicos podem perturbar as funções celulares e servir como sítios para a agregação de outras proteínas não relacionadas (Squier, 2001). Estas estruturas são essencialmente insolúveis e metabolicamente instáveis sob condições fisiológicas normais, logo, os agregados introduzem um novo elemento para o metabolismo celular (Grune et al., 2004). É consenso que os agregados proteicos são

característicos de inúmeros processos patológicos, como ocorre nas doenças neurodegenerativas.

Além da PD e da AD, já citadas anteriormente, a esclerose lateral amiotrófica (ALS) e doença de Huntington (HD) são exemplos de doenças no SNC que apresentam interações proteicas anormais (Ross and Poirier, 2004). As doenças citadas apresentam depósitos proteicos característicos, podendo ser citoplasmáticos, extracelulares ou nucleares.

Evidências mais recentes indicam que os efeitos neurotóxicos dos oligômeros proteicos são mais pronunciados do que aquele atribuído aos agregados, uma vez que os efeitos celulares não estão associados unicamente à presença de inclusões insolúveis (Haass and Selkoe, 2007; Sánchez et al., 2003). Oligômeros solúveis são definidos por Haass & Selkoe (2007), como junções de peptídeos amilóides que não precipitam em fluidos fisiológicos após sofrerem centrifugação. Os oligômeros podem unir-se a outras macromoléculas ou membranas celulares e tornarem-se insolúveis.

A questão principal é que os oligômeros são capazes de difundir-se até as fendas sinápticas, o que os tornam, em teoria, maiores candidatos na indução de disfunções sinápticas do que as placas formadas pelos agregados (Haass and Selkoe, 2007). Outro fator relevante é o de que a neurotoxicidade obtida *in vitro* é melhor reproduzida pelos oligômeros e não por polímeros das proteínas com as mutações estudadas (Gispert-Sanchez and Auburger, 2006). Os oligômeros, no caso, apresentariam um papel principal durante os eventos iniciais nas doenças neurodegenerativas. Convém ressaltar, no entanto, que a relação causal dos oligômeros ou dos agregados com estas doenças ainda não está bem elucidada.

Na PD há a morte de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra. Em 2018, aproximadamente 10 milhões de pessoas foram diagnosticadas com a doença no mundo, o que corresponde a 2% da população acima de 60 anos (Cabello et al., 2002), ressaltando a importância desta patologia para o cenário mundial. Como lesão celular característica na PD, temos os corpos de Lewy que contém depósitos da proteína α -sin e também pode incluir neurofilamentos e outras proteínas (Ross and Poirier, 2004).

A maioria dos casos de PD é esporádica, isto é, não se sabe a origem da doença, no entanto, uma fração menor dos casos é de origem familiar e implica em susceptibilidade genética. Entre os casos familiares, mutações em diferentes genes podem levar ao mesmo fenótipo, como mutações no gene da *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2- (Hasegawa and

Kowa, 1997; Zimprich et al., 2004)), parkina (PARK2 – (Matsumine et al., 1997)), α -sin (gene SNCA), dentre outros (Tabela 1).

Tabela 1: Genes associados com a Doença de Parkinson. Modificado de (Deng et al., 2018; Klein and Westenberger, 2012).

Locus (OMIM)	Localização	Forma de herança	Nome do gene
PARK1 (168601)	4q21-22	Autossômica dominante	SNCA
PARK2 (600116)	6q25.2-q27	Autossômica recessiva	Parkina
PARK3 (602404)	2p13	Autossômica dominante	Não conhecido
PARK4 (605543)	4q21-q23	Autossômica dominante	SNCA
PARK5 (613643)	4p13	Autossômica dominante	UCHL1
PARK6 (605909)	1p35-p36	Autossômica recessiva	PINK1
PARK 7 (606324)	1p36	Autossômica recessiva	DJ-1
PARK8 (607060)	12q12	Autossômica dominante	LRRK2
PARK9 (606693)	1p36	Autossômica recessiva	ATP13A2
PARK10 (606852)	1p32	Fator de risco	Não conhecido
PARK11 (607688)	2q36-27	Autossômica dominante	Não conhecido
PARK12 (300557)	X-q21-q25	Fator de risco	Não conhecido
PARK13 (610297)	2p12	Autossômico dominante ou fator de risco	HTRA2
PARK14 (612593)	22q13.1	Autossômica recessiva	PLA2G6
PARK15 (260300)	22q12-q13	Autossômica recessiva	FBX07
PARK16 (613164)	1q32	Fator de risco	Não conhecido
PARK17 (614203)	16q11.2	Autossômica dominante	VPS35
PARK18 (614251)	3q27.1	Autossômica dominante	EIF4G1
PARK19 (615528)	1p31.3	Autossômica recessiva	DNAJC6
PARK20 (615530)	21q22.1	Autossômica recessiva	SYNJ1
PARK21 (616361)	20p13	Autossômica dominante	TMEM230
PARK22 (616710)	7p11.2	Autossômica dominante	CHCHD2
PARK23 (616840)	15q22.2	Autossômica recessiva	VPS13C

A α -sin é uma pequena proteína de 140 aminoácidos, expressa em diferentes tipos celulares - neuronais e não neuronais - envolvida na reciclagem de vesículas nas sinapses, sendo fundamentais na ancoragem, tráfego e exocitose vesicular na membrana pré-sináptica (Emanuele and Chieragatti, 2015) e pertence à família das proteínas intrinsicamente desordenadas (*IDP- intrinsically-disordered protein family*). Membros desta família estão envolvidos em inúmeras interações com diferentes proteínas. A α -sin apresenta três domínios: a porção N-terminal, o componente não-amilóide (NAC) e a porção C-terminal (fundamental para a prevenção da agregação da α -sin) (Figura 1). O domínio NAC consiste numa região hidrofóbica e é a porção central da proteína responsável pela agregação e toxicidade na forma mutante da proteína (Emanuele and Chieragatti, 2015). Modificações pós-traducionais podem levar a mudanças na conformação proteica, promovendo a oligomerização e formação de filamentos. Fosforilação no resíduo da serina 129 (Ser129)- pela ação das quinases caseína 1 e caseína 2-, por exemplo, pode anular os efeitos inibitórios da região C-terminal sobre o NAC, favorecendo a agregação proteica (Chen et al., 2015; Ciaccioli et al., 2013). A fosforilação neste resíduo está presente em mais de 90% da α -sin insolúvel que compõe os corpos de Lewy e em somente 4% da α -sin normal (Fujiwara et al., 2002).

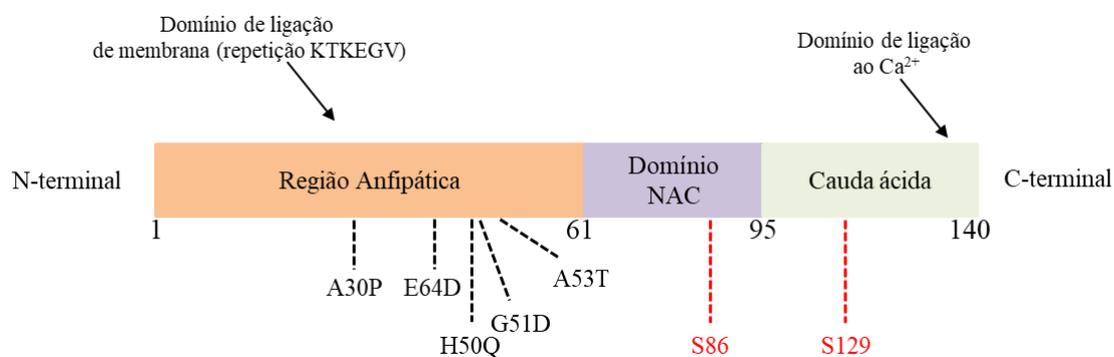


Figura 1: Estrutura da proteína α -sinucleína. A porção N-terminal (laranja, porção anfipática) abrange as repetições KTKEGV, região na qual as mutações *missense* (destacadas em linhas pontilhadas na figura) associadas à doença de Parkinson de origem familiar foram encontradas. O domínio NAC (lilás) é o centro hidrofóbico da molécula e promove a agregação proteica. A região C-terminal (verde) contém um sítio de fosforilação (linha pontilhada vermelha) e o sítio de ligação ao cálcio. Modificado de: Emanuele e Chieragatti (2015).

Duplicações ou triplicações no gene selvagem da proteína α -sin (gene SNCA), localizado no cromossomo 4q22, também estão associadas com a doença, assim como mutações de ponto que aumentam a capacidade de agregação da proteína, como as variantes A30P e A53T (Marmolino et al., 2016; Polymeropoulos et al., 1997). Acúmulo da α -sin, tanto

em neurônios como em células da glia, precedem a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra (Melo et al., 2018).

Inúmeros processos celulares são alterados devido à presença de fibrilas de α -sin, o que gera toxicidade neuronal e, conseqüentemente, morte celular. Dentre estes processos têm-se a redução da quantidade de vesículas pré-sinápticas (Cheng et al., 2011); disfunção mitocondrial (Elkon et al., 2002); aumento nos níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (Junn and Mouradian, 2002); formação de poros na membrana (Volles et al., 2001) e inibição do sistema ubiquitina proteassomo (UPS) (Emmanouilidou et al., 2010), descrito mais adiante.

A AD, por sua vez, é uma desordem neurodegenerativa caracterizada, de forma geral, pela perda neuronal e o acúmulo intraneuronal de materiais fibrilares (Buée et al., 2000), sendo a doença neurodegenerativa de maior incidência mundial. Esta doença pode ser de origem familiar (5% dos casos) ou esporádica. A versão esporádica está associada à idade e pode ser caracterizada, clinicamente, pela perda progressiva da memória e das capacidades cognitivas e físicas e, patologicamente, pela perda dos neurônios localizados na região do hipocampo (Grune et al., 2004).

A AD é marcada por dois tipos de agregados proteicos: formados por peptídeos A β (geralmente agregados extracelulares) e os emaranhados neurofibrilares (agregados intracelulares), formados pela proteína pTau (García-Arencibia et al., 2010).

Ross & Poirier (2004) salientam que alguns processos influenciam na formação dos agregados na doença de Alzheimer, dentre elas o aumento da fosforilação está relacionada à doença, uma vez que a maior porção dos emaranhados neurofibrilares consiste na proteína tau hiperfosforilada.

A proteína tau faz parte da família de proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs) e possui 6 isoformas, devido ao *splicing* alternativo (Buée et al., 2000), transcritas a partir de um único gene (MAPT- *microtubule-associated protein Tau* gene) localizado no cromossomo 17q21 (Poorkaj et al., 1998) humano. Cada isoforma contém um domínio de projeção (contendo inserções ácidas, chamada de N); regiões ricas em prolina e o domínio de ligação ao microtúbulo (MBD), composto de 3 ou 4 repetições localizados na porção C-terminal (Nizynski et al., 2017) (Figura 2).

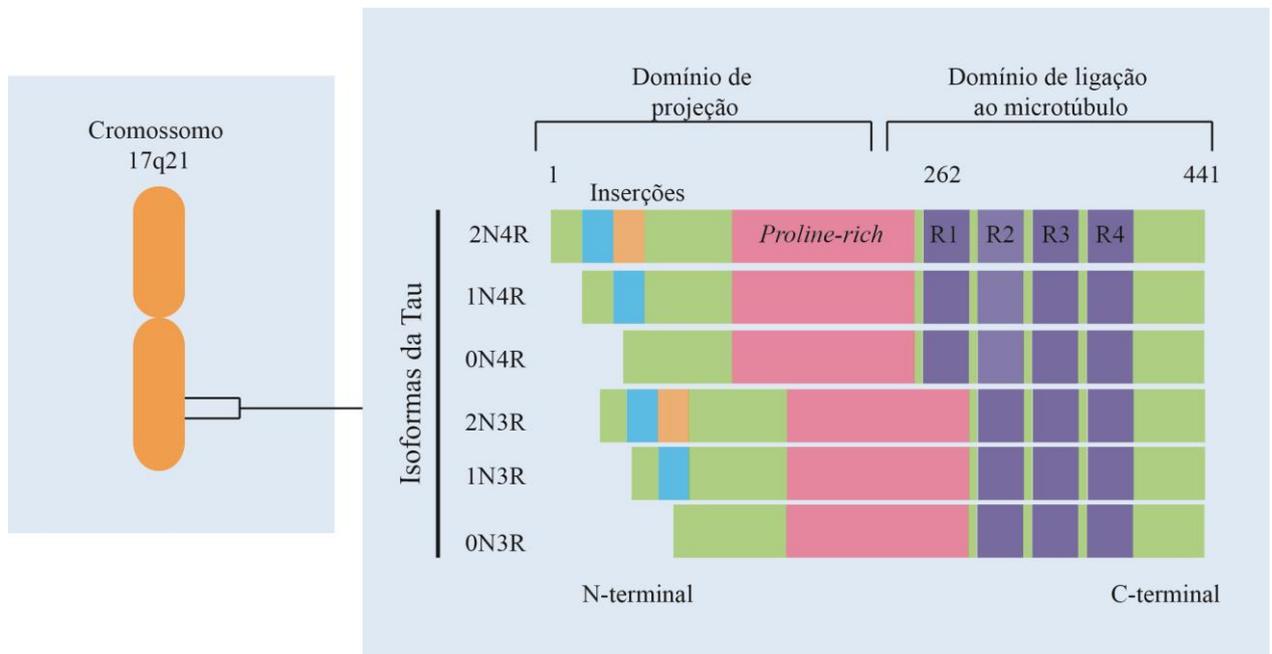


Figura 2: Localização cromossômica e estrutura da proteína associada ao microtúbulo Tau. O gene que codifica para a proteína tau está localizado no cromossomo 17q21. Os éxons 2, 3 e 10 podem sofrer splicing alternativo, originando seis isoformas da proteína tau. Modificado de: Šimić et al.,(2016).

A proteína tau em seu estado normal é fundamental no transporte intracelular neuronal (De Vos et al., 2008) pois se liga aos microtúbulos através de regiões repetitivas na cauda C-terminal, agindo como promotores da polimerização da tubulina *in vitro* (Buée et al., 2000). Essas funções fisiológicas são reguladas por inúmeras modificações pós-traducionais - que incluem: fosforilação, clivagem proteolítica, acetilação, glicosilação, prolil-isomerização, SUMOilação, ubiquitinação, metilação, glicação e nitração - que também afetam seu estado conformacional (Nizynski et al., 2017).

Sabe-se que a fosforilação e a desfosforilação são fundamentais para a modulação da proteína tau com os microtúbulos (Figura 3). A tau em seu estado hiperfosforilado, no entanto, é o componente principal nos emaranhados neurofibrilares presentes nos pacientes com AD (Buée et al., 2000). Neste estado hiperfosforilado, a tau dissocia-se dos microtúbulos o que desestabiliza o transporte intracelular. As quinases MAP-kinase, GSK-3 β e Cdk5 são as principais quinases envolvidas na fosforilação da tau (Mokhtar et al., 2013). Curiosamente, até o momento, não foi encontrado uma mutação descrita no gene MAPT envolvido diretamente na AD (Nizynski et al., 2017). Além disso, sabe-se que outras mutações neste gene estão associadas a um grupo de desordens neurodegenerativas, denominadas de tauopatias, que são histologicamente definidas por depósitos intracelulares de proteína pTau em células neuronais e da glia (Frost et al., 2015), logo, mutações no gene MAPT são suficientes para gerarem quadros de perda neuronal.

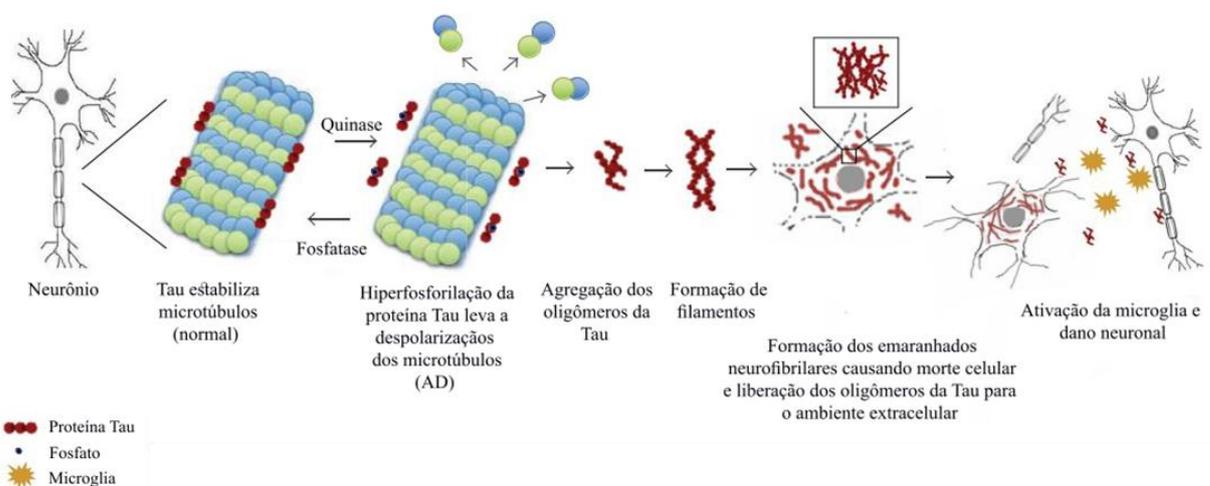


Figura 3: Fosforilação da proteína tau é fundamental para a estabilização dos microtúbulos. A proteína tau no seu estado hiperfosforilado causa despolimerização dos microtúbulos e a formação de oligômeros proteicos no citoplasma, que podem agregar e formar os emaranhados neurofibrilares. Extraído e modificado de: Mokhtar et. al. (2013).

A clivagem proteolítica também está envolvida no processo, mas agora na formação de placas β -amilóides. Essas placas senis extracelulares são compostas por proteína $A\beta$ agregadas em cadeias β e são formadas pela clivagem sequencial na proteína transmembrana APP (proteína precursora amiloide) por ação das enzimas β -secretase com a γ ou a ϵ -secretase (Ross and Poirier, 2004) (Figura 4). A proteína APP, em condições fisiológicas normais, é uma proteína presente na superfície celular, envolvida no alongamento axonal, migração celular e transdução de sinal (Mokhtar et al., 2013). A proteína precursora somente é efetiva quando é clivada pelas enzimas citadas anteriormente, originando diferentes fragmentos, dentre eles, dois fragmentos $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$, que são liberados no meio extracelular (Mokhtar et al., 2013) (Figura 4).

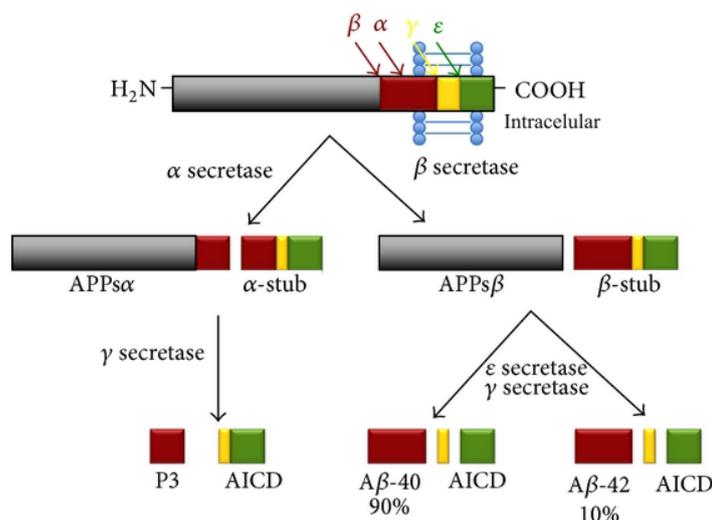


Figura 4: Processamento da proteína precursora amiloide (APP). Clivagens sequenciais da APP pela enzima β -secretase (codificada pelo gene BACE1) e posteriormente pela ϵ e γ secretases (pertencentes ao complexo da presenilina 1 - PS1) geram dois fragmentos de peptídeo β -amilóide, com 40 e 42 aminoácidos. Extraído de: Mokhtar et. al. (2013).

O acúmulo dos oligômeros deste peptídeo causa toxicidade na região sináptica, gera distúrbios neuronais que prejudicam a formação da memória em diferentes regiões cerebrais (hipocampo, córtex entorrinal, dentre outras) e danifica os espinhos dendríticos (Mokhtar et al., 2013). A agregação dos peptídeos A β está associada à sua sequência C-terminal, levando a formação de fibrilas estáveis e altamente ordenadas (Koo et al., 1999). Placas amilóides podem ser definidas, portanto, como depósitos extracelulares de filamentos que são microscopicamente visíveis em vários órgãos em inúmeras doenças humanas (Haass and Selkoe, 2007). Acúmulo destes peptídeos, principalmente A β 1-42, resulta no desenvolvimento precoce da AD de origem familiar.

Há duas hipóteses para explicar os eventos celulares decorrentes do acúmulo do peptídeo A β e da proteína tau hiperfosforilada. Segundo a hipótese amilóide, o acúmulo e a agregação dos peptídeos A β hidrofóbicos levam ao desencadeamento de uma cascata de alterações sinápticas, ativação de astrócitos dentre outros, que modificam a solubilidade da proteína tau em oligômeros e, posteriormente, em filamentos helicoidais insolúveis, com disfunção neuronal progressiva com deficiência e perda cognitiva associada. Essa hipótese está baseada na premissa de que a patologia da tau é um resultado da agregação do peptídeo β -amilóide (Nizynski et al., 2017). Uma forte crítica a esta hipótese reside no fato de que nem sempre os agregados de β -amilóide (as placas neurais) estão associados à toxicidade podendo ser uma resposta de proteção celular. A correlação entre densidade de depósitos de β -amilóide em cérebros *posmortem* de pacientes com AD apresenta baixa correlação com a severidade clínica apresentada pelos pacientes em vida. O mesmo quadro pode ser analisado na PD em que a correlação existente entre a presença do corpo de Lewy e a morte celular na região da substância negra também é baixa (Ross and Poirier, 2004). Outra hipótese é aquela que trata da disfunção da tau como independente das modificações do peptídeo A β , a despeito dos mecanismos envolvidos serem paralelos (Small and Duff, 2008).

Apesar de não existir um consenso entre as hipóteses ou uma relação de causa e efeito que explique os problemas proteicos gerados nas doenças neurodegenerativas, uma afirmação é recorrente: problemas no sistema de qualidade proteico estão presentes em todas as doenças citadas até o momento, e serão abordados a seguir.

1.3. O Sistema de controle de qualidade proteico e as doenças neurodegenerativas

A função das proteínas depende do seu dobramento correto e da sua estrutura tridimensional. O sistema de controle de qualidade proteica (*Protein quality control- PQC*) corresponde a um conjunto de fatores e vias que atuam garantindo que novas proteínas recém-sintetizadas atinjam uma conformação funcional correta, além de atuarem na prevenção e resgate de proteínas defeituosas. Proteínas danosas apresentam dois possíveis destinos: reparo enzimático de aminoácidos selecionados ou degradação proteica através das vias de degradação celular (Squier, 2001).

As células eucarióticas estão divididas em diferentes compartimentos intracelulares, que podem apresentar chaperonas específicas que se ligam a regiões não-enoveladas das proteínas (de forma concomitante a tradução ou pós-traducionalmente) podendo exercer diferentes funções tais como: auxílio na conformação, prevenção de agregação, ou facilitação da importação proteica para diferentes organelas (Pilla et al., 2017). A grande maioria das chaperonas é conhecida como *heat shock proteins* (HSPs), podendo apresentar diferentes pesos moleculares (HSP40, HSP60, HSP70, dentre outras), e serão abordadas ao longo deste capítulo.

A prevenção do acúmulo de proteínas não-funcionais está associada a sistemas proteolíticos intracelulares altamente regulados (Grune et al., 2004), uma vez que o acúmulo de proteínas danosas representa uma ameaça para a funcionalidade celular e, conseqüentemente, o organismo como um todo. Há dois mecanismos de degradação de componentes celulares amplamente estudados: a via ubiquitina–proteassomo e a via da autofagia (Figura 5).

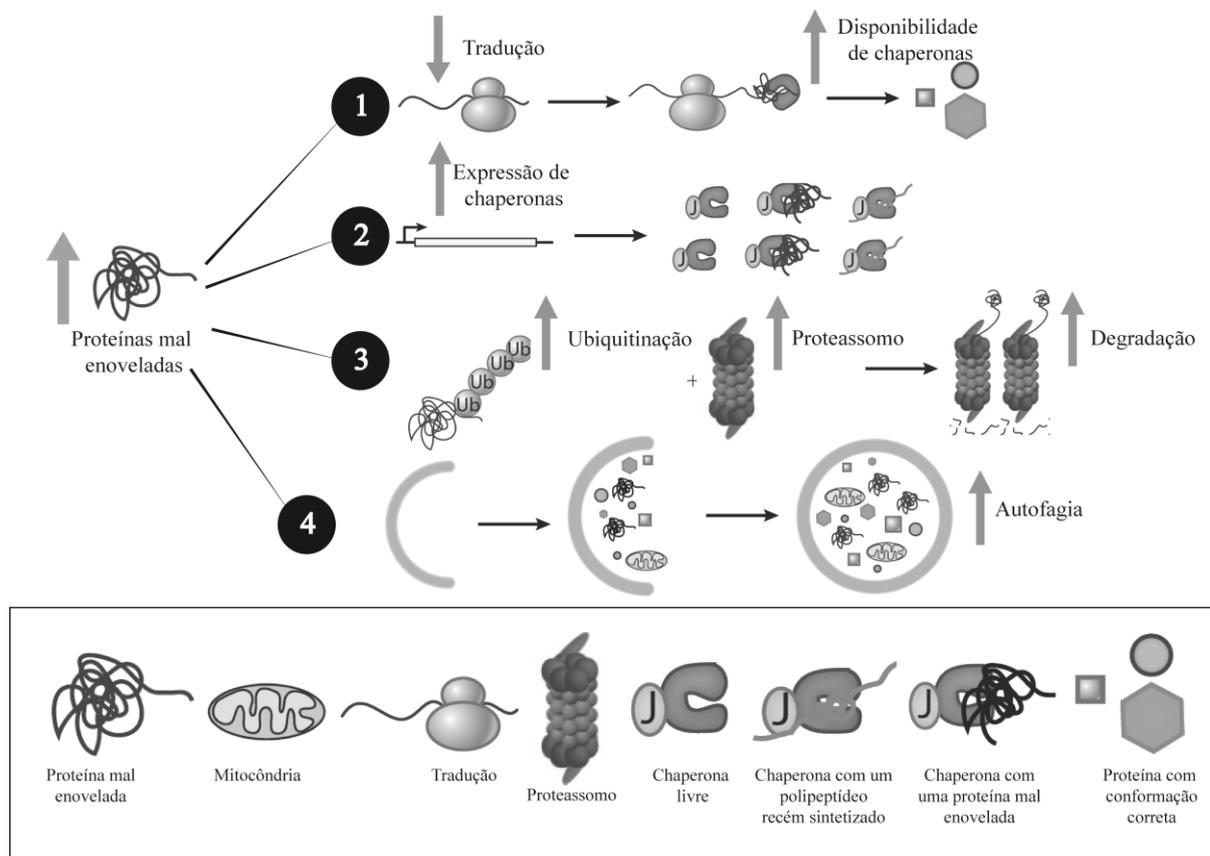


Figura 5: Respostas celulares à presença de proteínas danificadas. A presença de proteínas mal enoveladas no ambiente intracelular gera inúmeras respostas, com ativação de diferentes vias, para a neutralização destes agentes tóxicos. A resposta mais imediata é a diminuição da síntese proteica para diminuir a quantidade de novos clientes para as chaperonas gerando, em decorrência, uma maior disponibilidade de chaperonas no ambiente (1). O aumento da expressão de genes que codificam chaperonas é uma das respostas a nível transcricional para o estresse gerado pelas proteínas mal enoveladas (2). O estresse gerado leva ao aumento na ubiquitinação e de proteassomos, aumentando a degradação proteassomal (3). A autofagia é aumentada, para degradar complexos moleculares maiores e organelas (4). Extraído e modificado de Pilla et al. (2017).

A autofagia e o UPS estão envolvidos na degradação de quase todo o excedente de componentes celulares, estejam estes danificados ou disfuncionais, logo, os dois processos permitem reciclar material e energia sendo, portanto, fundamentais para a manutenção da homeostase (Korolchuk et al., 2010).

Segundo Grune et al., (2004), as proteínas que adentram na célula, assim como inúmeras proteínas intracelulares são degradadas no interior dos lisossomos, no entanto, proteínas nucleares e citoplasmáticas solúveis são degradadas pelo sistema proteossomal.

O proteassomo é responsável pela degradação de várias proteínas de vida curta, solúveis ou mal-enoveladas. Essa degradação geralmente é reconhecida por um sinal de poliubiquitinação, que atua gerando sinais, chamados de *degrons* (Ji and Kwon, 2017). A ubiquitina, uma proteína pequena de 76 aminoácidos, é o modificador de proteínas envolvido no processo. Atualmente, sabe-se que as cadeias de poliubiquitina ligadas aos resíduos de lisina na posição 48 (K48) atuam como sinais para degradação proteossomal e que, quando

associados à lisina na posição 63 (K63), são reconhecidos como sinal para degradação da via autofágica (Ji and Kwon, 2017).

O proteassomo é formado por um cerne catalítico denominado 20S e mais dois componentes regulatórios, denominados de 19S, que reconhecem as cadeias de ubiquitina, (Grune et al., 2004) e compreende uma estrutura de barril formada por 47 subunidades. A combinação do cerne com os dois componentes catalíticos formam o complexo 26S do proteassomo onde ocorre a proteólise estimulada por ATP e ubiquitina (Grune et al., 2004).

Como citado anteriormente, a degradação proteica via proteassomo é altamente regulada e o processo de poliubiquitinação é sintetizado por uma cascata de 3 enzimas: E1 (enzima ativadora), E2 (enzima conjugadora) e E3 (ligase de ubiquitina), e representa o maior sinal de reconhecimento do substrato pelo proteassomo (Hershko e Ciechanover, 1998). A enzima E3 é responsável pelo reconhecimento do substrato e, conseqüentemente, apresenta inúmeras funções no sistema de controle de qualidade proteica em diferentes compartimentos celulares. Ao final do processo, o proteassomo libera fragmentos contendo de 3 a 25 aminoácidos no citosol, que posteriormente serão lisados em aminoácidos únicos por peptidases específicas (Feleciano et al., 2019).

Alguns estudos propõem a diminuição da atividade proteassomal ao longo do envelhecimento como ponto crucial para o desenvolvimento de inúmeras doenças, especialmente as doenças neurodegenerativas (Dahlmann, 2007; Vilchez et al., 2014). Problemas na atividade proteassomal geram distúrbios nas vias de crescimento celular, apoptose, imunidade, dentre outros fatores (Figura 6).

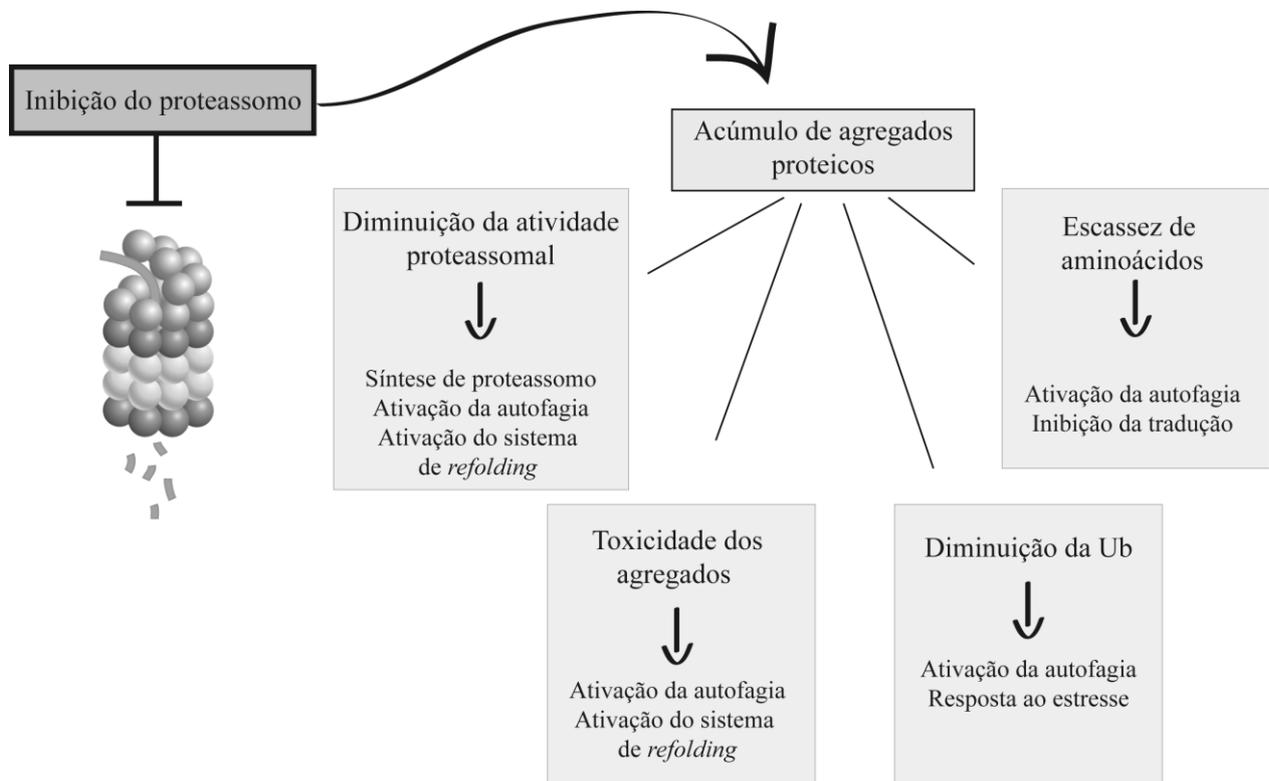


Figura 6: Consequências celulares da inibição do proteassomo. A inibição da atividade do proteassomo afeta inúmeros processos celulares, como progressão do ciclo celular e sobrevivência da célula. Uma das consequências desta inibição é o acúmulo de proteínas mal enoveladas e a sua consequente agregação que gera diminuição na disponibilidade de aminoácidos essenciais e da ubiquitina, toxicidade para diversas organelas e desestabilização da atividade do próprio proteassomo. O aumento da autofagia, inibição da tradução e ativação da capacidade de *refolding* proteico são algumas das estratégias celulares para combater os agregados proteicos. Extraído e modificado de: Dikic (2017).

A autofagia, por sua vez, é um sistema catabólico intracelular no qual componentes do citoplasma são enviados para a degradação nos lisossomos (García-Arencibia et al., 2010) sendo bem conservada no aspecto evolutivo (Eskelinen and Saftig, 2009). A autofagia pode ser dividida em três tipos: microautofagia – que consiste no englobamento de porções do citoplasma por meio da invaginação da membrana do próprio lisossomo -, autofagia mediada por chaperonas – envolve o transporte seletivo de proteínas por ação das chaperonas – e a macroautofagia –, que envolve a formação de uma vesícula dupla-membrana denominada autofagossomo, que se funde ao lisossomo, levando a degradação celular dos componentes aprisionados no interior da vesícula (García-Arencibia et al., 2010). Sabe-se que a macroautofagia (utilizada, à partir deste momento, como sinônimo de autofagia) é restrita ao citoplasma e é capaz de degradar proteínas solúveis de conformação errada, complexos proteicos, oligômeros e agregados (Korolchuk et al., 2010). A autofagia é ativada de acordo com inúmeros estímulos e condições de estresse. Diminuição da disponibilidade de aminoácidos, de fatores de crescimento, hipóxia, exposição a diferentes substâncias químicas e toxinas são alguns dos sinais de estresse que ativam a autofagia (Kocaturk and Gozuacik, 2018).

Existem diferentes vias de sinalização para a autofagia, dentre elas, temos a via dependente de m-TOR (*mamalian target of rapamicina*, composto pelos complexos proteicos mTORC1 e mTORC2) que coordena processos anabólicos e catabólicos no ambiente intracelular (Kocaturk and Gozuacik, 2018) (Figura 7). García-Arencibia et al., (2010), salientam que o m-TOR é um regulador negativo para a autofagia e trata-se de um sensor do *status* energético da célula, que leva em consideração a presença de fatores de crescimento, disponibilidade de nutrientes e quantidade de energia disponível. Condições favoráveis para o desenvolvimento celular ativam o sensor que acaba por inibir o processo autofágico (García et al., 2010), através da inibição do complexo ULK1/2 (Kocaturk and Gozuacik, 2018). No entanto, condições desfavoráveis, ou tratamento com rapamicina, levam a inibição de m-TOR e a consequente ativação da autofagia.

A autofagia apresenta uma importância extrema na homeostase neuronal, uma vez que pode ser vista como “um processo constitutivo em células como os neurônios” que são sensíveis as modificações do meio, logo, distúrbios entre síntese proteica e degradação de proteínas parecem ser importante no desencadeamento das doenças neurodegenerativas (García-Arencibia et al., 2010; Grune et al., 2004). Jung et al., (2010) salientam que a indução da autofagia é uma das respostas iniciais – juntamente com a inibição do crescimento -, utilizada para otimizar o uso dos recursos limitados de energia e contribui para a sobrevivência durante condições desfavoráveis de crescimento.

A maquinaria autofágica é codificada por inúmeros genes, chamados de genes Atg (genes relacionados à autofagia) (García-Arencibia et al., 2010). Ao menos 25 genes estão especificamente envolvidos na autofagia e outros 30 são requeridos no processo e envolvidos em outras vias metabólicas (García-Arencibia et al., 2010). A Beclina-1 (BECN-1), uma das proteínas analisadas ao longo desta dissertação, é tida como a provável contribuinte para a deficiência da autofagia associada à doença de Alzheimer (García-Arencibia et al., 2010), devido à diminuição nos níveis de expressão de proteínas e de RNAm (Jaeger and Wyss-Coray, 2010). Esta proteína é homóloga a Atg6 expressa em leveduras e atua na via de sinalização e no início do desenvolvimento dos autofagossomos (Eskelinen and Saftig, 2009) (Figura 7). A Beclina-1 forma um complexo com a PI3-kinase (juntamente com outras proteínas e enzimas, como a VPS34, uma quinase lipídica) (Kocaturk and Gozuacik, 2018) e está associada ao recrutamento de membrana para a formação do fagóforo que irá dar origem ao autofagossomo (Eskelinen and Saftig, 2009). Estudos demonstram que a deficiência desta proteína em camundongos transgênicos diminui a autofagia neuronal e resulta em

neurodegeneração (Pickford et al., 2008). O alongamento da membrana isolada, por sua vez, depende de dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina; inicialmente, a proteína Atg12 é covalentemente conjugada à Atg5 pela ação das proteínas Atg7 (semelhante a E1) e a Atg10 (semelhante a E2) (Kocaturk and Gozuacik, 2018) (Figura 7).

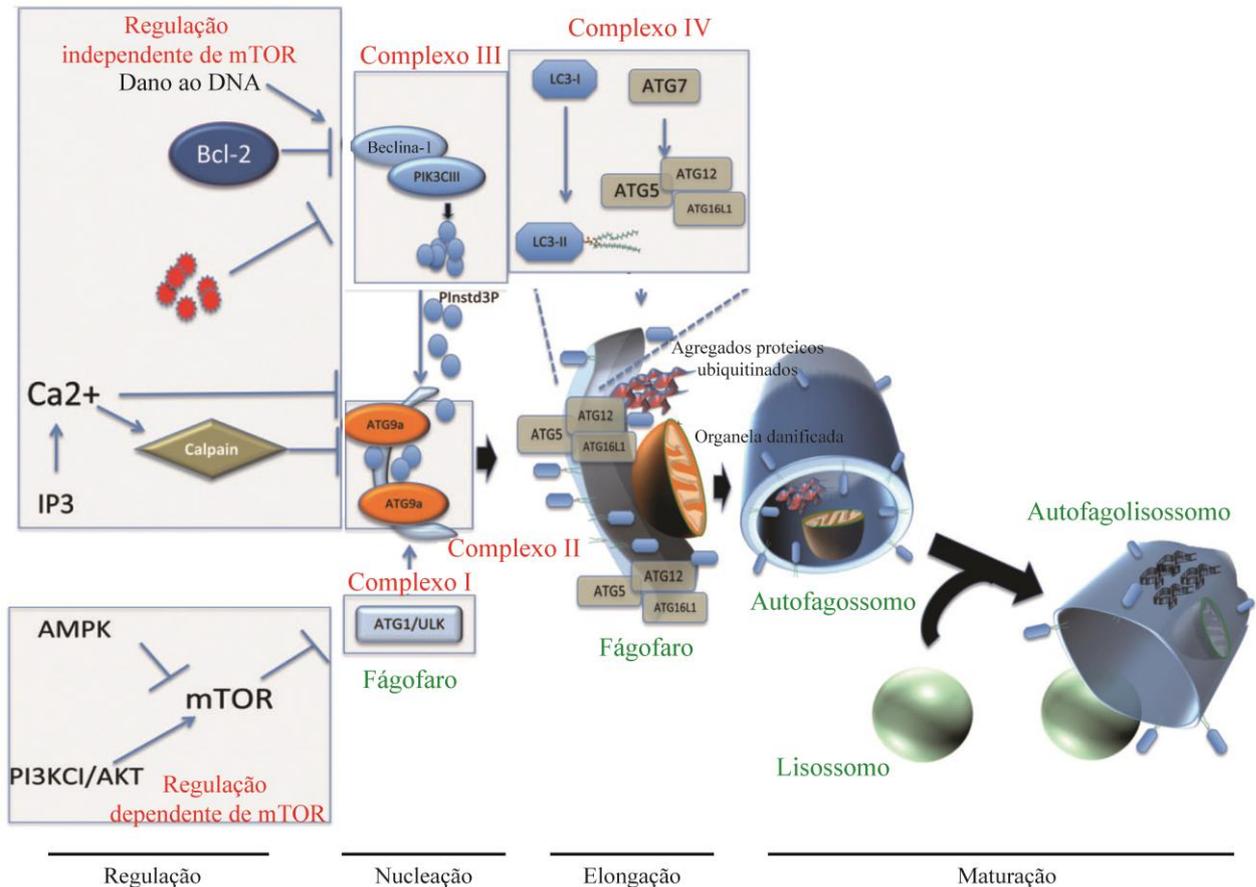


Figura 7: A via autofágica. A autofagia pode ser induzida de forma dependente de mTOR seja por inativação indireta pela AMPK ou pela diminuição da atividade do PI3K/AKT. O processo independente de mTOR pode levar a indução autofágica por dano no DNA e pode ser inibida pela associação entre Beclina-1 e Bcl-2 e por altos níveis intracelulares de NO, IP₃ e cálcio. Após a indução autofágica, seguem-se as etapas de nucleação da membrana; de alongação e fechamento da vesícula; estágio de fusão entre o autofagossomo e o lisossomo. Extraído e modificado de: Gros e Muller, (2014)

A proteína LC3, homóloga a Atg 8 nas leveduras e fundamental para o entendimento do processo autofágico, auxilia na formação dos autofagossomos e é apresentada em duas formas: a LC3I, solúvel, formada à partir da clivagem da LC3 pela ação da Atg4, é a fração citosólica da referida proteína, posteriormente, a LC3I pode ser conjugada a um fosfolipídio (PE), dando origem a LC3II, que é a fração lipídica da proteína e atua como um marcador específico de membrana do autofagossomo, estando presente desde o início da sua formação até a sua degradação (Eskelinen and Saftig, 2009) logo, a expressão de LC3II pode ser utilizada para estimar a abundância de autofagossomos antes de estes serem degradados pelas hidrolases lisossomais (Figura 7). Este processo de conjugação das moléculas lipídicas à

LC3 ocorre por ação dos oligômeros do grande complexo formados pelas proteínas Atg12-5-6-16L1, que atuam como ligases E3, o segundo sistema de conjugação semelhante à ubiquitina no processo de formação do autofagossomo (Mizushima et al., 2010; Shpilka et al., 2011; Tsuboyama et al., 2016).

Por fim, o autofagossomo se funde com endossomo tardio ou com o lisossomo, para que o conteúdo do interior vesicular possa ser degradado (Figura 7). Em células de mamíferos, esta fusão é dependente da proteína integral da membrana do lisossomo, LAMP-2, de diversas proteínas SNAREs e proteínas Rab (Jäger et al., 2004; Tanaka et al., 2000). Como citado anteriormente, a autofagia também pode atuar como um processo seletivo dentro do ambiente celular. Essa seletividade ocorre por meio de receptores específicos para a autofagia que formam uma ponte entre a carga ubiquitinada e o componente LC3 presente na membrana do autofagossomo. Dentre os inúmeros receptores envolvidos no processo, têm-se a proteína p62/SQSM1 que reconhece agregados intracelulares ubiquitinados.

Estudos demonstram uma resistência dos neurônios presentes no SNC, logo, pode-se concluir que, ao longo da evolução, estas células desencadearam mecanismos específicos para regular as vias de degradação celular, em especial, a autofagia (Yue, 2007). A desregulação autofágica pode levar a ativação da via apoptótica (Kocaturk and Gozuacik, 2018).

Yue (2007), ressalta que a atividade autofágica neuronal pode ser alterada em condições patogênicas, o que se reflete no acúmulo de autofagossomos em doenças neurodegenerativas. Os axônios são compartimentos neuronais altamente especializados que realizam funções longe do corpo celular. Para Yue (2007) quadros de distrofia axonal levam ao acúmulo de autofagossomos que podem ser um indício da biogênese destas vesículas no próprio axônio. Para Pickford et al., (2008), a eliminação da autofagia neuronal basal é suficiente para causar neurodegeneração na ausência de outros insultos. Frake et al., (2015) afirma ainda que a perda da homeostasia axonal, que é um resultado da autofagia, resulta em distrofia axonal.

Proteínas solúveis com problemas conformacionais são reconhecidas pela maquinaria de chaperonas, como as HSPs (já citadas anteriormente), e são direcionadas para a degradação via proteassomo. As Hsp60, Hsp70, Hsp40, Hsp100, Hsp110, são algumas das chaperonas pertencentes ao grupo das HSPs que atuam no controle de qualidade proteico. As chaperonas atuam facilitando o dobramento correto das proteínas, no entanto, a estrutura funcional proteica nem sempre é alcançada, neste cenário de mal enovelamento proteico, as chaperonas

podem atuar facilitando a degradação, seja por prevenir a agregação ou facilitando o transporte das proteínas alvos para os sistemas de degradação proteolíticos já comentados neste capítulo (Kampinga and Craig, 2010).

A Hsp70 atua em inúmeros processos biológicos, apesar de apresentar uma sequência altamente conservada entre os diferentes grupos evolutivos. Uma característica bioquímica das Hsp70 é o ciclo de ligação e soltura da molécula alvo (um processo ATP-dependente) combinado com o reconhecimento do substrato (Kampinga and Craig, 2010). Essa especificidade no reconhecimento proteico pode ser explicada pelo fato de que a Hsp70 não atua sozinha, necessitando da ação das proteínas DNAJs (ou Hsp40s) e, quase sempre, das NEFs (fatores de troca de nucleotídeos) como parceiros, para realizar sua função biológica, constituindo a maquinaria da Hsp70.

O modelo canônico para a maquinaria da Hsp70 postula o reconhecimento e entrega do substrato para a Hsp70 por intermédio das proteínas DNAJs e o desligamento pelas NEFs (Figura 8). Em humanos, têm-se 11 Hsp70, 13 NEFs e 41 proteínas DNAJ, o que sugere – devido à grande diversidade entre a sequência desta última classe de co-chaperonas – que elas sejam fundamentais no reconhecimento do substrato pela maquinaria da Hsp70.

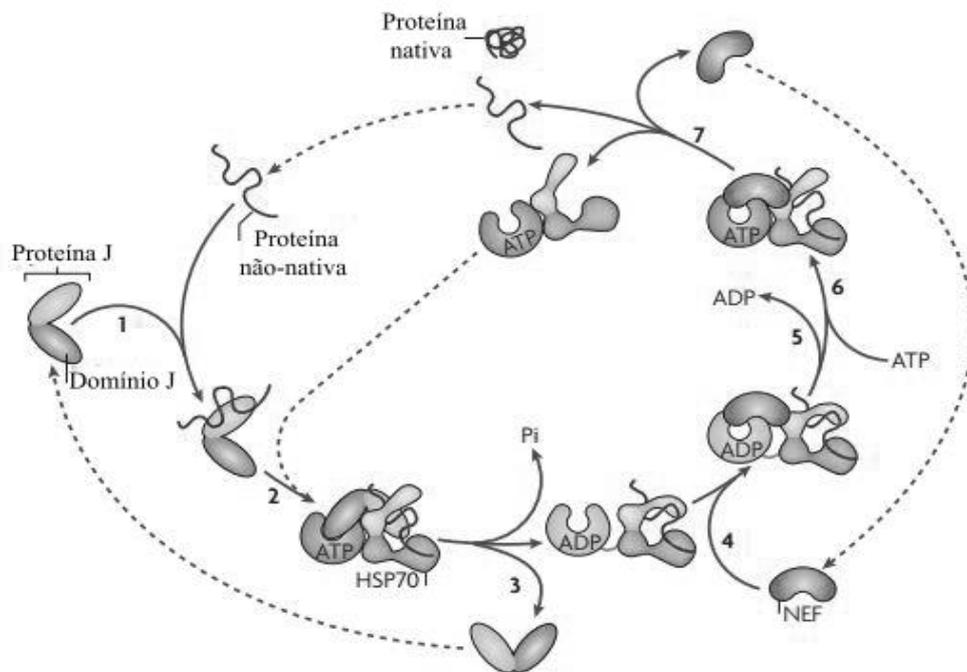


Figura 8: Modelo canônico da maquinaria da HSP70. As proteínas J ligam-se ao substrato por intermédio do domínio de ligação ao peptídeo (1) e interage com o domínio ATPase da HSP70 através do domínio J (2). O substrato interage com o sítio de ligação da HSP70 de forma transitente, o que gera a hidrólise de ATP, gerando uma mudança conformacional na HSP70 que estabiliza a interação entre as moléculas, e a proteína J deixa o

complexo (3). O fator de troca de nucleotídeos (NEF), que apresenta uma maior afinidade pela HSP70-ADP, liga-se a HSP70 (4). Durante este processo, o ADO dissocia-se do domínio de ligação do ATP (5), e uma nova molécula de ATP liga-se à HSP70 (6). O substrato então é liberado (7). Extraído e modificado de: Kampinga e Craig (2010).

O domínio J é uma região altamente conservada de aproximadamente 70kDa que define uma proteína DNAJ, no qual, resíduos expostos deste domínio formam uma superfície de interação com a Hsp70 (Greene et al., 1998; Jiang et al., 2007). Outra região fundamental é o motivo HPD (região conservada contendo His, Pro e Asp) que estimula a atividade de ATPase da Hsp70. As proteínas DNAJ são classificadas em três classes – I, II e III ou A, B e C, respectivamente. Além de facilitar o *folding* proteico, inúmeras proteínas J apresentam outras funções, mais específicas, como prevenção da agregação ou direcionamento do substrato para vias específicas de degradação. A DNAJB6 e a DNAJB8 são exemplos de proteínas DNAJs que apresentam potentes efeitos inibitórios na agregação e na toxicidade associada a proteínas contendo repetições de glutamina (as proteínas poliQ) (Hageman et al., 2011; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; Månsson et al., 2014). Mais recentemente mostrou-se um papel importante da proteína DNAJB6 e DNAJB2 sobre um cenário de agregação proteica da proteína α -sinucleína, que será abordado com mais detalhes no capítulo 3 (Aprile et al., 2017).

A família das NEFs consiste nas proteínas Hsp110, HSPB1/BAP e a família das proteínas BAG (*Bcl-associated anthogene*), composta por 6 membros e constitui o grupo de NEFs que apresenta a maior diversidade entre as sequências dentre seus membros. O domínio BAG, presente na região C-terminal, é o que caracteriza as proteínas BAG, e é a região que interage diretamente com o domínio da ATPase da chaperona Hsp70 (Brive et al., 2001; Kabbage and Dickman, 2008; Xu et al., 2008). As proteínas dessa família são regularmente associadas com as vias de degradação já citadas.

Dentre as proteínas BAG, a BAG2, é que apresenta menos elucidação quanto as suas funções. Apesar de apresentar semelhanças moleculares e funcionais com os outros membros da família, apresenta alguns aspectos únicos, como o seu domínio BAG, que apresenta poucos níveis de homologia com outros domínios BAG, além de apresentar outros domínios na região N-terminal que permitem a sua ligação com outros substratos (Qin et al., 2016).

Carrettiero et al., (2009) demonstrou que a BAG2 direciona a proteína pTau para a degradação, via proteassomo, de forma independente de ubiquitina, em um modelo para a AD. Também foi postulado, em outro trabalho, que a proteína BAG2 apresenta um papel importante na mitofagia, uma vez que reconhece diferentes sítios de fosforilação da proteína

Pink-1, direcionando para a sua degradação (Che et al., 2013). A figura 9 resume as interações conhecidas para a co-chaperona BAG-2.

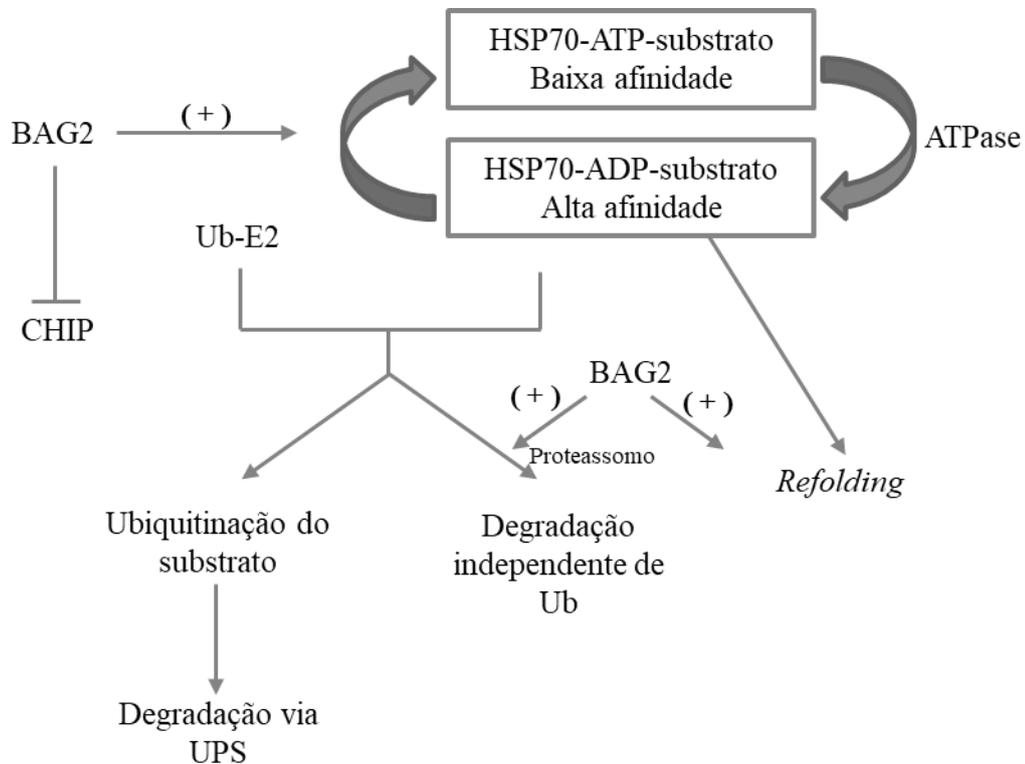


Figura 9: A co-chaperona BAG2 e suas interações proteicas. BAG2 acelera a dissociação do ADP da Hsp70 e promove o *refolding* do substrato (de forma dependente de Hsp70). BAG-2 também atua inibindo a ligação de ubiquitina CHIP (E3), inibindo, portanto, a ubiquitinação dependente de CHIP. BAG2 inibe a ubiquitinação da proteína tau, desviando a tau hiperfosforilada para degradação via proteassomo de forma independente de Ub. (+)- ativação. Ub – ubiquitina. Modificado de: Quin et al (2016).

Com o foco na hipótese de que a formação de agregados proteicos é posterior à disfunção celular, com base em trabalhos anteriores do nosso grupo que demonstraram modificações na expressão de proteínas antes e durante a formação de agregados e de que a co-chaperona BAG2 atua na degradação da proteína tau hiperfosforilada (com base no trabalho do nosso colaborador, prof. Dr. Daniel Carrettiero), juntamente com indagações sobre o papel das proteínas J, em especial a proteína DNAJB6 na prevenção da agregação proteica da proteína α -sin, que este estudo foi elaborado.

Assim, a presente pesquisa propõe investigar o papel dos agregados proteicos no desencadeamento dos eventos celulares associadas à neurodegeneração, assim como a ação das proteínas BAG2 e DNAJB6 neste processo, utilizando-se de modelos celulares organizados da seguinte maneira:

Inicialmente foi utilizada exposição à rotenona como modelo de neurodegeneração em cultura primária de neurônios e glia, capaz de induzir a formação de agregados proteicos em

diferentes áreas cerebrais, para analisar se há modificação na resposta autofágica antes ou durante a agregação proteica, permitindo também a comparação das respostas geradas entre as diferentes áreas. Posteriormente analisamos o papel da proteína BAG2 na autofagia, o que não foi descrito na literatura até o presente momento. Ainda neste capítulo, análises semelhantes foram realizadas em modelo de células da linhagem SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas, com o intuito de se detectar o papel da co-chaperona em diferentes tipos celulares. Estas análises foram realizadas na Universidade de São Paulo (USP) – sob a orientação da Professora Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e co-orientação do Professor Dr. Daniel Carneiro Carrettiero, da Universidade Federal do ABC.

No próximo capítulo foram utilizadas células das linhagens HEK293T e SH-SY5Y com transfecção transiente da proteína α -sin selvagem e mutada (A53T) e co-transfecção de inúmeras proteínas DNAJ, com foco na proteína DNAJB6, com o objetivo de analisar o papel destas proteínas no aumento da degradação da α -sin. Neste capítulo, também foi abordado o papel da DNAJB6 na via *N-end rule* com a utilização de um substrato da nossa proteína de interesse com uma mutação na porção N-terminal, gerando evidências interessantes e inéditas na literatura sobre o papel da DNJB6 nesta via específica de degradação celular, sendo estas análises realizadas na *University Medical Centre Groningen UMCG*, Holanda – sob orientação do Professor Dr. Harm H. Kampinga.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Estabelecer um panorama mais completo no que se refere ao contexto biocelular, com foco nos sistemas de degradação proteica, que envolve o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e o papel das chaperonas BAG2 e DNAJB6 neste processo.

2.2. Objetivos Específicos

Inicialmente foi utilizado um modelo celular de neurodegeneração esporádica, no qual foram analisados momentos anteriores à formação de inclusões intracelulares no hipocampo, substância negra e locus coeruleus, assim como a linhagem celular SH-SY5Y, com relação a:

1. Expressão das proteínas associadas à ativação da autofagia e maturação dos autofagossomos, como: Beclina-1, LC3 e p62.

2. Análise do fluxo autofágico.
3. Análise das proteínas associadas à mitofagia: Pink-1 e parkina em células da linhagem SH-SY5Y.
4. Papel da BAG2 sobre o fluxo autofágico e expressão das proteínas elencadas em 1 em células de cultura primária e da linhagem células SH-SY5Y.

Em um segundo momento foram utilizadas as linhagens celulares HEK293T e SH-SY5Y com o intuito de avaliar o papel das proteínas DNAJs, principalmente do membro DNAJB6, em modular a solubilidade e os níveis proteicos α -sin selvagem (WT) e com a mutação de ponto A53T. As proteínas J foram avaliadas quanto a sua eficiência em modular os níveis solúveis da α -sin, e se essas atividades estavam associadas com as vias UPS e autofágicas para degradação. Mais especificamente foram analisados:

1. O efeito da DNAJB6 na solubilidade da α -sin (WT e A53T).
2. A associação entre os níveis proteicos da α -sin e a co-expressão de outras proteínas DNAJs, como a DNAJB1 e DNAJB2.
3. O papel do proteassomo e da autofagia na modulação mediada pela DNAJB6 nos níveis proteicos e/ou solubilidade da α -sin.

CAPÍTULO II – ANÁLISE DO PAPEL DA CO-CHAPERONA BAG2 SOBRE A AUTOFAGIA E A MITOFAGIA EM MODELO DE AGREGAÇÃO PROTEICA INDUZIDA POR ROTENONA

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo utilizou o pesticida rotenona para a indução de agregados proteicos em modelo de cultura primária de áreas do cérebro de ratos neonatos Lewis e em células da linhagem SH-SY5Y. A utilização da rotenona como modelo para a indução de agregados *in vivo* (Höglinger et al., 2005; Sherer et al., 2003), tendo sido comprovada a sua eficácia em gerar agregados proteicos *in vitro* em cultura primária de hipocampo, locus coeruleus e substância negra pelo nosso grupo (Chaves et al., 2010) e pelo grupo de Hongo et al., (2012) em células da linhagem SH-SY5Y.

A rotenona é um pesticida natural que apresenta a capacidade de inibir o NADH na cadeia respiratória mitocondrial, gerando um quadro de estresse oxidativo (Chaves et al., 2010). Inibidores do complexo mitocondrial I, como a rotenona e o MPP+ induzem a perda de neurônios dopaminérgicos em diferentes modelos experimentais (Sheehan et al., 1997; Sherer et al., 2002). Diferentes concentrações da referida substância apresentam a capacidade de levar a diferentes níveis de agregação proteica em cultura de células primárias de hipocampo, locus coeruleus e substância negra.

O nosso grupo identificou a presença de agregados proteicos contendo pTau, peptídeos A β e α -sin à partir da concentração de 0,5nM de rotenona, sem a morte associada das células estudadas (Chaves et al., 2010). Concentrações de rotenona superiores à quantidade de 1,0nM estão associadas à morte celular antes da agregação proteica, sendo que, concentrações dentro do intervalo de 0,5 e 1,0nM levam a agregação proteica constitutiva (Figura10). Em suma, a capacidade da rotenona em induzir a formação de agregados seria dose-dependente.

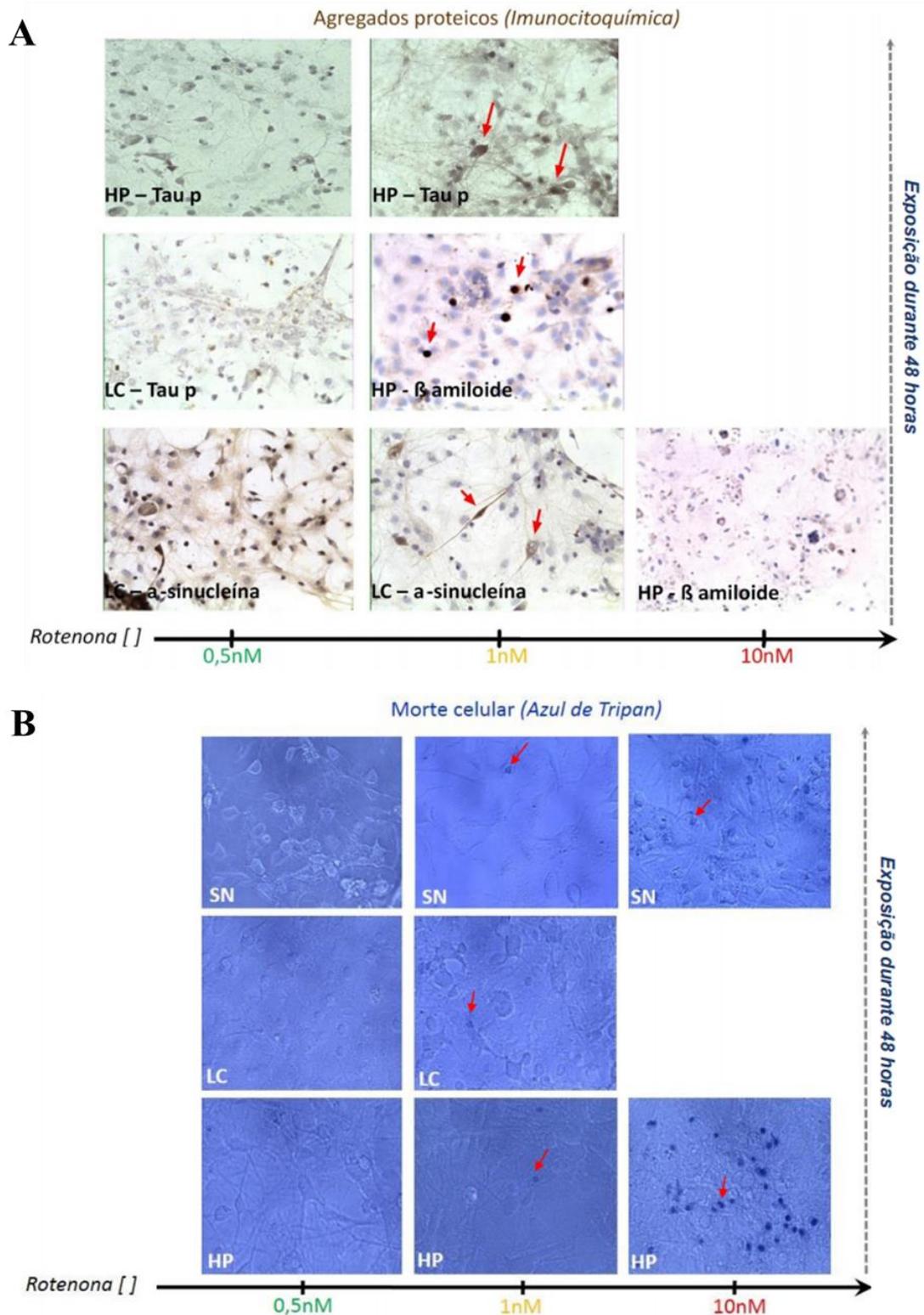


Figura 10: Efeito do tratamento com diferentes concentrações de rotenona em cultura primária de hipocampo, locus coeruleus e substância negra. Fotomicrografias digitais de cultura de células do hipocampo (HP) e locus coeruleus (LC) expostas a 0,5, 1 e 10nM de rotenona durante 48 horas e marcadas com anticorpos anti Tau hiperfosforilada (pTau), α -sinucleína e A β (peptídeo β -amilóide). Setas ilustram marcações imunopositivas para agregados proteicos (A). Fotomicrografias digitais de cultura de células da substância negra (SN), locus coeruleus (LC) e hipocampo (HP), expostas a 0,5; 1 e 10nM de rotenona durante 48 horas, marcadas com azul de Tripán para identificação de morte celular (setas) (B). Extraído e modificado de Chaves et al., (2010).

Outro trabalho do nosso grupo também revelou disfunção nas vias autofágicas e proteossomal em concentrações anteriores à formação de agregados proteicos, no caso, concentrações menores que 0,3nM de rotenona por 48 horas, em células do hipocampo (Chaves et al., 2016).

A linhagem celular SH-SY5Y é frequentemente usada como modelo celular para estudar a doença de Parkinson, por ser de fácil manutenção e por permitir uma rápida diferenciação em células similares a neurônios dopaminérgicos. Apesar disso, a linhagem é derivada de um tumor e, portanto, pode apresentar modificações na sua fisiologia básica, o que salienta a necessidade do uso de outros modelos celulares para enriquecer as análises. A rotenona também foi utilizada na presente pesquisa para a indução de citotoxicidade com desestabilização dos microtúbulos em células SH-SY5Y (Hongo et al., 2012). Os autores demonstraram que a utilização da rotenona na concentração de 1 μ M por 4.5 horas levou a modificações na morfologia das células SH-SY5Y não-diferenciadas, elevou a liberação de LDH e ROS e gerou o aumento da fosforilação da proteína tau por ativação da enzima GSK3 β , uma importante enzima envolvida na fosforilação da proteína tau. No entanto, os autores não demonstraram os efeitos da rotenona em células SH-SY5Y diferenciadas e se, dentro deste novo contexto, a rotenona poderia levar a outras implicações na fosforilação da tau. É importante ressaltar que, apesar da proteína tau hiperfosforilada ser mais comumente relacionada com a AD, ela também apresenta fortes relações com a doença de Parkinson, uma vez que interações tóxicas com a proteína α -sin podem levar a hiperfosforilação da tau.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de fosforilação da tau nas tauopatias, podendo ser uma consequência da perda do equilíbrio da ativação de fosfatases e quinases associadas à tau ou uma falha na sua degradação (de Paula et al., 2016). Nosso grupo demonstrou que há uma deficiência autofágica no cenário anterior à agregação proteica (isto é, na concentração de 0.3nM de rotenona) em cultura primária de células do hipocampo. A presença de ubiquitina nas inclusões de tau também apontam para deficiência na via de degradação proteossomal (Carrettiero et al., 2009).

Nossos colaboradores demonstraram que a co-chaperona BAG2 inibe a ubiquitinação da proteína tau, entregando a proteína tau hiperfosforilada para a degradação proteossomal de uma forma independente de ubiquitina (Carrettiero et al., 2009; Wang and Mandelkow, 2012). Qu et al., (2015) demonstram que a BAG2 é um fator que promove a mitofagia por meio da inibição da PINK-1, sendo crucial na translocação da Parkina. No entanto, são escassos os

trabalhos que abordam essa co-chaperona. Seu papel na autofagia nunca foi abordado na literatura, assim como sua resposta no modelo de neurodegeneração esporádica pelo tratamento com rotenona.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo emprega o modelo de doença neurodegenerativa na forma esporádica para o estudo de agregados proteicos.

Os objetivos foram perseguidos utilizando as ferramentas detalhadas a seguir e respeitando os aspectos éticos de experimentação animal recomendados pelo CONCEA e pela lei federal no. 11.794. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Biociências da USP (271/2016) (ANEXO I).

2.1. Modelo celular de neurodegeneração esporádica

2.1.1. Modelo celular de cultura primária de ratos neonatos da linhagem Lewis

Ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas e criados no departamento de genética e biologia evolutiva do Instituto de Biociências da USP, são utilizados como modelos de doença de Alzheimer e Parkinson esporádicas para a análise dos eventos celulares anteriores à agregação proteica. Esta linhagem foi escolhida por ser suscetível à agregação de proteínas constitutivas após tratamento com rotenona.

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e colaboradores (2001). Resumidamente, os encéfalos (n=10, por experimento) de ratos neonatos foram removidos e o hipocampo, a substância negra e o locus coeruleus (Figura 11) foram separados e colocados em placa de petri estéril com solução fisiológica gelada. Em seguida, as células foram dissociadas, suspensas em meio de cultura Neurobasal A (Gibco) suplementado e plaqueadas na concentração de 1800 células/mm². As células foram tratadas com 0,3nM ou 0,5nM de rotenona (Sigma), durante 48 horas, 9 dias após o plaqueamento. Para o controle, células foram expostas ao DMSO (Life Technologies, D12345), a 3µM de cloroquina (inibidor de autofagocitose- Sigma, C6628) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia- Sigma, R8781).

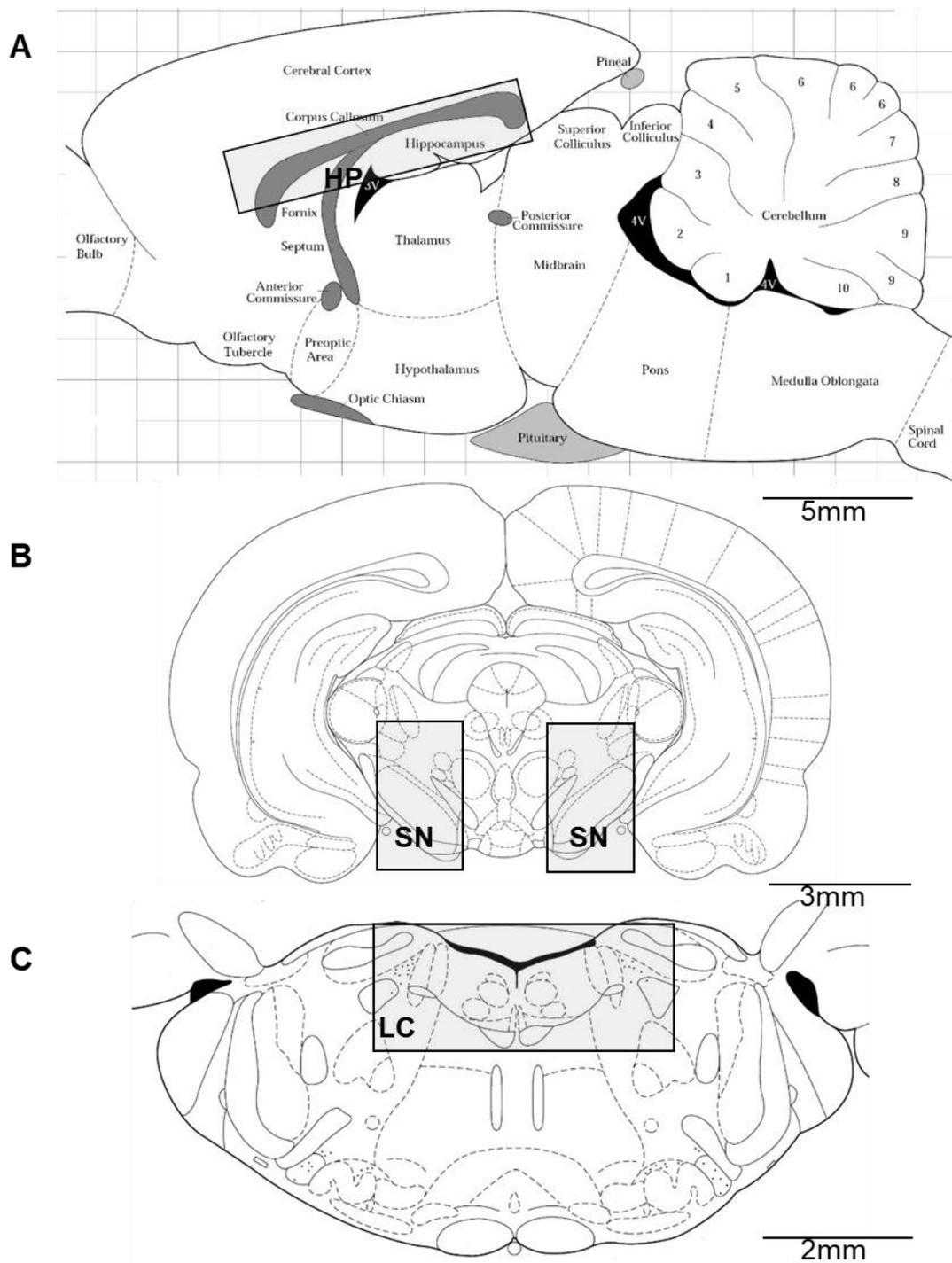


Figura 11: Imagens representativas das áreas da região do encéfalo de ratos que foram dissecadas (quadro cinza) e utilizadas na elaboração da presente pesquisa. Região do hipocampo (HP) (A). Região ventrolateral do mesencéfalo contendo a substância negra (SN) (B). Região dorsomedial da ponte contendo o locus coeruleus (LC). Extraído e modificado de Paxinos e Watson, (2007).

2.1.2. Modelo celular da linhagem SH-SY5Y com células não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico

Células da linhagem SH-SY5Y foram mantidas no meio DMEM (1X) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Para iniciar o processo de

diferenciação celular as células SH-SY5Y foram plaqueadas na densidade de $2,0 \times 10^4$ células/cm² em poços pré-tratados com poli-D-lisina (PDL). No dia seguinte, as células foram expostas a 10µM de ácido retinóico (solução estoque preparada em DMSO, 100mM) em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino por 5 dias, após isso, o meio foi trocado por meio neurobasal suplementado com 10ng/ml de BDNF, com o objetivo de promover o crescimento das extensões neurais. No oitavo dia as células foram transfectadas ou tratadas com rotenona, de acordo com o modelo proposto.

2.2. Caracterização das culturas

2.2.1. Caracterização das culturas de hipocampo, substância negra e locus coeruleus

As culturas primárias foram caracterizadas por meio de imunocitoquímica com anticorpos específicos para a proteína associada ao microtúbulo (MAP2) e para tirosina hidroxilase (TH). Após 11 dias, as células em cultura do hipocampo, substância negra e locus coeruleus foram lavadas com PBS gelado e fixadas com metanol e acetona por 10 minutos a -20°C.

Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,2% de triton em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram bloqueadas com PBS contendo 0,2% de triton, 4% BSA (albumina de soro bovino, Sigma) e 2% de NGS (soro de cabra, Vector laboratories) durante 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-MAP2 (Sigma M4403) e anti-TH (Millipore MAB318), diluídos a uma concentração de 1/1000 em solução com PBS contendo 2% BSA, 1% NGS e 0,2% triton, a 4°C.

As células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a molécula fluorescente FITC (Jackson), na concentração de 1/120 em solução idêntica à utilizada para a incubação dos anticorpos primários.

A quantificação da porcentagem de células expressando TH ou MAP2 foi realizada por meio de fotomicrografias digitais de 4 quadrantes escolhidos aleatoriamente em cada placa de cultura analisada (n=3). A porcentagem das marcações das células positivas para MAP2 e TH foi realizada em relação ao número total de células obtido por meio da marcação do núcleo com DAPI.

2.2.2. Caracterização da cultura de células da linhagem SH-SY5Y diferenciadas e não-diferenciadas com ácido retinóico

As células da linhagem SH-SY5Y foram caracterizadas por meio de imunocitoquímica com anticorpos específicos para a proteína associada ao microtúbulo (MAP2) de forma semelhante à aquela descrita anteriormente para a cultura primária. As células não-diferenciadas e diferenciadas foram quantificadas com base na marcação da proteína MAP2, evidenciando o sucesso na diferenciação das células para células com fenótipo neuronal. De forma complementar, foi-se utilizado o anticorpo contra a proteína mediadora de resposta colapsina, CRMP-2 (C2993, Sigma), expressa no sistema nervoso e envolvida no processo de diferenciação neuronal, em amostras de células diferenciadas e não-diferenciadas, por Western blot, para a verificação da diferenciação celular.

2.3. Exposição das células em cultura à rotenona, cloroquina e rapamicina

Após 9 dias em cultura, as células das 3 regiões analisadas foram expostas a 0,3, 0,5 e 1,0 nM de rotenona, com base em um estudo anterior do nosso laboratório (Chaves et al., 2010). Estas concentrações foram escolhidas porque fornecem informações fisiológicas referentes às fases anteriores à formação de agregados proteicos (0,3nM), durante a agregação (0,5nM), e com agregação proteica (1,0nM) sem morte celular associada.

A rotenona, para os experimentos de cultura primária, foi diluída em DMSO inicialmente, a uma concentração de 1 μ M (solução estoque) e posteriormente foi diluída em meio de cultura. As células SH-SY5Y foram expostas a concentração de 1 μ M de rotenona por 4.5 horas (Hongo et al., 2012). Neste caso, a rotenona foi diluída em DMSO, a uma concentração de 1mM (solução estoque) e posteriormente foi diluída em meio de cultura. O controle foi realizado por meio de culturas de células expostas a meio contendo DMSO a uma concentração de até 0,002%.

Com o intuito de se determinar as concentrações de rapamicina e cloroquina a serem utilizadas nos experimentos de cultura primária, foram realizadas ensaios com diferentes concentrações das duas substâncias nas diferentes áreas analisadas no presente projeto.

A cloroquina foi diluída inicialmente em PBS, em solução estoque de 3mM. No dia do experimento, a solução foi diluída em meio de cultura nas concentrações de 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M por 48 horas. A rapamicina, previamente diluída em DMSO pelo próprio fabricante, foi diluída em meio de cultura no dia do experimento nas concentrações de 10nM e 100nM,

por 48 horas. Posteriormente foram realizados ensaios em algumas amostras para acessar a mortalidade celular por meio de coloração com azul de Tripán (Gibco, 10 μ L).

Com o intuito de se definir quais concentrações geraram respostas na expressão das proteínas autofágicas, foram realizados ensaios para a análise da expressão das proteínas Beclina-1 e p62. Como controle, foram analisadas culturas de células cultivadas em meio de cultura sem a adição de outros compostos.

2.4. Western Blot

As células em cultura foram lisadas e homogeneizadas utilizando-se 100 μ L de tampão de lise constituído de NP40, deoxicolato de sódio, SDS, EDTA, EGTA e coquetel inibidor de proteases (Sigma). A quantidade de proteína foi acessada pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração foi feita utilizando-se albumina em quantidade de 0 a 16 μ g de proteína por poço.

As amostras (20 μ g ou 30 μ g) das culturas de células foram aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida 15% de fracionamento. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose que foi bloqueada e incubada com os seguintes anticorpos primários: anti-beclina-1 (Santa Cruz, sc-11427), anti-p62 (Cell Signaling, #5114) , anti-LC3I e LC3II (Sigma, 7543 e Cell Signaling #3868), para avaliação da maturação de autofagossomos; anti-BAG2 (Novus Biologicals, NBP1-59087) para avaliação de seus níveis endógenos, anti-Flag (Sigma, 7425), anti-tau total (Sigma, T9450), anti-pTau (Sigma, T6819), anti-pink1 (Abcam, ab23707) , anti-parkina (CellSignaling, #213), anti-tom-20 e anti-CRMP-2 para a análise da expressão do plasmídeos eGFPBAG2 (Tabela 2).

Tabela 2: Diluição e condições de incubação padronizadas para os anticorpos primários utilizados.

Anticorpo	Diluição utilizada	Condições de incubação
Anti-beclina-1	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-p62	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-LC3	1:500	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-BAG2	1:500	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-Flag	1:400	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-tau total	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-pTau	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-pink1	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C
Anti-parkina	1:1000	<i>Overnight</i> , 4°C

Anti-tom-20	1:500	Temperatura ambiente, 4h
Anti-CRMP-2	1:7000	Temperatura ambiente, 1h

Os anticorpos secundários foram conjugados a uma peroxidase (HRP). A incubação das membranas com estes anticorpos foi feita à temperatura ambiente durante 1 hora. As membranas foram então lavadas e a marcação foi revelada através de incubação com reagente quimioluminescente (*Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus*, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante 1 minuto e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL, AmershamBiosciences) ou pela utilização do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria Rita Passos Bueno.

O controle de *loading* foi feito com anticorpo contra a beta-actina (Santa Cruz, sc-47778) ou foi utilizado o corante Ponceau-S, para normalização. Os filmes foram quantificados por densitometria óptica usando o programa Image J (NIH).

2.5. Fluxo autofágico

O fluxo autofágico foi monitorado com a utilização do vetor fluorescente LC3-eGFPmCherry. A expressão do eGFP é restrita aos autofagossomos e o mCherry pode ser encontrado nos autofagossomos e autofagolisossomos. O fluxo autofágico foi calculado pela razão entre o número de vesículas apresentando as duas fluorescências (eGFPemCherry), pelas vesículas apresentando apenas o sinal da mCherry (Kimura et al., 2007).

Após 9 dias de cultura, as células de cultura primária foram transfectadas com 1000ng de LC3-eGFPmCherry utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen), de acordo com o protocolo da companhia, seguido de 48 horas de exposição a 0,3 ou 0,5nM de rotenona.

As células foram avaliadas em microscopia confocal nos comprimentos de onda de excitação de 488nm para eGFP e 535nm para mCherry, a emissão foi registrada a 520nm e 620nm, respectivamente. A análise quantitativa dos dados foi realizada utilizando-se o programa Image J (NIH) e o plug-in “*Find maxima*”.

2.6. Análise do papel da BAG2 sobre a autofagia

As células em cultura foram transfectadas com o 1000ng do vetor fluorescente pEGFP-C1 contendo a sequência da co-chaperona BAG2 (open biosystems) associada a sequência Flag, utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante,

seguido de 48 horas de exposição a 0,3 ou 0,5nM de rotenona. As células foram analisadas quanto à expressão de proteínas associadas à autofagia, descritos anteriormente.

2.7. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) usando o programa GraphPadPrism para Windows (versão 5.0, GraphPadSoftware, San Diego, Califórnia, USA), foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização e padronizações

3.1.1. Caracterização da cultura primária de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus

As culturas de células primárias com neurônios e células da glia apresentam uma vantagem de aproximar o modelo *in vitro* com o contexto fisiológico encontrado no cérebro (Chaves et al., 2010). Na figura 12 é possível observar células de cultura primária das três diferentes áreas estudadas ao longo deste projeto, 11 dias após o plaqueamento.

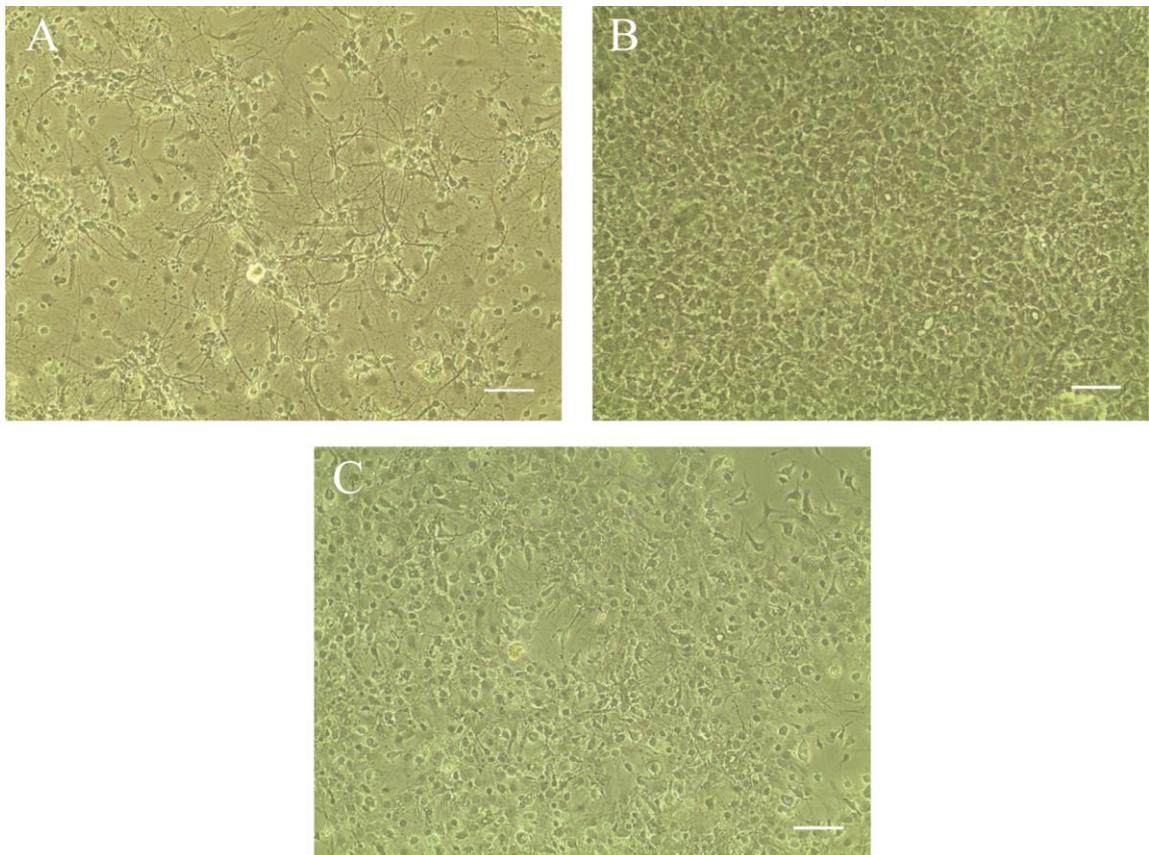


Figura 12: Cultura celular primária de neurônios e células da glia, 11 dias após plaqueamento. Hipocampo (A). Locus coeruleus (B). Substância negra (C). Imagens capturadas na objetiva de 10X. Escala 1000 μ M.

A análise da cultura de células do hipocampo demonstrou que 41% de células são imunopositivas para MAP2 em relação ao número total de células, acessadas pela marcação de DAPI, sendo consideradas, portanto, neurônios (Figura 13A, Tabela 3).

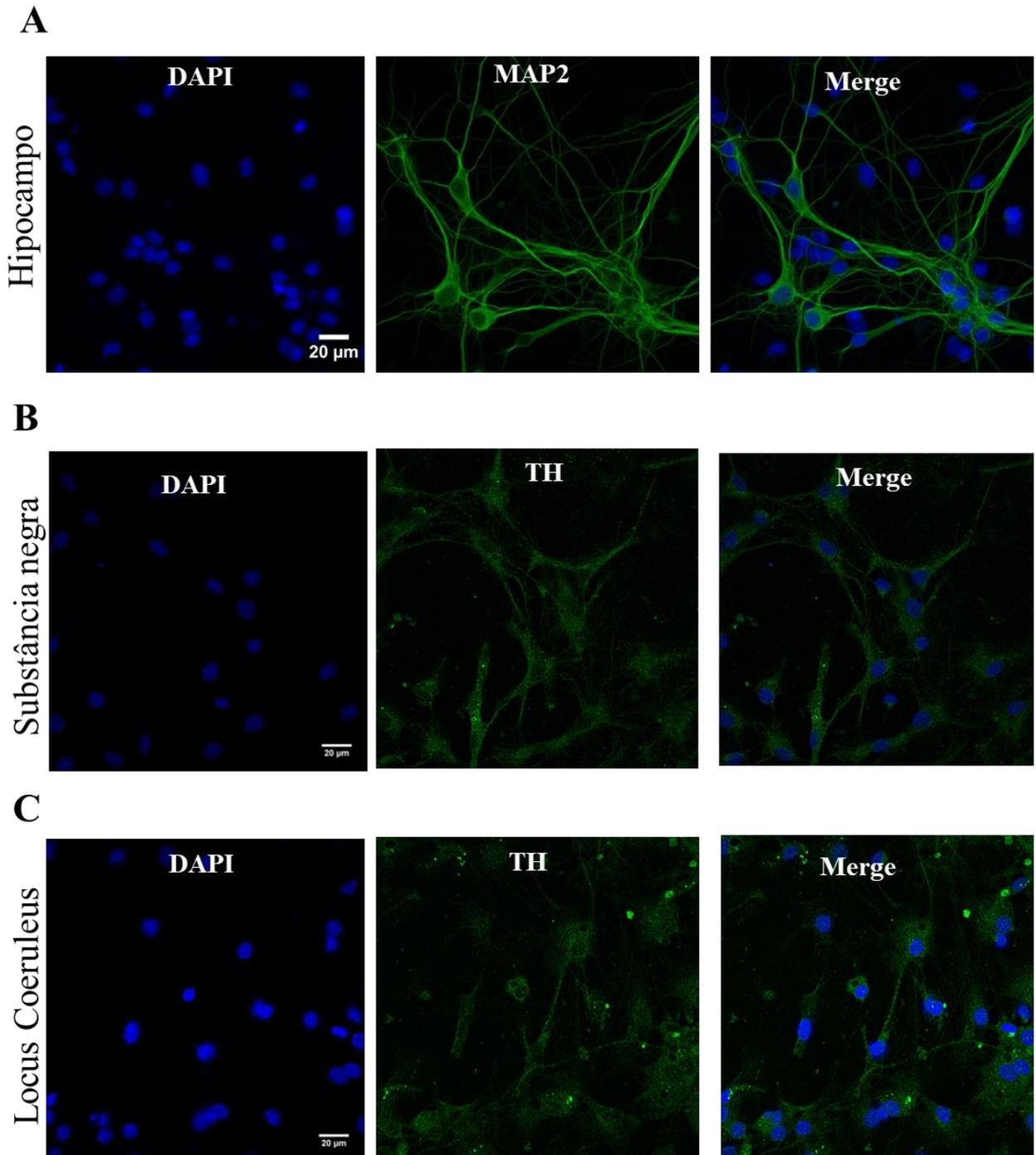


Figura 13: Caracterização da cultura primária de células da glia e neurônios. Fotomicrografias ilustrando a imunoreatividade a MAP2 em células do hipocampo (A) e da tirosina hidroxilase (TH) em células da substância negra (B) e locus coeruleus (C). Imagens capturadas na objetiva de 40X. Escala de 20µM. N=3 (placas por grupo).

Com o intuito de acessar o percentual de neurônios dopaminérgicos, foi realizada uma imunocitoquímica com o anticorpo anti-TH para as células obtidas em cultura das áreas da substância negra e locus coeruleus, revelando um percentual de 86% e 95%, respectivamente (Figura 13B e C, Tabela 2).

Tabela 3: Caracterização da cultura de células de hipocampo, locus coeruleus e substância negra.

Área	DAPI	% Células MAP2 ou TH positivas
Hipocampo	449	184 (41%)
Locus Coeruleus	353	337 (95%)
Substância Negra	122	105 (86%)

3.1.2. Caracterização da cultura de células de linhagem SH-SY5Y

As células da linhagem SH-SY5Y utilizadas no presente projeto foram submetidas ao protocolo de diferenciação com ácido retinóico e BDNF por 8 dias (Figura 14A).

Células não diferenciadas e diferenciadas foram submetidas à imunocitoquímica com o anticorpo anti-MAP2 e a marcação por meio de Western blot com o anticorpo anti-CRMP-2, específico de células neurais, o que evidenciou o sucesso do processo de diferenciação dessas células, em células “*neuron-like*” (Figura 14B).

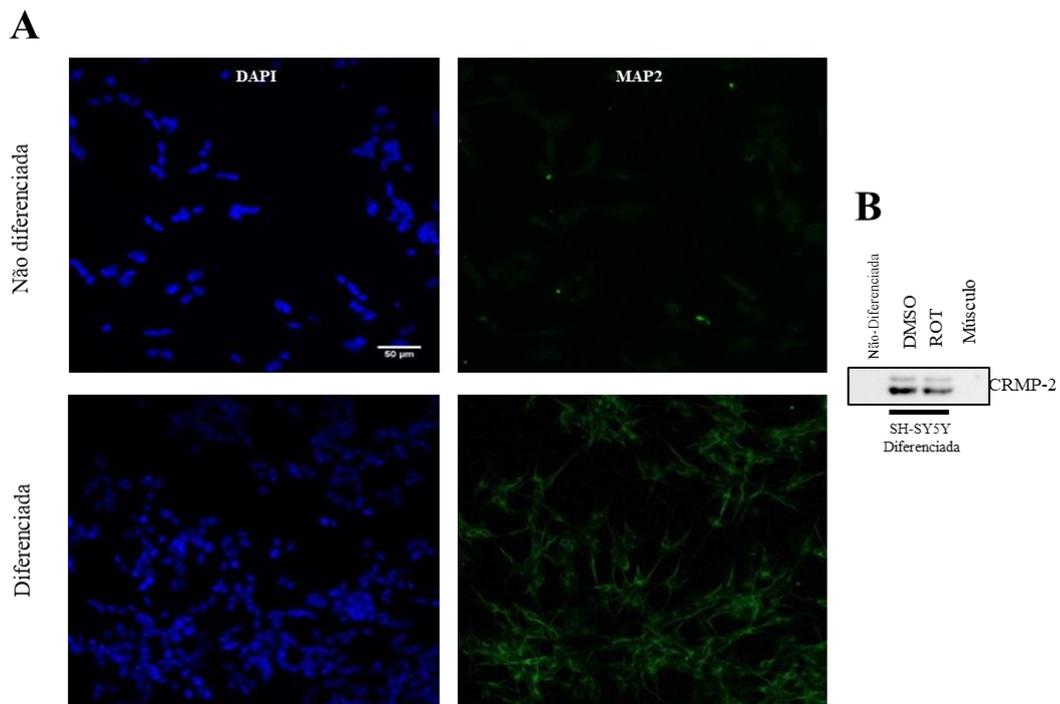


Figura 14: Caracterização da cultura de células da linhagem SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF. Fotomicrografias representativas de células SH-SY5Y expressando o marcador neuronal MAP2. Objetiva 20x. Escala 50µM (A). Western blot representativo para

a imunoreatividade da proteína CRMP-2, uma proteína citosólica expressa no sistema nervoso e envolvida na diferenciação neuronal e na orientação axonal, em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas e células de músculo, como controle negativo (B).

3.1.3. Padronizações para a análise do processo autofágico

3.1.3.1. Determinação das concentrações de cloroquina e rapamicina utilizadas no presente estudo

A autofagia apresenta uma característica importante que é a sua regulação dinâmica. Dependendo do estímulo dado para a célula as respostas geradas podem ser diferentes. Nota-se que a autofagia apresenta uma forte relação com inúmeros processos fisiológicos e patológicos, logo, faz-se necessária a utilização de inúmeras metodologias científicas para que a análise da autofagia- tanto do processo como da sua dinâmica- seja realizada de forma coerente e completa o que salienta a importância da utilização de substâncias no monitoramento da autofagia, para entender onde o processo esta presente e qual o contexto biológico em que ela esta inserida. Logo, fez-se necessário a utilização de controles do processo autofágico, para que a dinâmica da via exercida fosse analisada de forma mais completa.

Com o intuito de se analisar a resposta da autofagia, nas diferentes áreas analisadas, e determinar as concentrações de rapamicina (ativador da autofagia, via inibição do mTOR) e cloroquina (inibidor autofágico, via impedimento da acidificação dos autofagossomos) que seriam utilizadas no decorrer do estudo, foram realizadas culturas primárias do hipocampo, substância negra e locus coeruleus tratadas com diferentes concentrações das referidas substâncias (Figura 15- dados da região do hipocampo).

Inicialmente, a cultura primária de hipocampo foi tratada com diferentes concentrações de cloroquina por 48 horas e, em seguida, foram realizados ensaios de viabilidade celular por meio da marcação com azul de Tripán para acessar a morte celular (Figura 15). Também foram realizados ensaios de Western blot para a detecção das proteínas Beclina-1 e p62 para a análise da tendência de resposta na expressão destas proteínas (Figura 16).

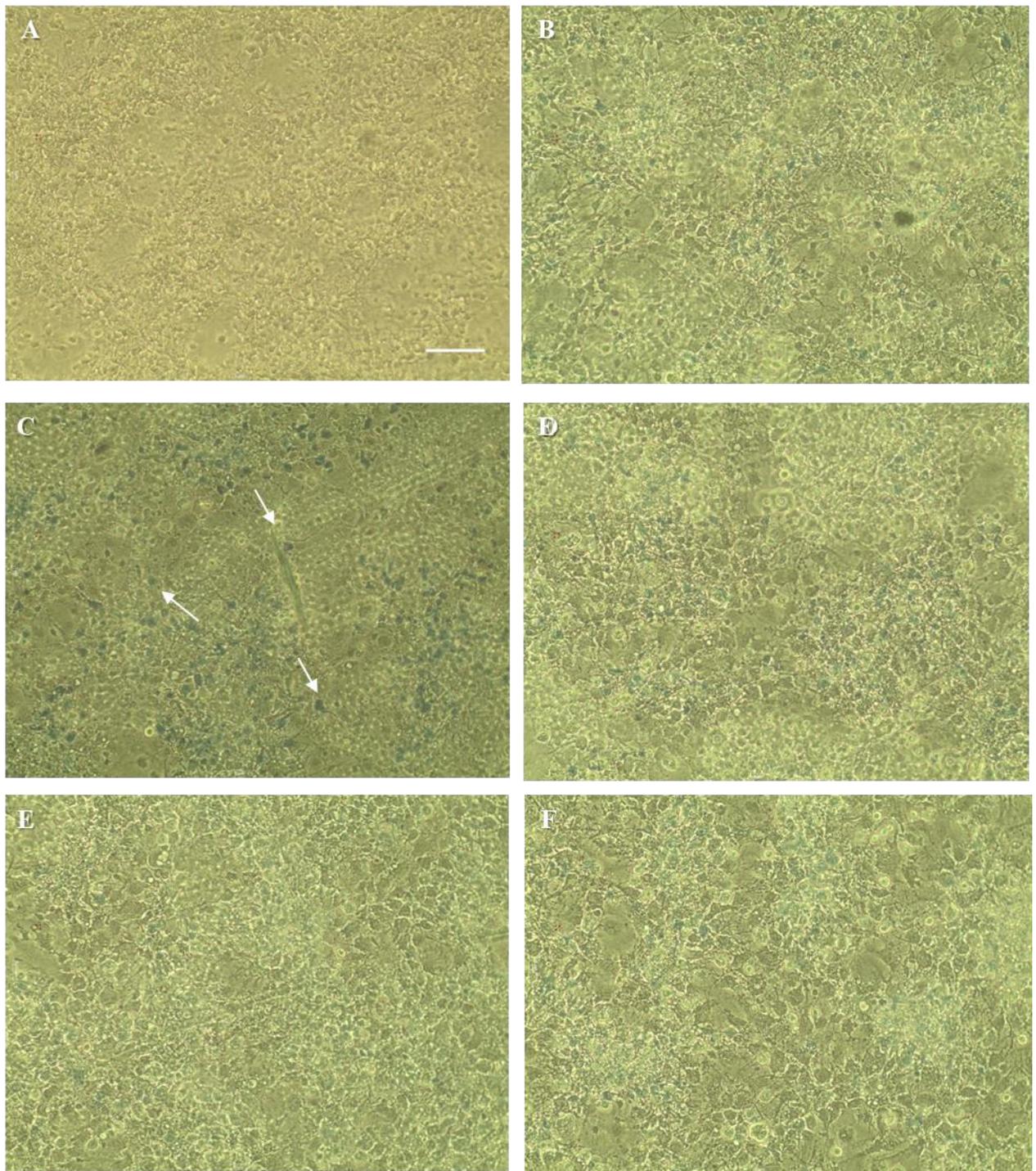


Figura 15: Teste de viabilidade celular com azul de Tripán para diferentes concentrações de cloroquina em cultura de células primária do hipocampo. Células sem tratamento (A). Células sem tratamento tratadas com azul de Tripán (B). Células tratadas com 1 μM de cloroquina e com azul de Tripán (C). Células tratadas com 3 μM de cloroquina com azul de Tripán (D). Células tratadas com 5 μM de cloroquina com azul de Tripán (E). Células tratadas com 10 μM de cloroquina com azul de Tripán (F). Seta branca indica célula morta marcada com o referido corante. 10X aumento. Escala 1000 μM.

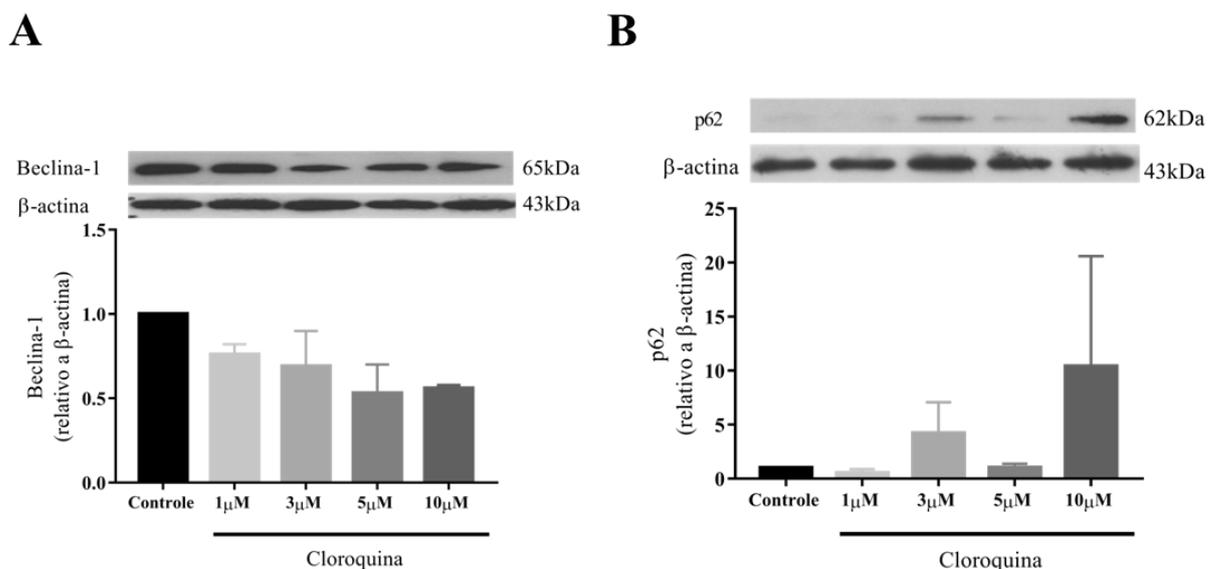


Figura 16: Detecção da expressão das proteínas Beclina-1 e p62 em cultura de hipocampo exposta a diferentes concentrações de cloroquina. Expressão dos níveis de Beclina-1 (A) ou p62 (B) em cultura de hipocampo submetida à exposição de 1 μM, 3 μM, 5 μM e 10 μM de cloroquina, durante 48 horas. Resultados apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

As mesmas análises foram realizadas para as três áreas, mas utilizando as concentrações de 10 e 100 nM de rapamicina para acessar se os efeitos da substância como ativadora da autofagia seria alcançados, sem morte celular associada (Figura 17).

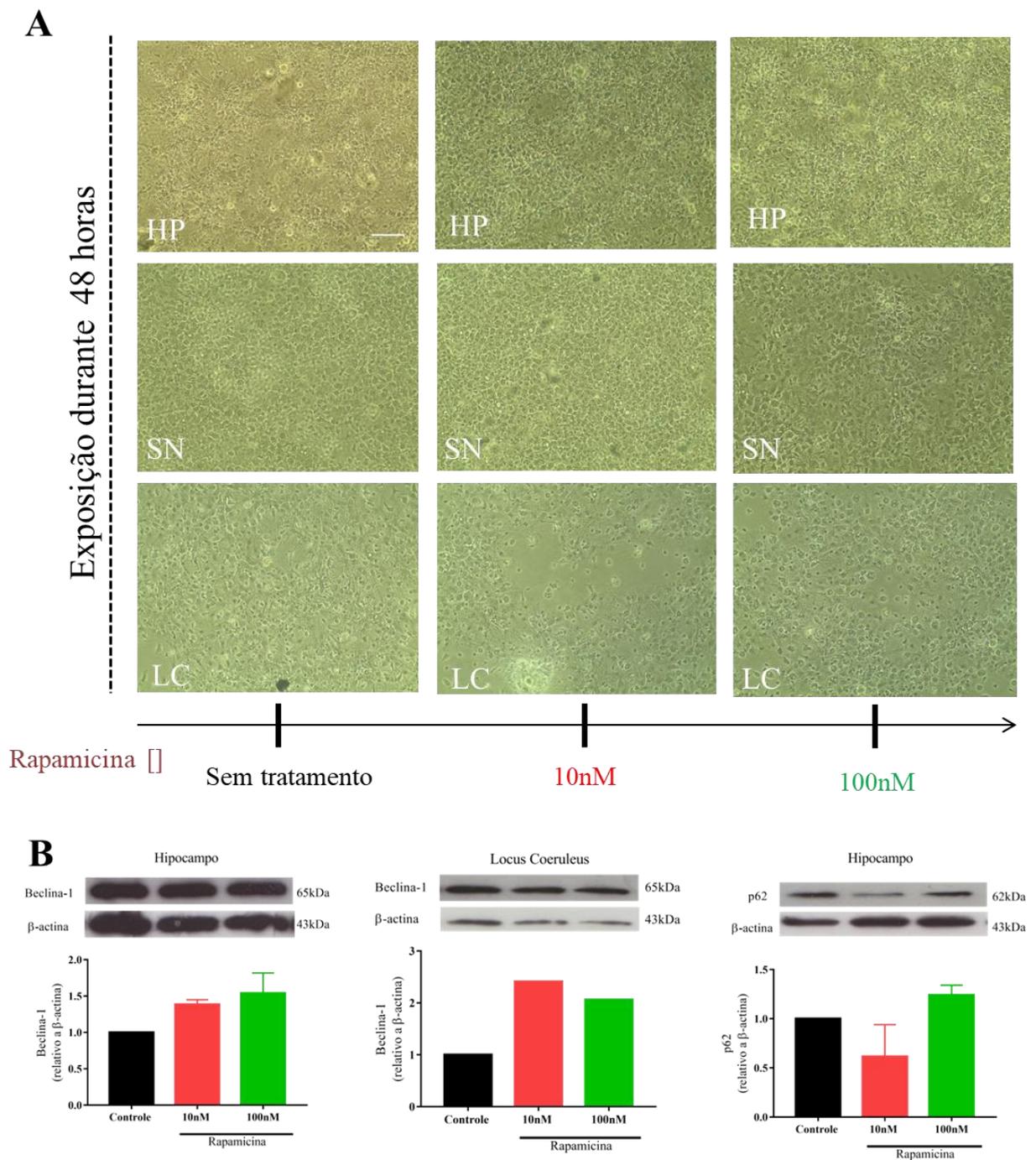


Figura 17: Teste de viabilidade celular com azul de Tripán para diferentes concentrações de rapamicina em cultura de células primária de hipocampo, substância negra e locus coeruleus. Fotomicrografias digitais de cultura de células do hipocampo (HP), substância negra (SN) e locus coeruleus (LC), sem tratamento ou expostas a 10 e 100nM de rapamicina durante 48 horas, marcadas com azul de Tripán para identificação de morte celular. 10x aumento. Escala 1000 μ M (A). Expressão dos níveis de Beclina-1 ou p62 em cultura de hipocampo e locus coeruleus submetidas à exposição de 10 e 100nM de rapamicina durante 48 horas (B). Resultados apresentados como média \pm SEM de dois experimentos independentes para Beclina-1 e p62 para a região do hipocampo ou como unidades arbitrárias para a região do locus coeruleus. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

Os níveis de Beclina-1 apresentaram uma leve diminuição com o aumento das concentrações de cloroquina para as áreas do hipocampo e locus coeruleus (dado não mostrado) e os níveis de p62, ressaltaram uma tendência ao aumento da expressão da proteína de acordo com o aumento das concentrações de cloroquina (Figura 16). A análise da viabilidade celular com a utilização do azul de Tripán demonstrou que a utilização de cloroquina pode levar a morte celular em concentrações superiores a 5 μ M (Figura 15).

A morte celular associada ao tratamento com rapamicina foi menos expressiva nas três áreas analisadas, demonstrando pouca ou nenhuma morte celular em decorrência dos tratamentos realizados (Figura 17A). As respostas no nível de expressão da proteína Belcina-1 foi semelhante entre as regiões do hipocampo e locus coeruleus – com aumento na sua expressão (Figura 17B). Para os níveis de p62, podemos notar um aumento na expressão para a concentração de 100nM de rapamicina no hipocampo (Figura 17B). O mesmo resultado foi obtido para a região do locus coeruleus (dado não mostrado).

Com base nos estudos e das análises demonstradas no referido tópico foram escolhidas as concentrações de 100nM de rapamicina e 3 μ M de cloroquina a serem utilizadas ao longo da pesquisa.

3.1.3.2. Padronização da transfecção com o plasmídeo LC3mCherryGFP para análise do fluxo autofágico em cultura primária de hipocampo

Com o intuito de se analisar as melhores condições de transfecção para o plasmídeo eGFPLC3mCherry, associada a menor quantidade de morte celular possível, foram realizados testes de transfecção para o referido plasmídeo em cultura de células de hipocampo com 1000ng de DNA para 1 e 2 horas e 1500ng de DNA por 2 horas – último com dado não mostrado, devido a grande quantidade de morte celular (Figura 18).

Com análise das imagens confocais obtidas, foi determinada a concentração e 1000ng de DNA, com transfecção por 2 horas com lipoafectamina 3000, como sendo a padrão para os demais experimentos realizados. A porcentagem de células transfectadas foi de, aproximadamente, 20% em comparação com as células totais (visualizadas pela marcação do núcleo por DAPI).

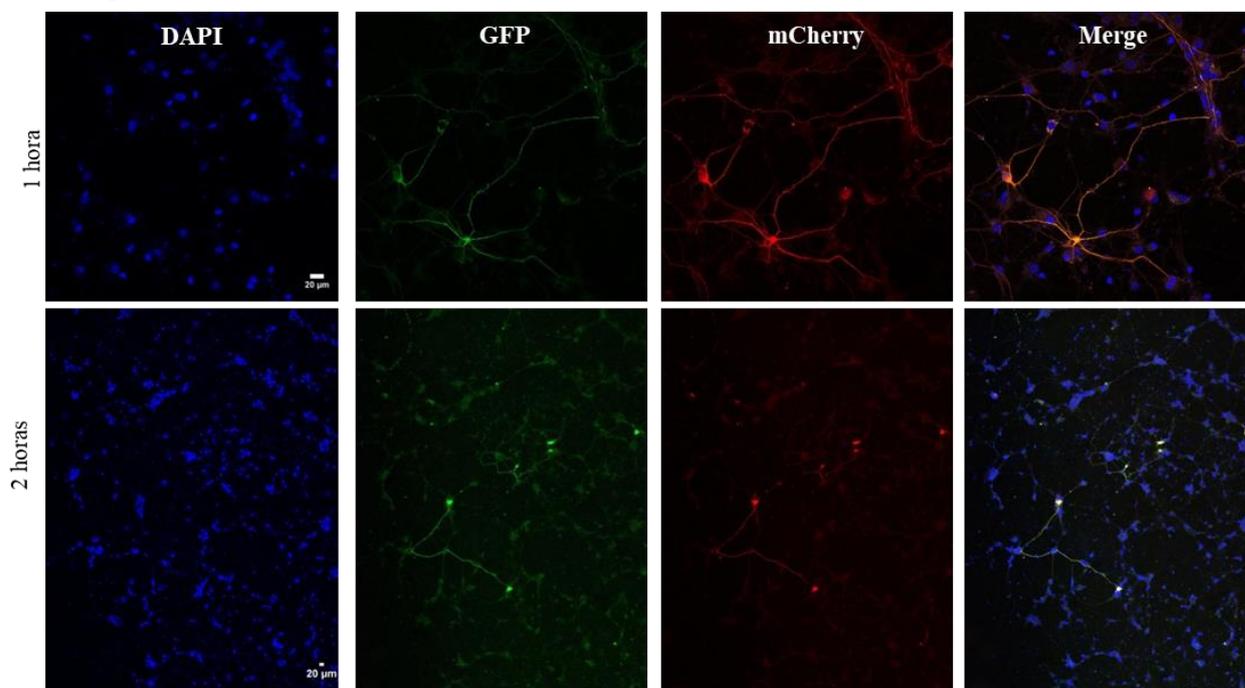


Figura 18: Padronização da transfecção com plasmídeo eGFPLC3mCherry em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis. Transfecção com concentração de 1000ng de plasmídeo por 1 hora ou 2 horas para verificação do número total de células (DAPI) e de células transfectadas (GFP e mCherry). Aumento de 40X (1 hora) e 20X (2 horas). Escala 20μM.

3.1.3.3. Padronização da transfecção com o plasmídeo eGFPBAG2-Flag

Inicialmente, foram realizados testes de transfecção com lipoafectamina 3000 para o plasmídeo eGFPBAG2-Flag, em cultura de células de hipocampo com 1000ng de DNA para 1 e 2 horas (figura 19A) e 1500ng por 2 horas (dado não mostrado, devido ao grande número de morte celular associada), para determinar as melhores condições para a transfecção nas culturas primárias. As amostras com 1000ng de plasmídeo foram submetidas ao Western blot com a marcação para a proteína Flag, demonstrando que, com 2 horas de transfecção, têm-se um aumento de quase 2 vezes nos níveis proteicos da proteína de interesse (Figura 19B).

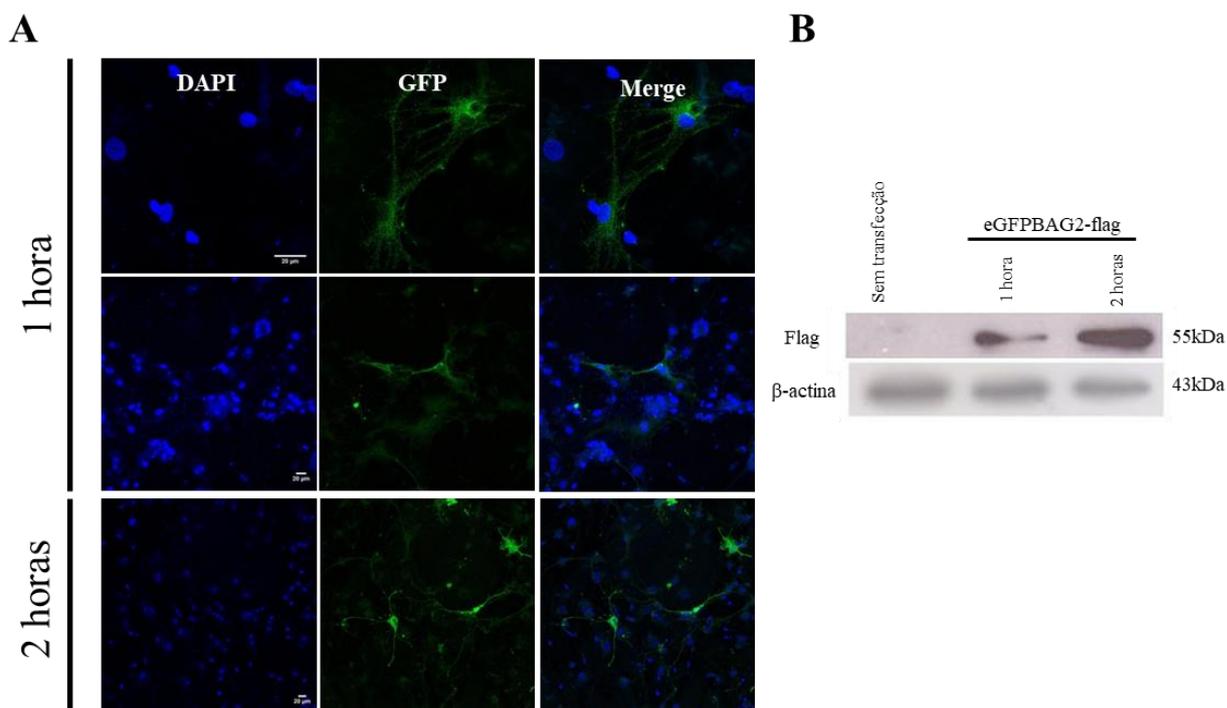


Figura 19: Padronização da transfecção com plasmídeo eGFPBAG2-Flag em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis. Transfecção com concentração de 1000ng de plasmídeo por 1 hora ou 2 horas para verificação do número total de células (DAPI) e de células transfectadas (GFP positivas). Objetiva de 40X. Escala 20 μ M (A). Expressão da proteína Flag em amostras de cultura de hipocampo não transfectadas, e transfectadas com 1000ng de DNA por 1 ou 2 horas (B).

Posteriormente, fora realizado um teste de imunofluorescência para a proteína MAP2, com o intuito de se verificar a quantidade de neurônios que foram transfectados com o referido plasmídeo (Figura 20), obtendo uma média de 20% células transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2, com 7,2% de neurônios transfectados.

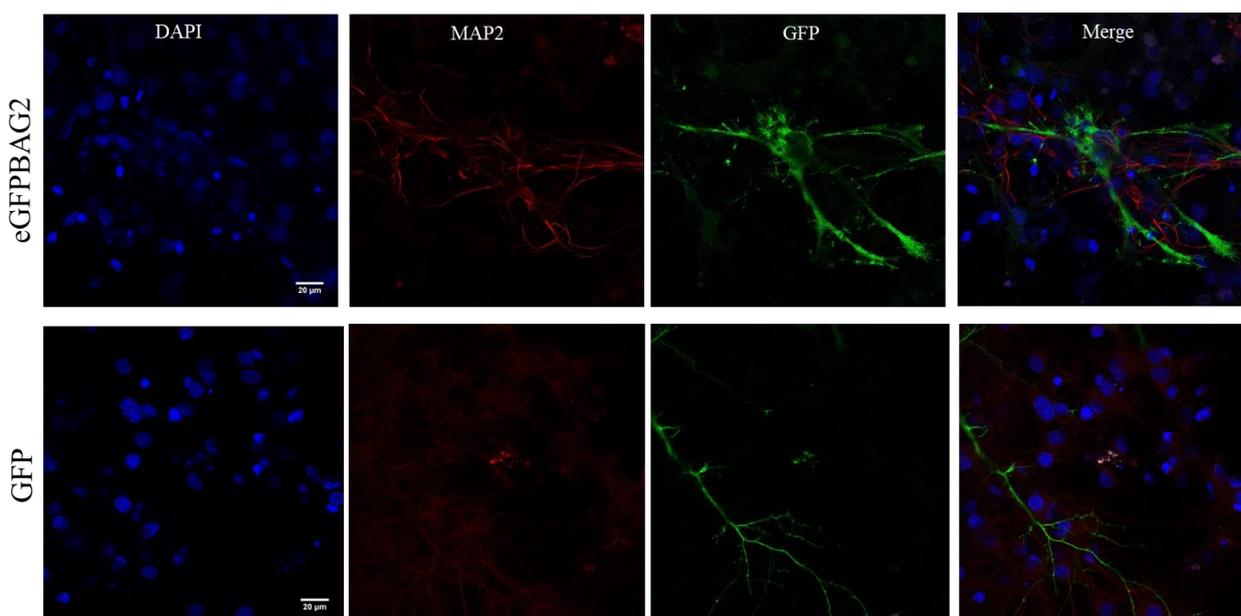
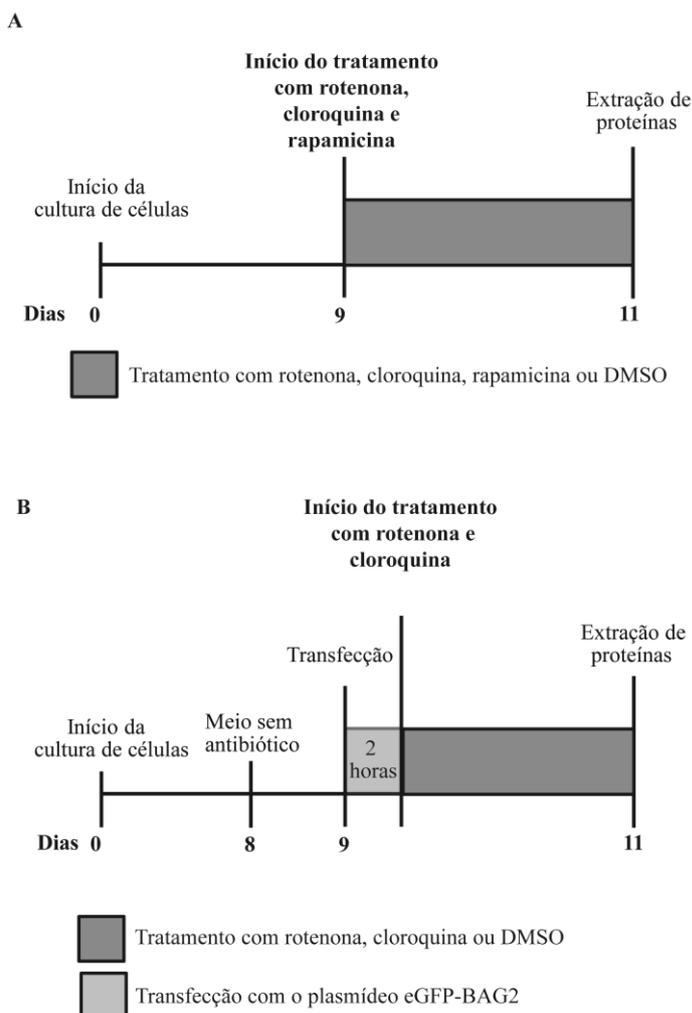


Figura 20: Imagens digitais representativas da transfecção com plasmídeo eGFPBAG2-Flag ou GFP em cultura de células de hipocampo de ratos neonatos Lewis. Células expressam BAG2 ou GFP sozinho, com marcador nuclear DAPI e com marcador neuronal MAP2. Células foram transfectadas com concentração de 1000ng de plasmídeo por 2 horas. Objetiva de 40X. Escala 20 μ M.

3.2. Análise da autofagia e da superexpressão da co-chaperona BAG2 em cultura primária de células das regiões do hipocampo, substância negra e locus coeruleus

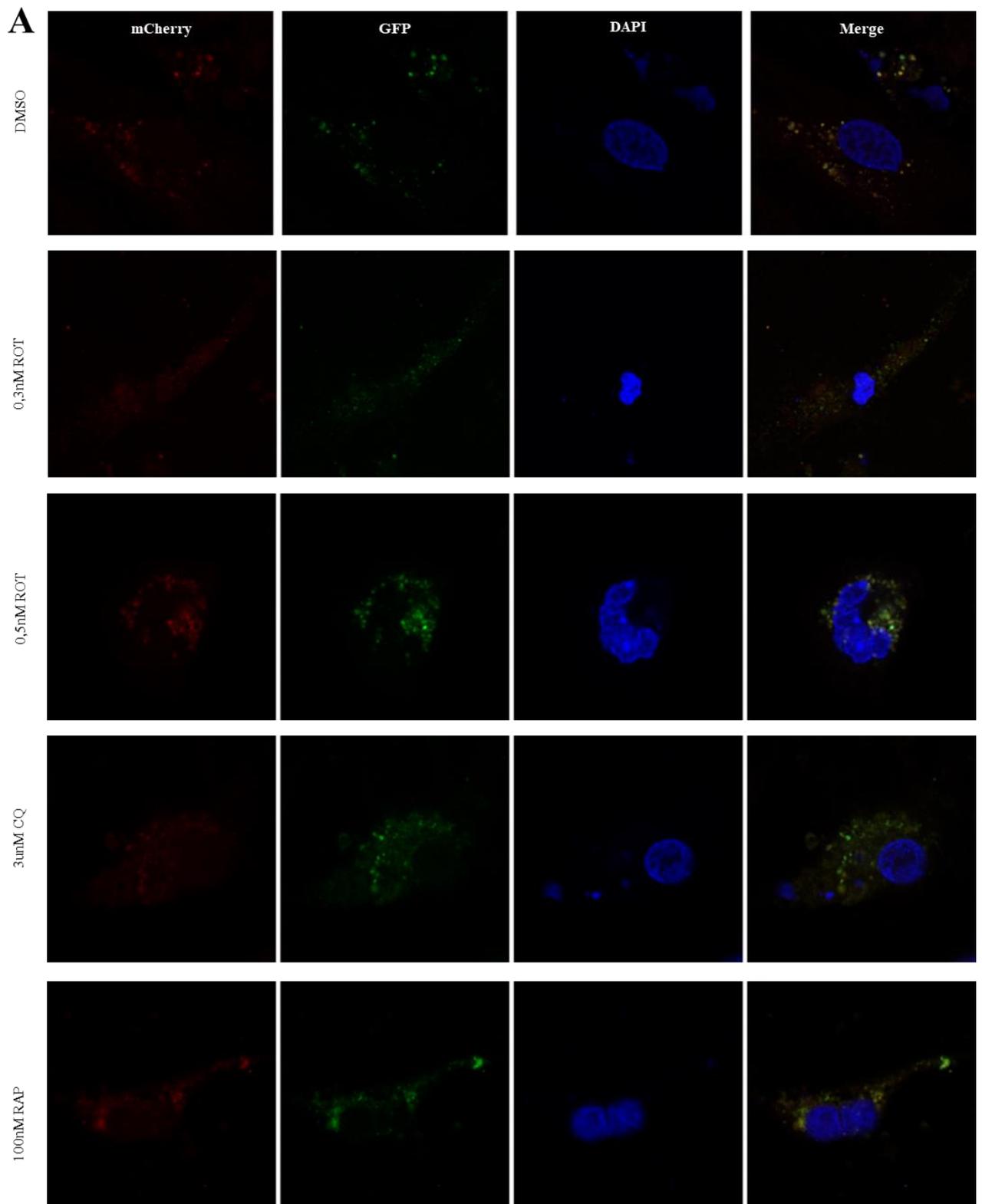
Com base nos dados obtidos no trabalho anterior publicado no laboratório (Chaves et al., 2010) e com os estudos referentes as respostas geradas utilizando-se diferentes concentrações de cloroquina e rapamicina, produzidos nesta pesquisa, foi possível delimitar o protocolo experimental das culturas de células que foram tratadas com as substâncias citadas, sem transfecção (Figura 21A). Em um segundo momento, as células de cultura primária foram transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2-Flag (ou com GFP apenas, como controle) (Figura 21B). Com o intuito de simplificar o entendimento da pesquisa, os resultados obtidos foram divididos de acordo com as áreas encefálicas analisadas.



3.2.1. Hipocampo

3.2.1.1. Fluxo autofágico diminui em momento anterior à agregação proteica em cultura de células do hipocampo

Como citado anteriormente, disfunções autofágicas são comuns em diferentes doenças neurodegenerativas (Menzies et al., 2017). Com o objetivo de verificar o estado do processo autofágico em diferentes cenários de agregação proteica – antes (0,3nM de rotenona) e durante (0,5nM de rotenona) a agregação - diferentes análises foram realizadas. Inicialmente, as células hipocampais foram transfectadas com o plasmídeo LC3GFPmCherry, com o objetivo de acessar a dinâmica do processo, por meio da análise do fluxo autofágico (Figura 22).



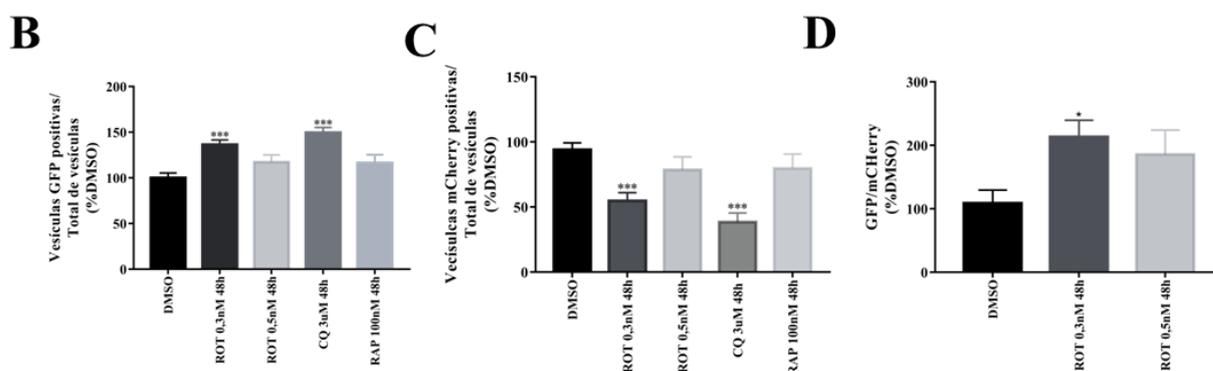


Figura 22: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células do hipocampo expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3μM de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas. Fotomicrografias representativas de células expressando LC3mCherryGFP (A-página anterior). Quantificação do número de vesículas expressando GFP (B). Quantificação do número de vesículas expressando mCherry (C). Quantificação do fluxo autofágico (D). Os dados estão representados com porcentagem do controle (DMSO) ± SEM *p<0,05; e ***p<0,0001. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste Bonferroni, com dados obtidos pelo plugin *Find Maxima*, do Image J. N=6 células por experimento (4 experimentos independentes).

A análise de variância de uma via ANOVA revelou que o tratamento com rotenona gerou um efeito no número de vesículas não-ácidas (GFP positivas -[F(4,231)=10.61; p<0.0001]), nas vesículas ácidas (mCherry positivas -[F(4,257)=10.43; p<0.0001]) e na razão entre elas [F(2,129)=3.937; p<0.05] (Figuras 22 B-C). O pós-teste de Bonferroni revelou que tratamento com 0,3nM de rotenona, correspondente ao cenário anterior à agregação proteica, levou ao aumento das vesículas não-ácidas e à diminuição das vesículas ácidas, semelhante aos resultados obtidos com a cloroquina, o que sugere uma disfunção autofágica, em que os autofagolisossomos não estão sendo degradados (Figura 22). Curiosamente, com a agregação proteica (0,5nM de rotenona) o fluxo autofágico foi reestabelecido a níveis normais, quando comparado com o controle.

A autofagia é um processo altamente regulado, que conta com a participação de inúmeras proteínas, em diferentes momentos da via. Para saber, de forma mais específica, qual parte do processo estava sendo afetado, um Western blot para três diferentes proteínas associadas à autofagia, foi realizado (Figura 23).

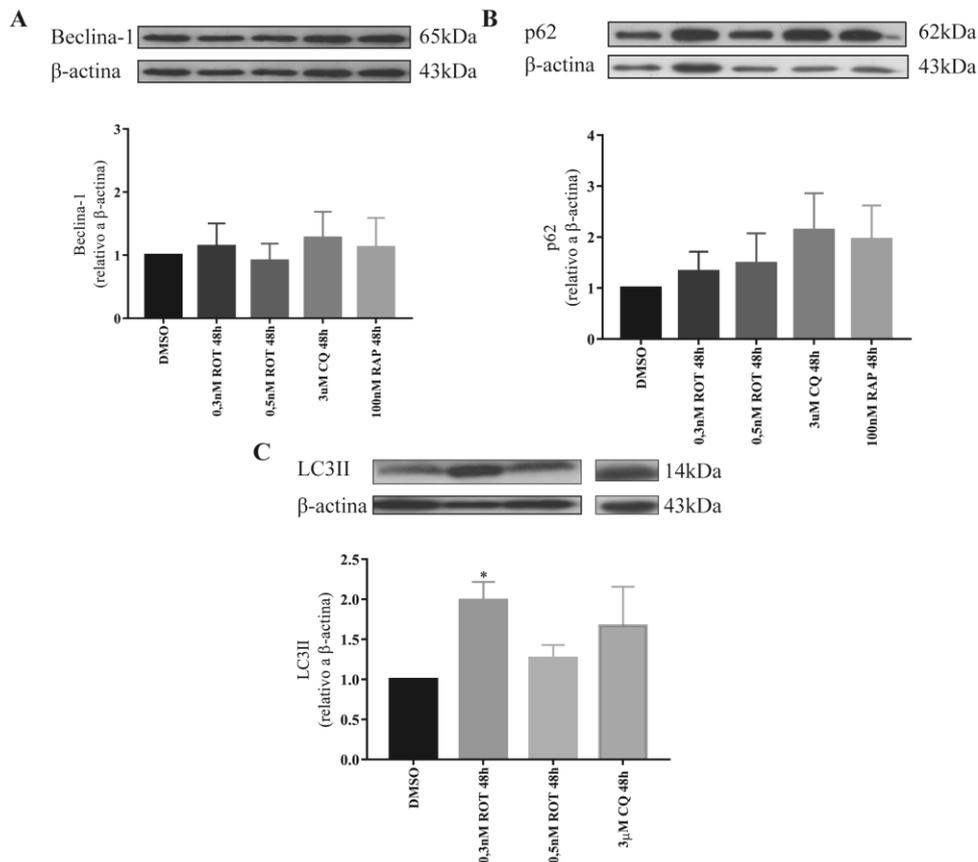


Figura 23: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1, p62 e LC3, em cultura primária de células do hipocampo. Níveis de Beclina-1 (A), p62 (B), LC3II (C) em cultura de células do hipocampo expostas a DMSO (controle), 0,3 e 0,5 nM de rotenona, 3 μ M de cloroquina e 100nM de rapamicina, por 48 horas. Resultados apresentados média \pm S.E.M. Análise de variância de uma via ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Resultado obtido com base em 5 (Beclina-1 e p62) e 4 (LC3II) experimentos independentes.* $p < 0,05$ (comparado ao controle DMSO).

É importante ressaltar que a análise dos níveis de LC3 mostrou-se desafiadora, uma vez que a detecção foi difícil de ser obtida. A análise da proteína LC3II demonstrou que existe um efeito da rotenona sobre os níveis proteicos analisados [$F(3,14)=4.887$; $p < 0,05$], com um aumento significativo em 0,3nM de rotenona e um restabelecimento aos níveis iguais ao controle em 0,5nM do pesticida (Figura 23C) As células desta região apresentaram uma tendência no aumento da expressão da proteína p62 com 0,3 e 0,5nM de rotenona para o hipocampo o que sugere uma supressão autofágica anterior e durante a agregação proteica, uma vez que a p62, por poder ligar-se a LC3, é considerada um substrato seletivo para a autofagia, logo, seu acúmulo pode ser relacionado a problemas nesta via (Figura 23B). Tanto a detecção quanto à interpretação dos resultados alcançados para a proteína LC3II apresentam inúmeras controvérsias na literatura. A utilização de controles para a autofagia mostra-se necessária como ponto comparativo para os resultados obtidos, assim como a presença de um grupo experimental em que a rotenona e a cloroquina são adicionadas juntas ao meio de cultura (não realizado na presente pesquisa) que levaria ao enriquecimento da análise conforme proposto por Mizushima et al. (Mizushima et al., 2010).

Os níveis da proteína Beclina-1 não sofreram alteração (Figura 23A) o que sugere que as modificações geradas pelo tratamento com a rotenona, não interferem no início do processo autofágico para estas áreas.

O modelo estabelecido no laboratório, descrito em 2010 (Chaves et al., 2010), revelou a formação agregados proteicos de peptídeo A β , α -sin e pTau, sem morte celular associada nas três áreas analisadas, com aumento nos níveis de pTau tempo e concentração dependentes de rotenona para a região do hipocampo (Chaves et al., 2016), demonstrando que a utilização de concentrações baixas do pesticida é capaz de mimetizar um cenário anterior e durante à agregação, corresponde aos tratamentos com 0,3 e 0,5nM de rotenona, respectivamente. Os autores descreveram a migração da proteína tau hiperfosforilada dos neuritos para o corpo celular dos neurônios analisados, assim como um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em 0,3nM de rotenona e diminuição na atividade proteolítica do proteassomo com 0,3 e 0,5nM de rotenona (Chaves et al., 2010, 2016). O tratamento com 500nM de rotenona levou ao aumento dos níveis da proteína LC3II e da p62 em células PC12 e induziu ao acúmulo de substratos autofágicos (p62 e α -sin) e aumento da permeabilidade dos lisossomos em neurônios dopaminérgicos (Wu et al., 2015) demonstrando um papel neurotóxico da rotenona no estabelecimento de diferentes modelos celulares de neurodegeneração.

De forma conjunta, os dados obtidos até o momento, sugerem a existência de uma disfunção na autofagia no nosso modelo de neurodegeneração esporádica que é anterior à agregação proteica e que afeta, de forma mais específica, os momentos finais do processo autofágico, para a região do hipocampo.

3.2.2. Superexpressão da co-chaperona BAG2 elevou os níveis da proteína p62 em células de cultura de hipocampo tratadas com rotenona.

Inúmeras co-chaperonas têm sido estudadas dentro do contexto da autofagia e da mitofagia, principalmente nas doenças neurodegenerativas, uma vez que são fundamentais na seleção dos substratos e no seu direcionamento para degradação, assim como na deflagração de respostas intracelulares que aumentam a capacidade das células em lidar com a disfunção proteica.

Estudos recentes demonstraram que os membros da família BAG atuam como moduladores de outras chaperonas sendo fundamentais na modulação de algumas proteínas

específicas. A BAG2, por exemplo, é capaz de induzir a degradação da proteína pTau pela via do proteassomo de forma independentemente de ubiquitina (Carrettiero et al., 2009), por meio da inibição da E3 ubiquitina ligase CHIP, fundamental para a maquinaria canônica de degradação da tau (Schönbühler et al., 2016). A mesma co-chaperona também apresenta um papel fundamental na mitofagia. A BAG2 liga-se diretamente as proteínas Pink-1 selvagem e mutante levando à sua estabilização por meio da diminuição de sua ubiquitinação (Che et al., 2013). A BAG2, portanto, previne a ubiquitinação não regulada de proteínas mal-enoveladas em um mecanismo regulatório dependente de chaperonas (Che et al., 2013). No entanto, até o presente momento, nenhum dado na literatura mostrou o papel da co-chaperona BAG2 sobre o processo autofágico, apesar de inúmeros artigos terem trabalhado o tema referente à BAG3, membro da mesma família das proteínas BAG (Gamerding et al., 2011; Sariyer et al., 2012).

Com o intuito de verificar se a BAG2 poderia parcialmente reverter os prejuízos autofágicos nos cenários de agregação proteica analisados até o momento, células do hipocampo foram transfectadas com o plasmídeo eGFP-BAG2 ou com GFP para controle e, posteriormente, as placas foram tratadas com rotenona ou controles por 48 horas. A figura 24 ilustra as quantificações obtidas por meio de Western blot para as proteínas autofágicas em três experimentos independentes.

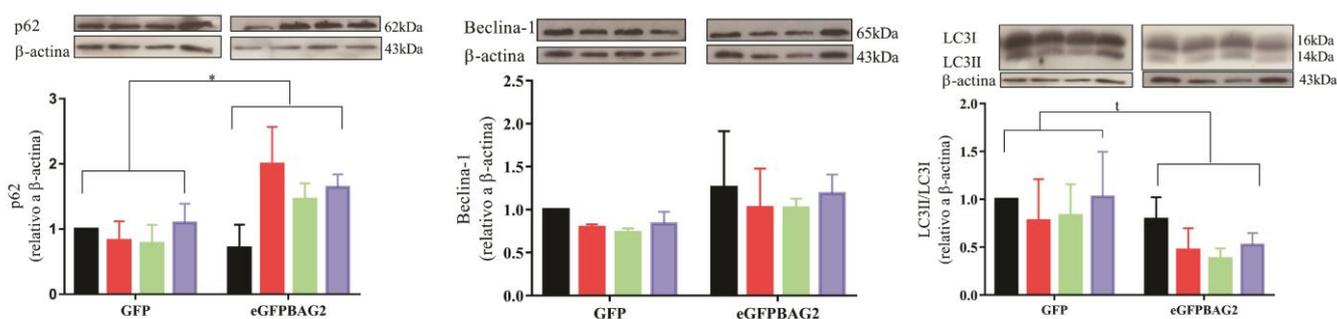


Figura 24: Expressão das proteínas p62, Beclina-1 e LC3 em cultura primária de células hipocampo transfectadas com BAG-2. Níveis de p62, Beclina-1 e LC3 em cultura de células do hipocampo transfectadas com 1µg do plasmídeo eGFPBAG2-flag ou com eGFP (controle), expostas a DMSO (preto; controle), 0,3 (vermelho) e 0,5 nM (verde) de rotenona e 3µM de cloroquina (azul), por 48 horas. Dados apresentados como média ± S.E.M. de três experimentos independentes. A análise de variância de duas vias ANOVA, revelou que a chaperona BAG2 elevou os níveis da proteína p62 nas amostras analisadas de forma significativa (*p<0,05), assim como uma tendência de diminuição na razão LC3II/LC3I para o grupo transfectado com eGFPBAG2 (t=0,08). A comparação entre os grupos com o pós-teste de Bonferroni não revelou diferenças estatísticas dentro dos grupos analisados.

A superexpressão de BAG2 levou ao aumento nos níveis da proteína p62 [F(1,15)=4.961; p<0,05] de acordo com a ANOVA de duas vias assim como demonstrou uma tendência na diminuição na razão entre LC3II e LC3I (p=0.08), independentemente do tratamento com

rotenona. Os dados obtidos até o momento apontam para um efeito da co-chaperona analisada nas fases finais da via autofágica para a região hipocampal (Figura 24).

3.2.3. Tratamento com 1nM de rotenona gerou disfunções na proteína pTau e diminuição nos níveis proteicos da proteína BAG2 endógena

Dados recentes na literatura apresentaram um papel da BAG2 na mitofagia (Che et al., 2013; Qu et al., 2015) e na degradação da pTau pelo proteassomo de forma independente da ubiquina (Carrettiero et al., 2009; de Paula et al., 2016). Além disso, o trabalho do nosso colaborador demonstrou que a BAG2 atua em um contexto específico para a degradação da pTau (de Paula et al., 2016). Com bases nessas evidências da literatura e nas análises demonstradas até o momento, decidimos testar se os efeitos da co-chaperona BAG2 seriam mais explícitos, dentro do nosso modelo, em uma situação posterior à agregação proteica, já envolvendo uma formação mais pronunciada de agregados proteicos.

Para testar essa hipótese, inicialmente foram analisadas as amostras tratadas com DMSO e 1nM de rotenona, concentração esta que apresenta agregados proteicos (Chaves et al., 2010) e cloroquina como controle comparativo. As células foram tratadas por 48 horas e as proteínas foram extraídas e quantificadas (Figura 25).

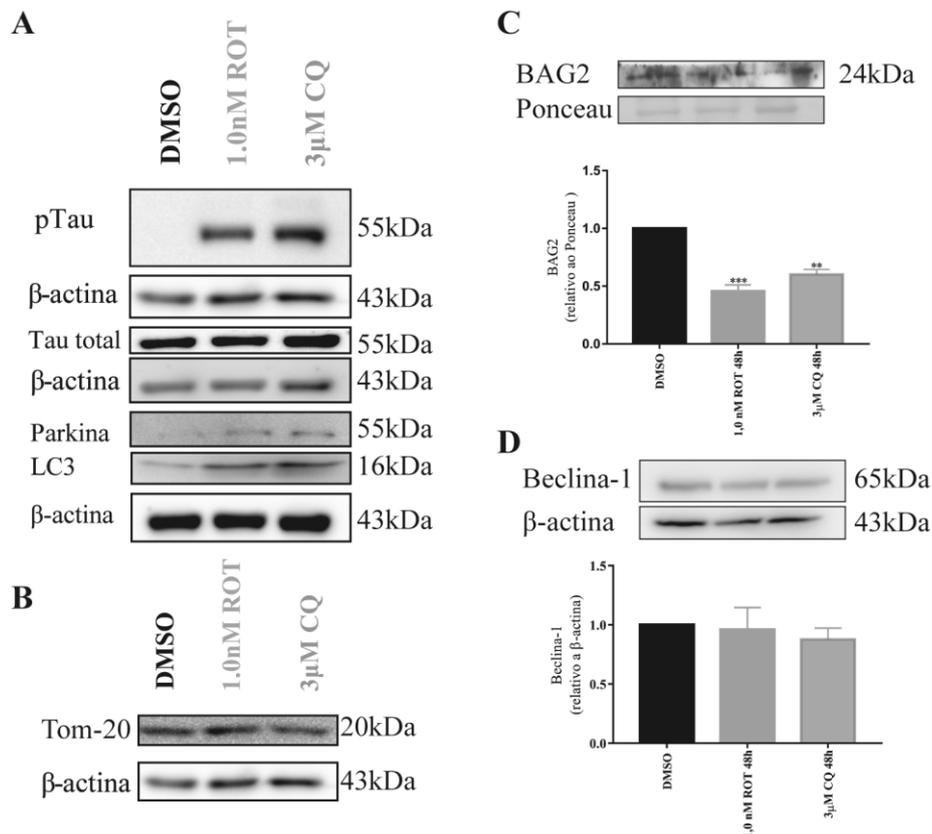


Figura 25: Expressão de proteínas da autofagia e mitofagia em cultura primária de células do hipocampo. Cultura de células do hipocampo tratadas com DMSO (controle), 1,0nM de rotenona ou 3µM de cloroquina por 48 horas com os níveis de proteínas marcadas conforme indicado (A). Níveis de marcador de mitocôndria Tom-20 (B). Quantificação dos níveis de BAG2 (C) e Beclina-1 (D). Resultados apresentados como média ± S.D. de três experimentos independentes. Análise de variância de uma via ANOVA com pós-teste de Bonferroni. **p<0,01 e ***p<0,001.

É possível notar um aumento nos níveis proteicos da tau hiperfosforilada em decorrência do tratamento com 1nM de rotenona, sem uma modificação nos níveis totais da proteína tau (Figura 25A). Os níveis de Parkina também aumentaram com o tratamento com rotenona de forma semelhante ao tratamento com cloroquina (Figura 25A), sem que ocorressem modificações nos níveis da proteína Tom-20 (Figura 25B). Este cenário sugere uma disfunção na via de degradação da mitocôndria, no entanto, não foi possível obter uma marcação para a proteína Pink-1. Dados ainda não publicados no laboratório revelaram que o anticorpo utilizado não foi capaz de detectar a proteína Pink-1 em amostras de ratos neonatos (Figura Suplementar 1).

Nenhuma modificação foi encontrada para a proteína Beclina-1, o que aponta, de forma mais contundente, que as modificações na autofagia observadas no modelo proposto até o momento, não ocorrem no início da via. A análise dos níveis da co-chaperona BAG2 endógena, demonstrou uma diminuição significativa com o tratamento com 1nM de rotenona (p<0,001) e com a cloroquina (p<0,01), sugerindo que o tratamento com o pesticida afeta

também os níveis da co-chaperona analisada, algo inédito na literatura e que auxilia na melhor caracterização do modelo proposto (Figura 25C).

Em seguida, as células foram transfectadas com BAG2 para testar quais seriam os efeitos da superexpressão nos níveis das proteínas pTau e tau total (Figura 26), no entanto, nenhuma diferença significativa foi observada. Uma possível explicação para essa observação pode dizer respeito à eficiência de transfecção, uma vez que um número pequeno de neurônios foram de fato transfectados com o plasmídeo eGFP-BAG2 (Figura 18).

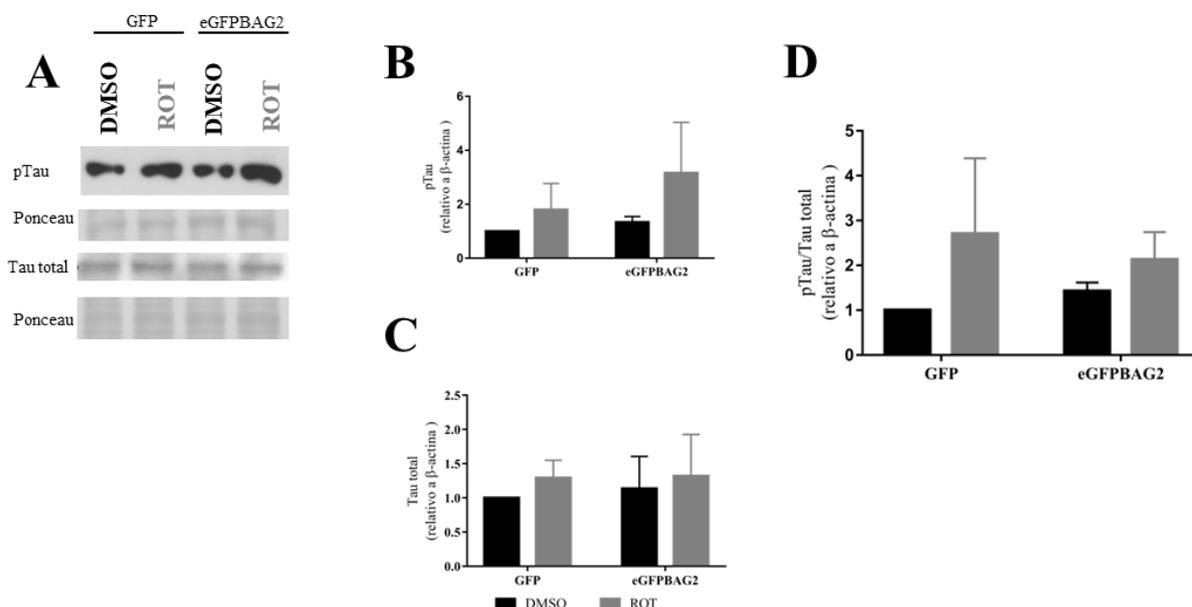


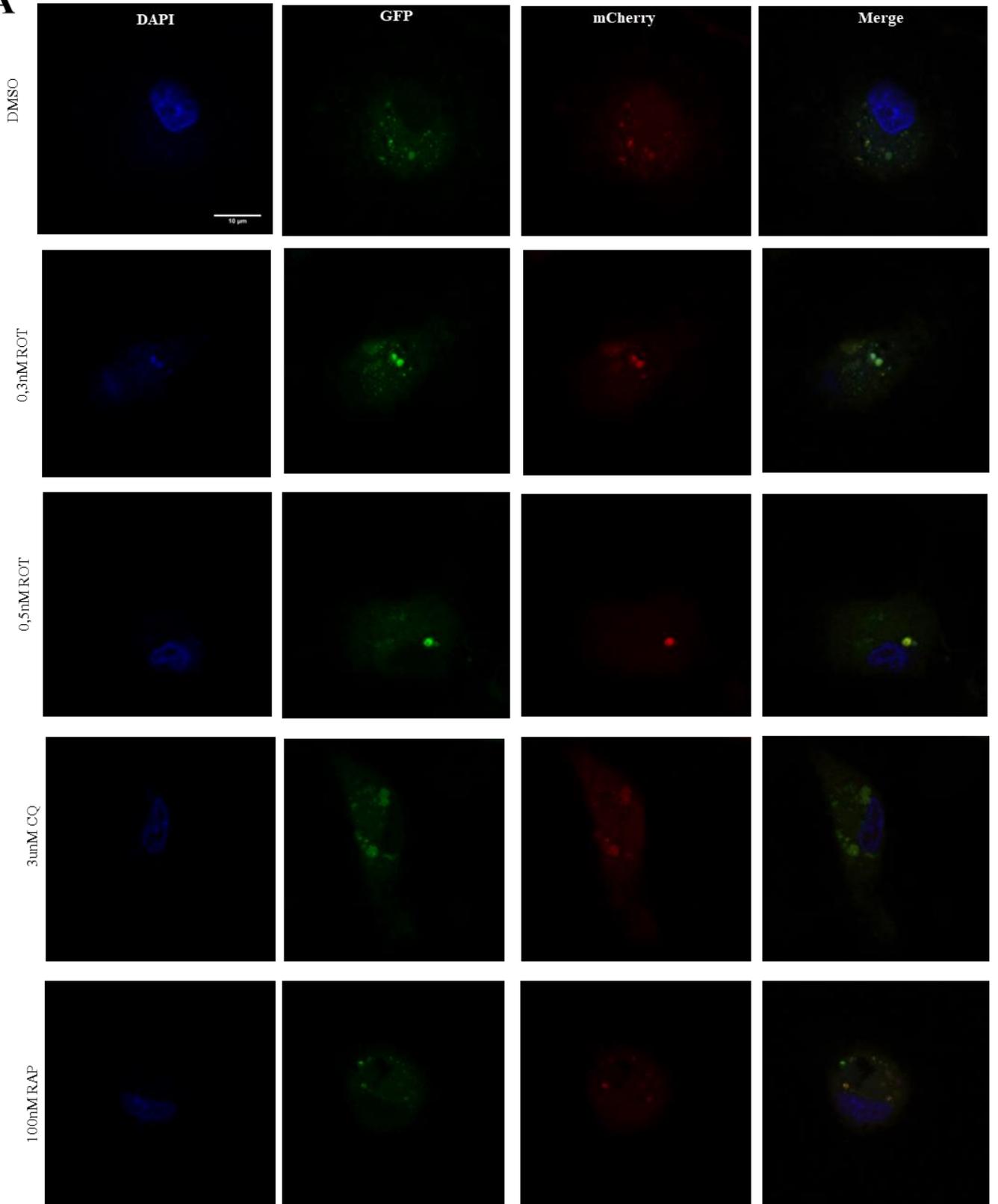
Figura 26: Expressão das proteínas pTau e tau total em cultura primária de células do hipocampo transfectadas com eGFPBAG2 e tratadas com 1nM rotenona por 48 horas. Cultura de células do hipocampo tratadas com DMSO (controle) e 1,0nM de rotenona e transfectadas com os plasmídeos GFP (controle) ou eGFPBAG2 por 48 horas com os níveis de proteínas marcadas conforme indicado (A). Quantificação dos níveis da proteína pTau (B). Quantificação dos níveis da proteína tau total (C). Resultado da razão entre pTau e tau total para as amostras analisadas (D). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. de três experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de duas vias (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

3.2.2. Substância Negra e Locus Coeruleus

3.2.2.1. Fluxo autofágico nas regiões da substância negra e locus coeruleus não sofreram modificações com o tratamento com rotenona

A verificação do fluxo autofágico por meio do constructo LC3mCherryGFP também foi utilizado para a análise da dinâmica da via nas regiões da substância negra e locus coeruleus (Figuras 27 e 28, respectivamente), importantes para o entendimento das doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, para a PD. O trabalho do nosso grupo também

demonstrou a presença de agregados proteicos de α -sin com o tratamento de rotenona para as áreas citadas (Chaves et al., 2010). A fração entre vesículas não-ácidas sobre vesículas ácidas para a região da substância negra demonstrou uma tendência não significativa para o acúmulo das vesículas menos ácidas em 0,3nM de rotenona (Figura 27D), o que sugere uma disfunção autofágica. Uma observação importante é que os controles para a autofagia nesta região comportaram-se de forma semelhante (Figuras 27A e B) o que pode indicar que os controles utilizados para este ensaio não estavam otimizados ou que a ativação da autofagia pela rapamicina por 48 horas produz os mesmos efeitos que a inibição autofágica gerada pelo tratamento com cloroquina, evidenciando a sensibilidade desta região, rica em neurônios dopaminérgicos, conhecidos pela sua alta produção de espécies reativas de oxigênio.

A

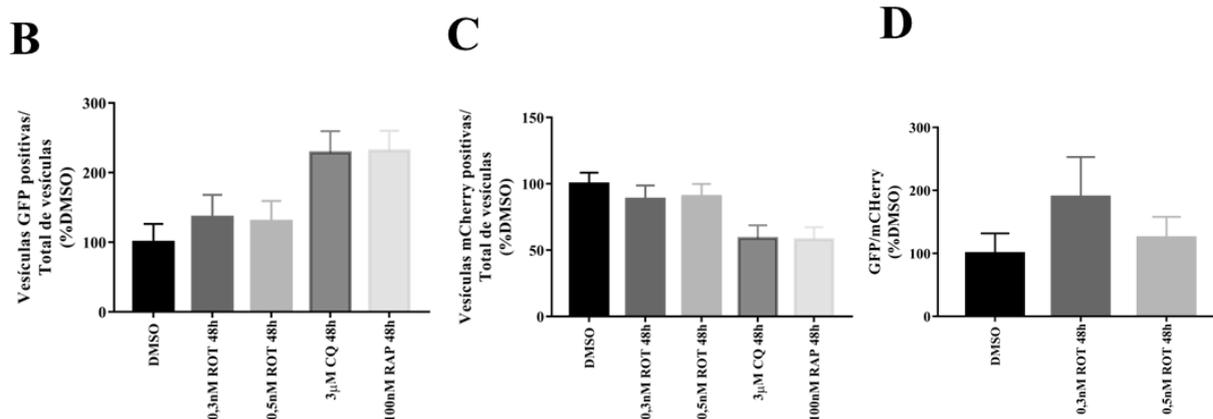
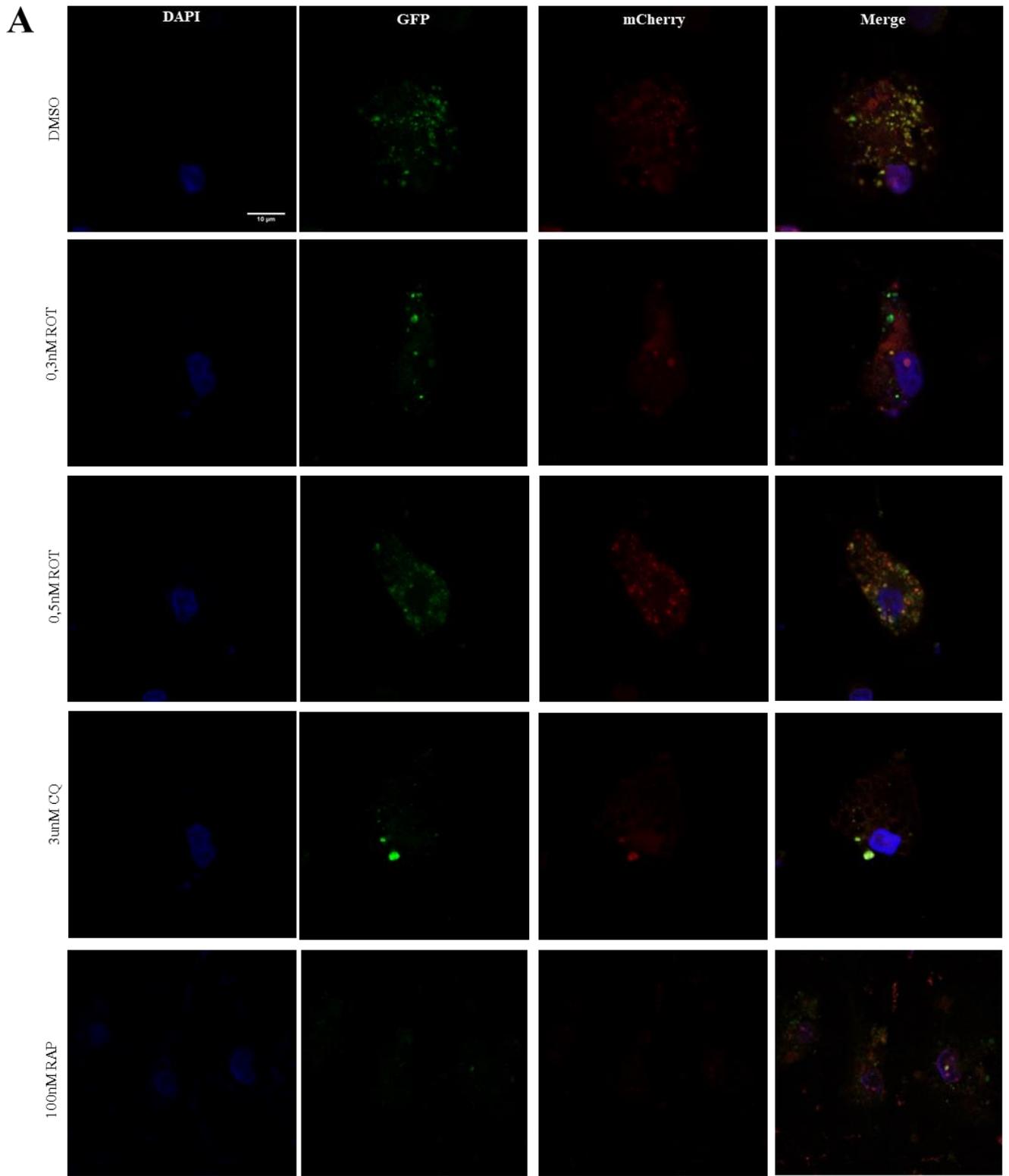


Figura 27: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células de substância negra expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3µM de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas. Fotomicrografias representativas de células expressando o constructo LC3mCherryGFP (A-página anterior). Quantificação do número de vesículas expressando GFP pelo total de vesículas (B). Quantificação do número de vesículas expressando mCherry pelo total de vesículas (C). Quantificação do fluxo autofágico (D). Dados representados como porcentagem do controle (DMSO \pm S.E.M). Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni com dados obtidos pelo plugin *Find Maxima*, do Image J. N=6 células por experimento (2 experimentos independentes).

Curiosamente, a região do locus coeruleus não demonstrou qualquer diferença entre os níveis de vesículas não ácidas e ácidas e os diferentes tratamentos analisados tendo como base 3 experimentos independentes (Figura 28). Estes resultados não eram esperados, uma vez que se sabe que ambas as regiões são ricas em neurônios dopaminérgicos e, portanto, mais susceptíveis aos efeitos danosos gerados pelo aumento da produção de ROS. A região do locus coeruleus é o centro de síntese de noraepinefrina e é a única fonte cortical deste neurotransmissor (Daulatzai, 2016) que pode apresentar um defeito na sua regulação em ratos idosos com déficit em memórias emocionais (Luo et al., 2015). Sabe-se que a disfunção neste neurotransmissor ocorre precocemente durante a AD (Brunnström et al., 2011) que está correlacionada com uma degeneração precoce nas projeções noradrenérgicas (Grudzien et al., 2007; Weinshenker, 2008), podendo corresponder a uma perda de 80% em alguns pacientes com AD (Bondareff et al., 1982), o que não foi mimetizado no nosso modelo celular de neurodegeneração. Uma explicação possível para esta observação é a de que os trabalhos citados abordaram momentos em que o processo neurodegenerativo já estava estabelecido no ambiente celular, em contrapartida, o modelo celular utilizado nesta pesquisa é anterior à perda neuronal.



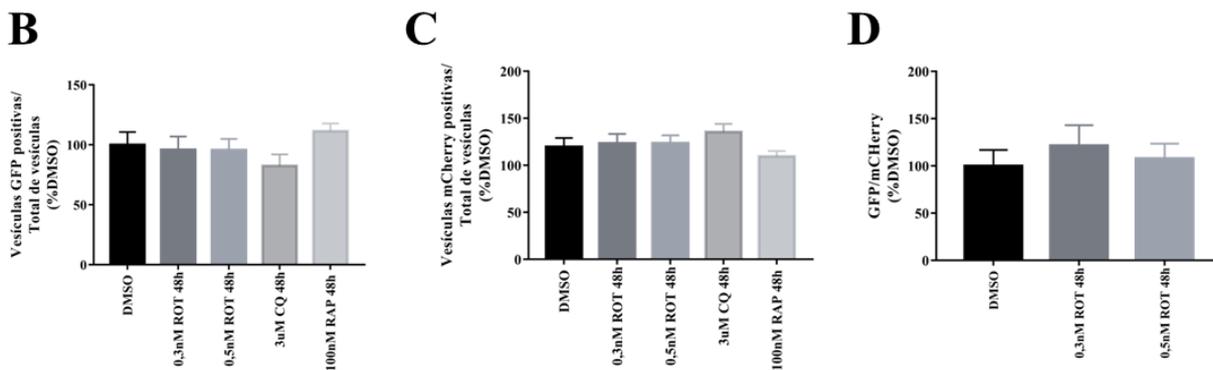


Figura 28: Análise do fluxo autofágico com LC3mCherryGFP em cultura primária de células de locus coeruleus expostas à DMSO (controle), 0,3 ou 0,5nM de rotenona, 3µM de cloroquina (inibidor lisossomal) ou 100nM de rapamicina (ativador da autofagia) por 48 horas. Fotomicrografias representativas de células expressando o constructo LC3mCherryGFP (A-página anterior). Quantificação do número de vesículas expressando GFP pelo total de vesículas (B). Quantificação do número de vesículas expressando mCherry pelo total de vesículas (C). Quantificação do fluxo autofágico (D). Dados representados como porcentagem do controle (DMSO ± S.E.M.). Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni com dados obtidos pelo plugin *Find Maxima*, do Image J. N=7 células por experimento (3 experimentos independentes).

As amostras de ambas as regiões foram submetidas ao Western blot para a marcação das proteínas Beclina-1 e p62 com o intuito de se verificar se essas proteínas sofreram alguma modificação com os tratamentos realizados (Figura 29 e 30).

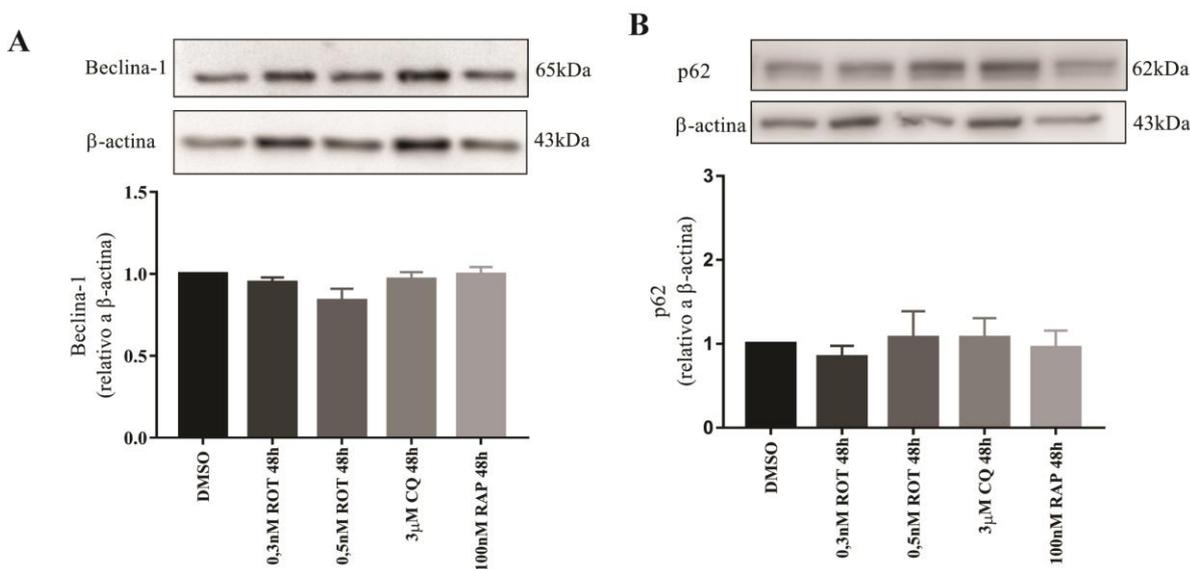


Figura 29: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1e p62, em cultura primária de células da substância negra. Níveis de Beclina-1 (A) e p62 (B) em cultura de células da substância negra expostas a DMSO (controle), 0,3 e 0,5 nM de rotenona, 3µM de cloroquina e 100nM de rapamicina, por 48 horas. Resultados apresentados como média ± S.D. de quatro (p62) e três (Beclina-1) experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

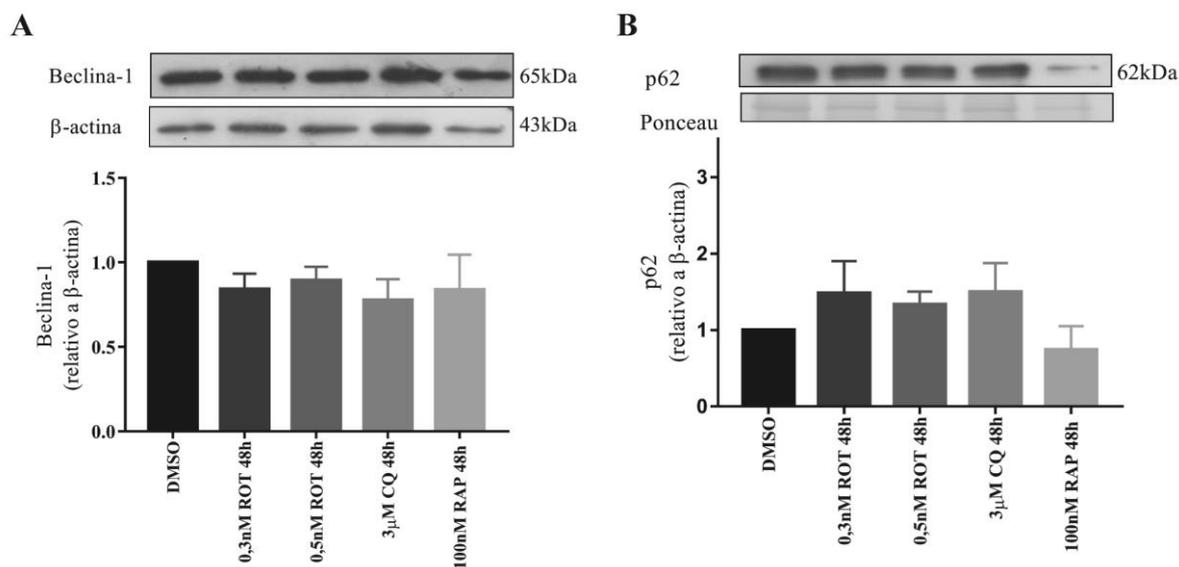


Figura 30: Expressão das proteínas envolvidas na autofagia, Beclina-1 e p62, em cultura primária de células do locus coeruleus. Níveis de Beclina-1 (A) e p62 (B) em cultura de células do locus coeruleus expostas a DMSO (controle), 0,3 e 0,5 nM de rotenona, 3 μ M de cloroquina e 100nM de rapamicina, por 48 horas. Resultados apresentados como média DMSO \pm S.E.M. de três experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

A região do locus coeruleus não demonstrou qualquer diferença nos níveis da proteína Beclina-1 (Figuras 30A) o que sugere que as modificações geradas pelo tratamento com a rotenona, não interferem no início do processo autofágico para esta área. Apesar dos níveis da proteína p62 terem sofrido um leve aumento com o tratamento de 0,3nM de rotenona (de forma semelhante ao tratamento gerado com a cloroquina), a diferença não foi significativa segundo ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni (Figura 30B).

Em oposição, a análise dos níveis desta mesma proteína na região da substância negra demonstrou um comportamento de diminuição em 0,5nM de rotenona (Figura 29B), sugerindo que a região responde de forma diferente ao tratamento com o pesticida. Além disso, observou-se também uma tendência ao acúmulo de vesículas não-ácidas com 0,3nM de rotenona (Figura 27) e um leve aumento (não significativo) nos níveis de p62 em 0,5nM de rotenona (Figura 29A). Apesar de nenhuma das diferenças serem significativas estes dados sugerem que a região da substância negra, ao contrário da região hipocampal, apresenta uma tendência de problemas na autofagia tanto no início, quanto nos momentos finais da via, o que pode indicar que a autofagia como um todo continua em desequilíbrio devido a uma maior sensibilidade das células neurais desta área ao tratamento com rotenona.

Logo, com base nos dados obtidos, é possível observar que as duas regiões analisadas apresentam uma resposta ao tratamento com rotenona que difere da resposta gerada para a região do hipocampo e que outros experimentos devem ser realizados, especificamente para estas regiões, com o intuito de se analisar quais vias sofrem alterações com o tratamento com o pesticida.

3.2.2.2. Superexpressão da co-chaperona BAG2 gerou modificações nos níveis da proteína p62 somente na região do locus coeruleus

As células em cultura das duas áreas também foram submetidas à superexpressão da co-chaperona BAG2, com o intuito de se avaliar se a referida proteína poderia produzir alguma resposta, região específica, na via de degradação autofágica (Figuras 31).

De forma similar aos resultados obtidos para a região do hipocampo, a análise por meio da ANOVA de duas vias revelou que a superexpressão da co-chaperona BAG2 elevou os níveis da proteína p62 de forma significativa ($p < 0,01$), sem que o tratamento com rotenona fosse o causador da modificação, para a região do locus coeruleus (Figura 31B). A mesma análise para a região da substância negra não revelou um efeito significativo da co-chaperona nos níveis de p62, na verdade, os efeitos observados foram opostos, com diminuição dos níveis de p62 (não significativos) (Figura 31A). A análise para a razão entre as proteínas LC3II e LC3I também não demonstraram diferenças significativas entre os grupos analisados (Figura 31A).

Algumas relações têm sido feitas entre as proteínas BAG e o processo de degradação autofágico. A BAG3, por exemplo, é capaz de controlar o nível de degradação de proteínas mal enoveladas por meio da cooperação do complexo BAG3-HSPB8-HSP70 com a p62 (Gamerding et al., 2011). A BAG3 ainda é capaz de se associar com a proteína motora dineína, fundamental para o transporte intracelular, mediando o transporte das proteínas até os agregossomos (Gamerding et al., 2011), sabe-se também que a co-chaperona BAG2 é capaz de se associar com diferentes componentes celulares como mitocôndria, retículo endoplasmático e microtubúlos (Qin et al., 2016) no entanto, a associação entre a BAG2 e a autofagia nunca foi realizada.

É importante ressaltar, no entanto, que os resultados entre as amostras, dentro de cada grupo, variou de forma considerável, ressaltando a necessidade de mais experimentos para definir de forma mais precisa o papel da BAG2 sobre a autofagia nesta região.

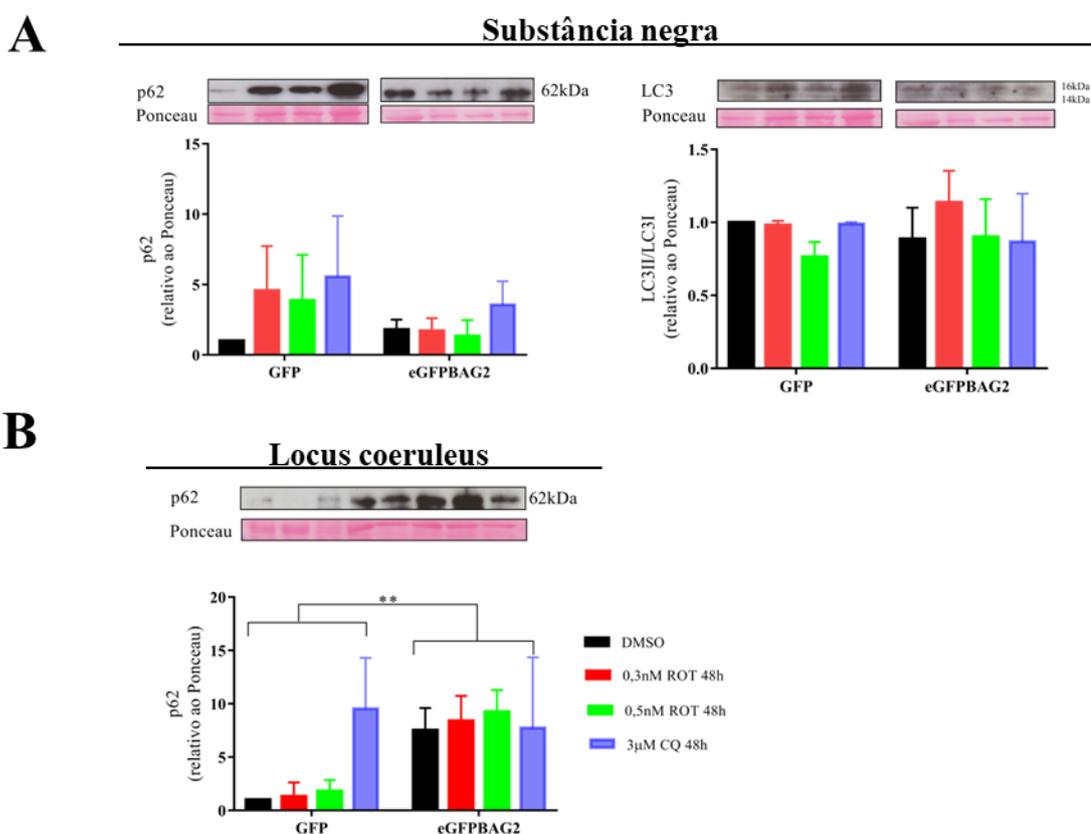


Figura 31: Expressão das proteínas p62 e LC3 em cultura primária de células de substância negra e p62 em células do locus coeruleus transfetadas com BAG-2. Níveis de p62 e LC3 em cultura de células da substância negra transfetadas com 1µg do plasmídeo eGFPBAG2-flag ou com eGFP (controle), expostas a DMSO (controle), 0,3 e 0,5 nM de rotenona e 3µM de cloroquina, por 48 horas. Dados apresentados como média ± S.E.M. de três experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de duas vias (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos (A). Níveis da proteína p62 em células do locus coeruleus transfetadas com 1µg do plasmídeo eGFPBAG2-flag ou com eGFP (controle), expostas a DMSO (controle), 0,3 e 0,5 nM de rotenona e 3µM de cloroquina, por 48 horas. Dados apresentados como média ± S.E.M. de dois experimentos independentes. A análise de variância de duas vias ANOVA, revelou que a chaperona BAG2 elevou os níveis da proteína p62 nas amostras analisadas de forma significativa (** $p < 0,01$) (B).

3.2.3. Células da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y

3.2.3.1. Tratamento com rotenona levou à disfunção da proteína pTau em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinoico e BDNF

Com o intuito de se obter resultados que pudessem enriquecer as análises feitas até o momento, foram-se utilizadas células da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y que são amplamente utilizadas como modelo para a doença de Parkinson, no entanto, algumas estratégias permitem que essa linhagem também seja utilizada como modelo para outros tipos de doenças neurodegenerativas. Hongo et al., (2012) demonstrou que o tratamento com 1µM de rotenona por 4,5 horas em células SH-SY5Y não-diferenciadas leva ao aumento dos níveis de pTau. O protocolo proposto pelo autor foi realizado, mas também em células SH-SY5Y

diferenciadas com ácido retinóico e BDNF por 8 dias, com o objetivo de avaliar se as respostas geradas entre os dois “tipos celulares” eram as mesmas (Figura 32).

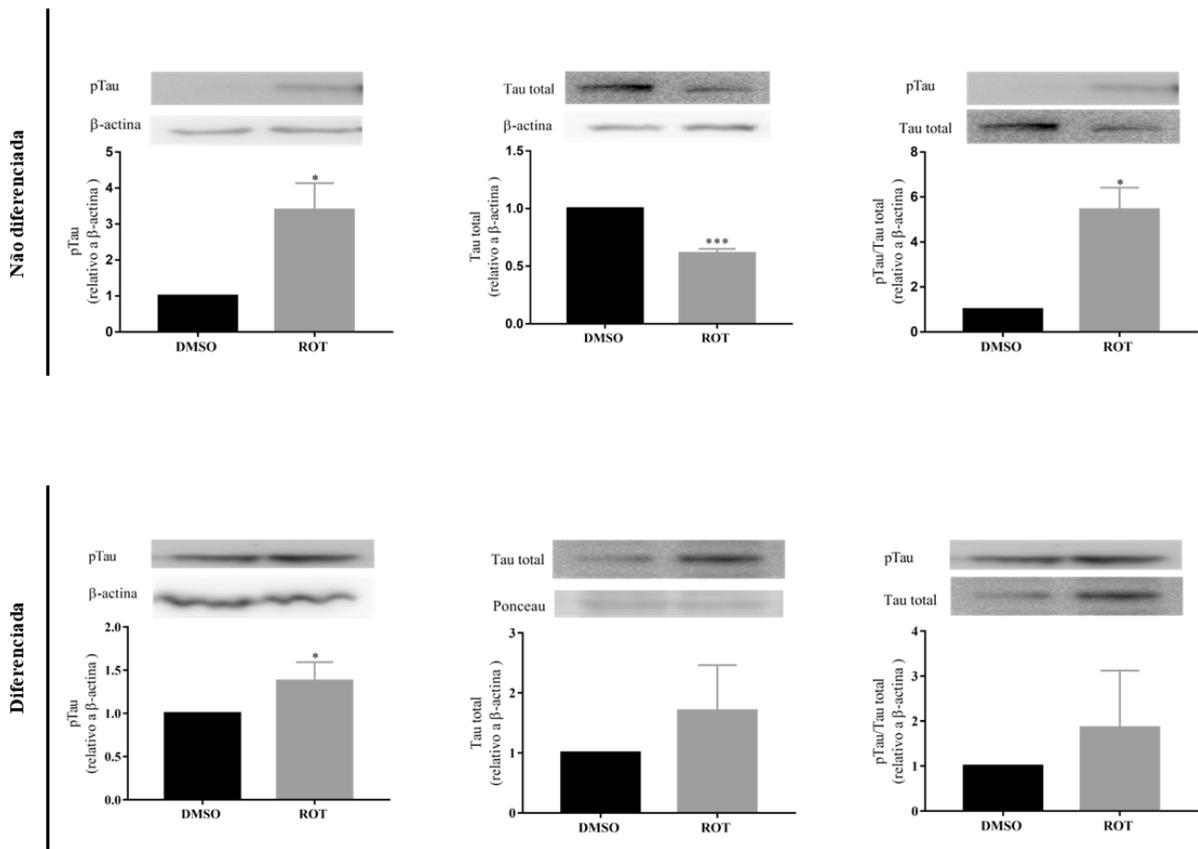


Figura 32: Níveis proteicos de pTau e tau total em células SH-SY5Y não diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF. Quantificação de amostras de cultura de SH-SY5Y não diferenciadas ou diferenciadas com ácido retinóico e BDNF e tratadas com 1μM de rotenona ou DMSO (controle), por 4.5 horas, e marcadas com os anticorpos indicados. Foram utilizados β-actina ou Ponceau para controle de *loading*, conforme indicado. Os dados são representados como média ± S.E.M. de três experimentos independentes. *p<0,05; ***p<0,0001 (comparado com DMSO). *Student t test*.

O tratamento com rotenona levou ao aumento dos níveis da proteína Tau hiperfosforilada em ambos os grupos (p<0,05), e gerou modificações nos níveis da proteína tau total, com uma diminuição de 50% para as células não-diferenciadas [t(4)=10,42; p<0,001] (Figura 32). No entanto, quando avaliados os níveis de tau hiperfosforilada em relação aos níveis de tau total observa-se que a exposição com 1μM de rotenona induziu ao aumento de até 6 vezes nos níveis de tau hiperfosforilada nas células não-diferenciadas, enquanto que nenhuma alteração significativa foi observada para o grupo das células diferenciadas. Esta análise demonstrou primeiramente que o protocolo experimental proposto por Hongo, et al. (2012) é reproduzível em células não diferenciadas e que também induziu ao aumento da proteína pTau em células SH-SY5Y diferenciadas, o que não havia sido demonstrado pelo grupo citado.

Os autores demonstraram que a disfunção da tau está associada com o aumento da atividade da quinase GSK3 β , uma das enzimas envolvidas na fosforilação desta proteína, devido ao aumento da fosforilação do resíduo Tir216 da enzima, induzida pela rotenona (Hongo et al., 2012).

3.2.3.2. Tratamento com rotenona gerou diferentes respostas na mitofagia e na expressão endógena da co-chaperona BAG2 em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico

Sabe-se que a co-chaperona BAG2 apresenta um papel importante na degradação da proteína pTau de forma independente de ubiquitina (Carrettiero et al., 2009) e que a expressão de BAG2 é diferencialmente regulada em um contexto dependente de diferenciação (de Paula et al., 2016). Com o intuito de se avaliar se o tratamento com o pesticida seria capaz de gerar respostas diferentes quanto à expressão da proteína BAG2 endógena, para os dois grupos, um Western blot foi realizado (Figura 33).

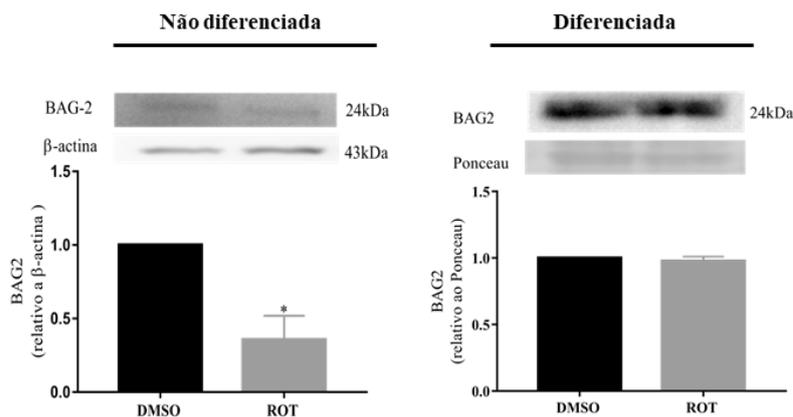


Figura 33: Níveis de BAG2 endógena em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico e BDNF. Quantificação de amostras de cultura de SH-SY5Y não-diferenciadas ou diferenciadas com ácido retinóico tratadas com 1 μ M de rotenona ou DMSO (controle), por 4.5 horas, e marcadas com anticorpo anti-BAG2 e β -actina ou Ponceau para controle de *loading*, conforme indicado. Os dados são representados com média \pm S.E.M. de três experimentos independentes * p <0,05. *Student t test*.

As células SH-SY5Y não-diferenciadas apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de BAG2 endógena que não foram observados nas células-diferenciadas com ácido retinóico (Figura 33), sendo que o grupo das não-diferenciadas apresentaram uma maior disfunção proteica relacionada a proteína tau (Figura 32). Células de cultura primária do hipocampo tratadas com 1nM de rotenona também apresentaram a mesma resposta, com uma diminuição significativa de BAG2 (Figura 25). De forma contundente com os nossos resultados, a diminuição da expressão de BAG2 levou ao aumento de pTau em células SH-SY5Y submetidas à indução da hiperfosforilação da referida proteína por meio da diminuição da temperatura do ambiente celular (hipotermia) (de Paula et al., 2016). O mesmo estudo

revelou que a co-chaperona BAG2 responde de formas distintas de acordo com o tipo celular analisado, o que também foi observado em nossas análises. Os resultados obtidos revelaram, portanto que a rotenona foi capaz de levar a uma disfunção da co-chaperona BAG2 e da proteína tau nos dois modelos celulares analisados.

Segundo Che et al., (Che et al., 2013), a co-chaperona BAG2 é essencial para a estabilização da proteína Pink-1, assim como também é capaz de diminuir a sua ubiquitinação (Qu et al., 2015). Trabalhos não publicados no laboratório demonstraram que o tratamento com rotenona levou à disfunção mitocondrial com 0,5nM de rotenona em cultura de células da substância negra. Com base nestes dados, e com o intuito de se avaliar se o modelo de neurodegeneração utilizando a linhagem SH-SY5Y também apresentaria o mesmo padrão de resposta, um Western blot para proteínas associadas à mitofagia foi realizado (Figura 34).

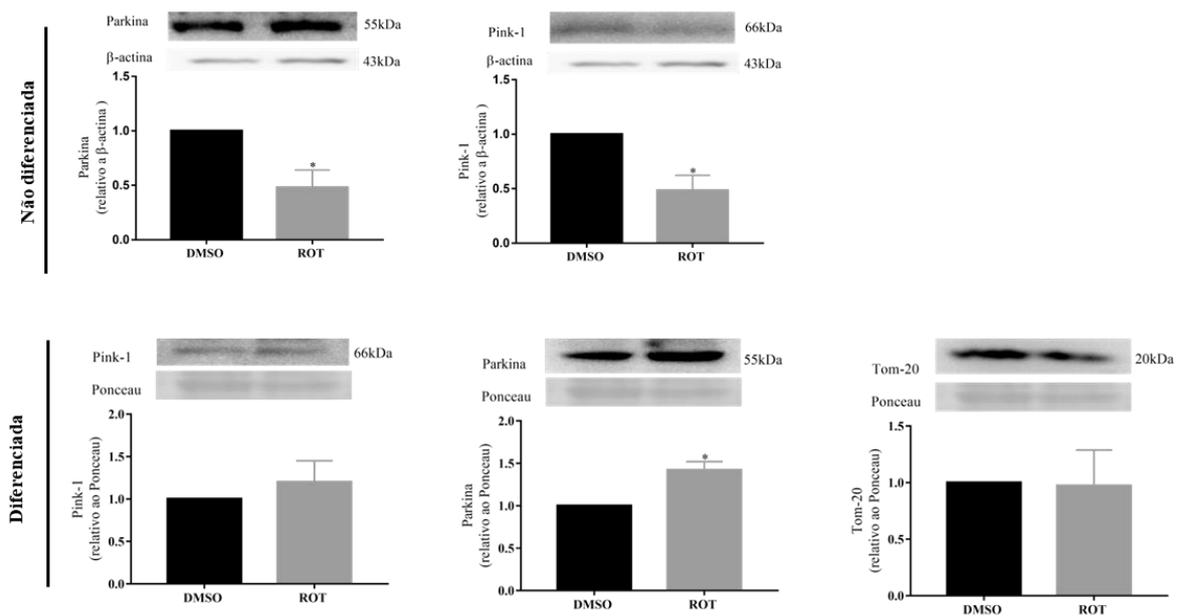


Figura 34: Análise dos níveis de proteínas associadas com a mitofagia em células SH-SY5Y não diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico. Quantificação de amostras de cultura de SH-SY5Y não diferenciadas ou diferenciadas com ácido retinóico tratadas com 1µM de rotenona ou DMSO (controle), por 4.5 horas, e marcadas com os anticorpos para as proteínas Pink-1, Parkina e Tom-20 e β-actina ou Ponceau para controle de loading, conforme indicado. Os dados são representados com média ±S.E.M. de três experimentos independentes *p<0,05. Student t test.

Os dois grupos analisados mais uma vez responderam de forma diferente ao tratamento com rotenona. O grupo das SH-SY5Y não-diferenciadas apresentou uma diminuição nos níveis das proteínas Pink-1 e Parkina, o que sinaliza para um cenário oposto ao da ativação da degradação mitocondrial (Figura 34). No entanto, como a marcação da proteína Tom-20 não foi obtida com sucesso para este grupo, não é possível concluir que mitofagia tenha sido induzida nestas amostras. A ausência da marcação da proteína Tom-20 torna impossível

afirmar que o número de mitocôndrias permaneceu intacto, logo a redução das proteínas associadas à mitofagia pode ser um reflexo direto da diminuição do número de mitocôndrias devido o tratamento com rotenona.

As SH-SY5Y diferenciadas, por sua vez, apresentaram um aumento significativo nos níveis proteicos de Parkina [$t(4)=4,311$; $p<0,05$] e um leve aumento (não significativo) nos níveis de Pink-1 (Figura 34). Estes dados apontam para a ativação da mitofagia para as células diferenciadas em neurônios (número de mitocôndrias, expresso pelos níveis da proteína de membrana mitocondrial Tom-20, mantiveram-se intactos), o que ilustra a sensibilidade destas células aos efeitos citotóxicos da rotenona. É importante ressaltar que a parkina apresenta outros papéis além da visão consenso como uma E3 ligase e sua função na mitofagia. Recentemente tem sido explorada a atuação desta proteína como um fator de transcrição para diferentes genes, tendo sido comprovada o seu papel na inibição da expressão do gene TP53 (da Costa, 2009; Duplan, 2013; da Costa, 2019) e a modulação da expressão de outros dois alvos transcricionais envolvidos na AD: as presinilinas 1 e 2, componentes do complexo da γ -secretase, enzima envolvida na clivagem da proteína APP nos peptídeos A β (Duplan, 2013). Os níveis da proteína LC3 foram acessados para este grupo, mas nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 35).

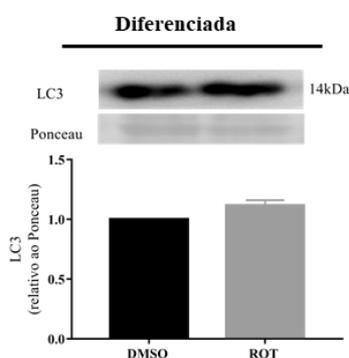


Figura 35: Níveis da proteína LC3 células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico. Quantificação de amostras de cultura de SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico tratadas com 1 μ M de rotenona ou DMSO (controle), por 4.5 horas, e marcada com o anticorpo para a proteína LC3 com Ponceau para controle de *loading*, conforme indicado. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com *Student t test* de três experimentos independentes.

Considerando todos os resultados obtidos nesta sessão é possível concluir que, de forma semelhante ao que acontece na cultura primária de células das três áreas, o tratamento com rotenona nas células SH-SY5Y levou a uma disfunção da proteína tau, elevando os níveis da tau hiperfosforilada, e que, a co-chaperona BAG2 responde de forma diferente, de acordo com os “diferentes tipos celulares” ao tratamento com o pesticida.

3.2.3.3. Análise do papel da co-chaperona BAG2 nos níveis de Tau-total e pTau em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico

Em seguida, os dois grupos de células SH-SY5Y foram transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2 (ou apenas com GFP, para controle) e tratadas com rotenona (Figuras 36 e 37), com o intuito de analisar o efeito da superexpressão da co-chaperona sobre os níveis de pTau e tau total nas células analisadas. De forma consistente com os resultados obtidos nesta pesquisa, a superexpressão da chaperona BAG2 não levou a modificações nos níveis das proteínas autofágicas Beclina-1 e LC3 para as amostras de SH-SY5Y não-diferenciadas (Figura 36A). A ANOVA de duas vias demonstrou que não há efeito da rotenona sobre os níveis de proteína pTau, assim como não há interação entre as duas variáveis independentes. No entanto, a análise detectou uma tendência de aumento nos níveis de pTau juntamente com a expressão de BAG2 [$F(1,8)=4.25$; $p=0.07$] (Figura 36C). Ao analisar o grupo de BAG2 dentro dele mesmo, foi possível notar, por meio do teste t que houve uma diminuição significativa nos níveis de pTau se comparado com o controle [$t(4)=6.149$; $p<0.01$] (Figura 36D).

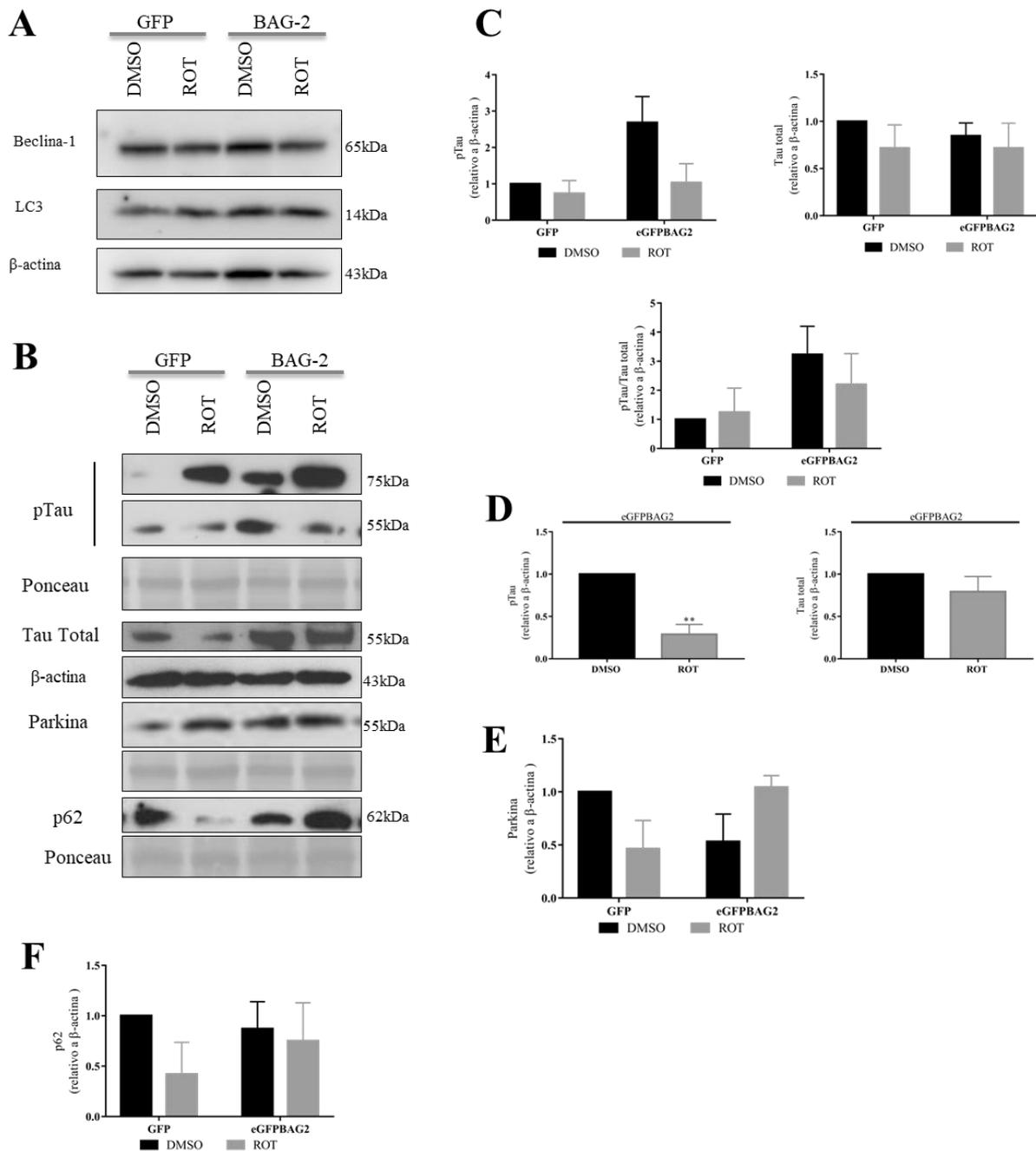


Figura 36: Análise dos níveis de proteínas associadas à autofagia e pTau em células SH-SY5Y não diferenciadas. Imagens representativas de Western blot de amostras de células SH-SY5Y não diferenciadas transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2 (ou com GFP como controle) e tratadas com 1 μ M de rotenona por 4.5 horas, utilizando os anticorpos indicados (A e B). Quantificação das amostras obtidas em (B). Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de duas vias (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos analisados (C). Dados apresentados em (B) para pTau e tau total foram realizados dentro do grupo BAG2, tendo BAG2 DMSO como controle. *Student t test*. ** $p < 0,01$ (D). Quantificação das amostras obtidas em (B) para a proteína Parkina (E) e p62 (F). Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de duas vias (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos analisados. Os dados são representados com média \pm S.E.M. de três experimentos independentes.

A análise dos níveis das proteínas tau total e da sua forma hiperfosforilada não apresentaram modificações significativas com a superexpressão de BAG2 para o grupo das

células diferenciadas com ácido retinóico (Figura 37A e 37B). A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito das variáveis rotenona [$F(1,7)=83.86$; $p<0.0001$] e BAG2 [$F(1,8)=71.02$; $p<0.0001$] assim como um efeito significativo na interação entre as duas variáveis [$F(1,7)=95.38$; $p<0.0001$] sobre a razão entre as proteínas pTau e tau total nas amostras analisadas (Figura 37B). O pós-teste de Bonferroni mostrou que o tratamento com rotenona em amostras que superexpressão de BAG2 elevou os níveis de pTau/Tau total de forma significativa ($p<0.0001$). Curiosamente, a marcação por meio do Western blot revelou a existência da proteína tau hiperfosforilada com um peso molecular de 75kDa. A análise desse grupo revelou um efeito significativo do tratamento com rotenona nas amostras analisadas [$F(1,8)=5,498$; $p<0.05$] sem um efeito da superexpressão de BAG2 (Figura 37B). De forma diferente aos resultados obtidos para o grupo das não-diferenciadas, a análise dos níveis de pTau e tau total dentro do grupo das células transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2 não sofreram modificações significativas (Figura 37C), reforçando a hipótese de que a co-chaperona BAG2 é capaz de gerar diferentes respostas de acordo com o tipo celular analisado. É importante lembrar que a superexpressão de BAG2 também não gerou modificações significativas nos níveis da proteína pTau e tau total em cultura de células do hipocampo tratadas com 1nM de rotenona (Figura 26). Estes dados sugerem, juntamente com a literatura, que a BAG2 pode atuar em algum momento específico da disfunção da proteína tau e não nos momentos anteriores à agregação, analisados na presente pesquisa. É importante ressaltar que a análise das não-diferenciadas dentro do grupo das transfectadas com BAG2 (comparadas com BAG2 DMSO), revelaram uma diminuição significativa de pTau com o tratamento com rotenona (Figura 36D), de forma contrastante ao efeito da rotenona nas mesmas células não-submetidas ao processo de transfecção (Figura 33).

As proteínas Tom-20, Pink1 e Parkina foram analisadas com o intuito de se avaliar os níveis de mitofagia nestas células (Figura 37E). As análises estatísticas não revelaram diferenças na expressão dos níveis de Parkina-1 nem de Pink-1, o que pode ser explicado pela grande variação obtida entre as amostras. A variável BAG2 diminuiu os níveis da proteína Tom-20 de acordo com a análise ANOVA de duas vias [$F(1,8)=9.706$; $p<0.05$] (Figura 37E). Os níveis de LC3II também foram acessados para as amostras citadas, com o objetivo de se avaliar a resposta autofágica gerada, no entanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada, no entanto, a superexpressão de BAG2 foi capaz de diminuir os níveis da proteína p62 (Figura 37D), sugerindo que a co-chaperona pode apresentar algum papel na modulação desta proteína.

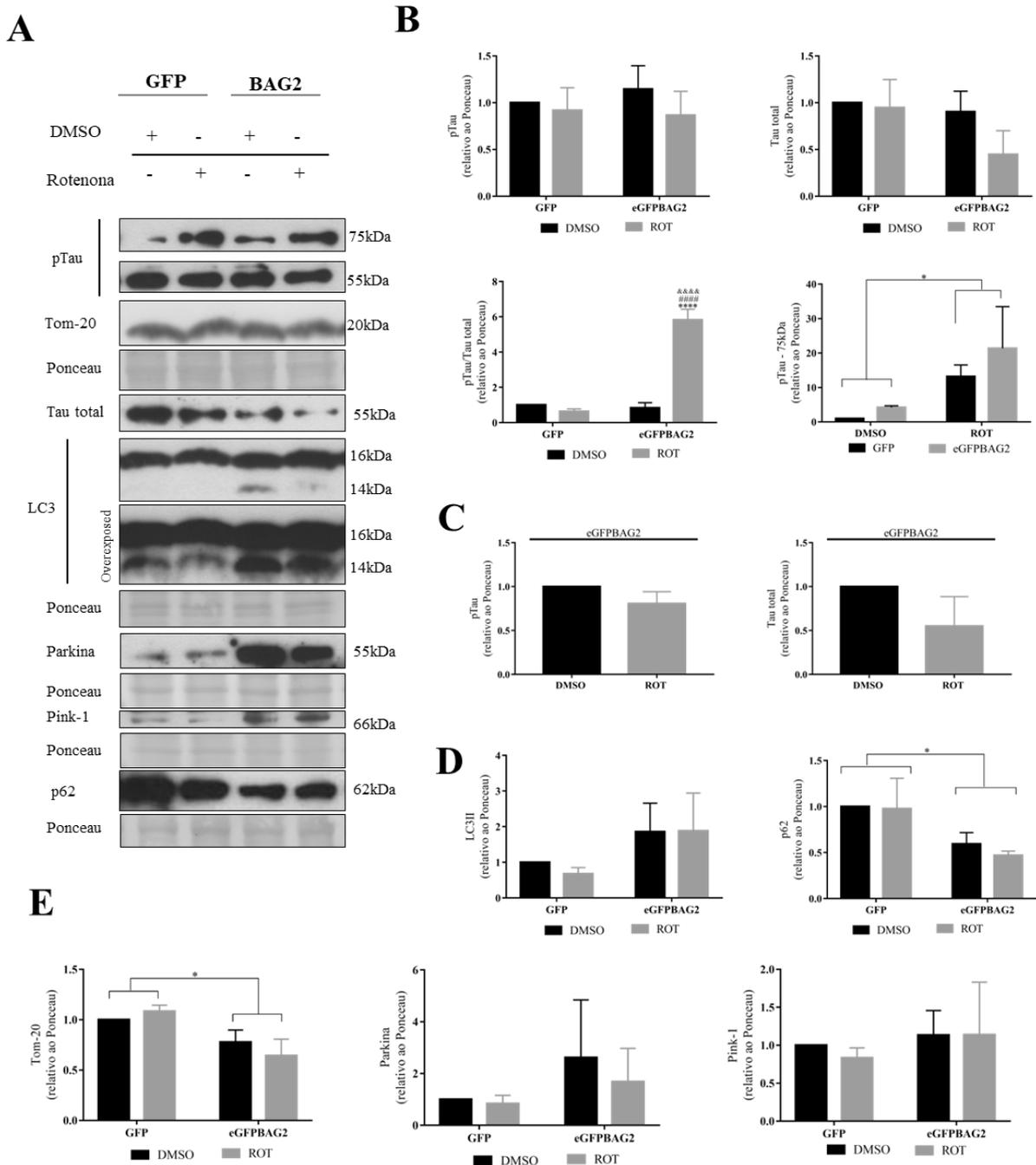


Figura 37: Análise dos níveis de proteínas associadas a autofagia e pTau em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e BDNF. Imagens representativas de Western blot de amostras de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e BDNF transfectadas com o plasmídeo eGFPBAG2 (ou com GFP como controle) e tratadas com 1 μ M de rotenona por 4.5 horas, utilizando os anticorpos indicados (A). Quantificação das amostras obtidas em (A) para os níveis das proteínas pTau e tau total, assim como a razão entre elas (B). Dados apresentados em (A) para pTau e tau total dentro do grupo BAG2, tendo BAG2 DMSO como controle. (C). Quantificação das amostras obtidas em (A) para os níveis das proteínas para LC3II e p62 (D). Quantificação das amostras obtidas em (A) para os níveis das proteínas Tom-20, Parkina e Pink-1 (E). Os dados são representados com média \pm S.E.M. de três experimentos independentes. Análise de variância ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni para os grupos GFP e BAG2 ou com o teste t para a análise dentro do grupo BAG2. A análise de variância de duas vias ANOVA, revelou que a chaperona BAG2 diminuiu os níveis das proteínas p62 e Tom-20 nas amostras analisadas de forma significativa (* p <0,05).

3.2.3.4. A co-chaperona BAG2 não gera modificações nos níveis proteicos da proteína α -sinucleína selvagem e mutante

Com base nos dados apresentados até o momento e com os resultados descritos no próximo capítulo para a proteína DNAJB6, nos perguntamos se a co-chaperona BAG2 poderia exercer algum efeito sobre os níveis proteicos da proteína α -sinucleína (α -sin), com o intuito de averiguar se os efeitos observados até o momento poderiam ser substrato específico. Para testar essa hipótese, células SH-SY5Y foram diferenciadas com ácido retinóico e BDNF por 8 dias. Posteriormente as células foram transfectadas com os plasmídeos para a α -sin selvagem (WT) e com a mutação de ponto A53T, presente em casos de origem familiar da doença de Parkinson. As células foram mantidas por 48 horas e as proteínas foram extraídas com tampão de lise. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas figuras 38 e 39.

De forma contundente com os resultados apresentados até o momento para as amostras de SH-SY5Y, a co-chaperona BAG2 apresenta diferentes respostas de acordo com o tipo celular analisado. Células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas não apresentaram diferença significativa entre as amostras analisadas quando as amostras foram comparadas com o controle α -sin WT DMSO (Figuras 38 e 39). No entanto, ao analisar os grupos dentro deles mesmos foi possível notar que a transfecção com BAG2 elevou os níveis da proteína α -sin WT nestas células e não modificou os níveis da proteína α -sin A53T (Figura 38C e 38D). O mesmo efeito foi observado para as amostras de α -sin WT nas células diferenciadas (Figura 39C), no entanto, os efeitos para a representante com a mutação de ponto foram opostos, no qual a co-chaperona analisada levou à diminuição significativa dos níveis da proteína de α -sin A53T nestas células [$t(4)=3.094$; $p<0.05$]. Para o nosso entendimento, esta é a primeira vez que os efeitos da co-chaperona BAG2 são demonstrados sobre os níveis da proteína de α -sin, assim como o seu papel diferencial sobre a proteína α -sinucleína mutante.

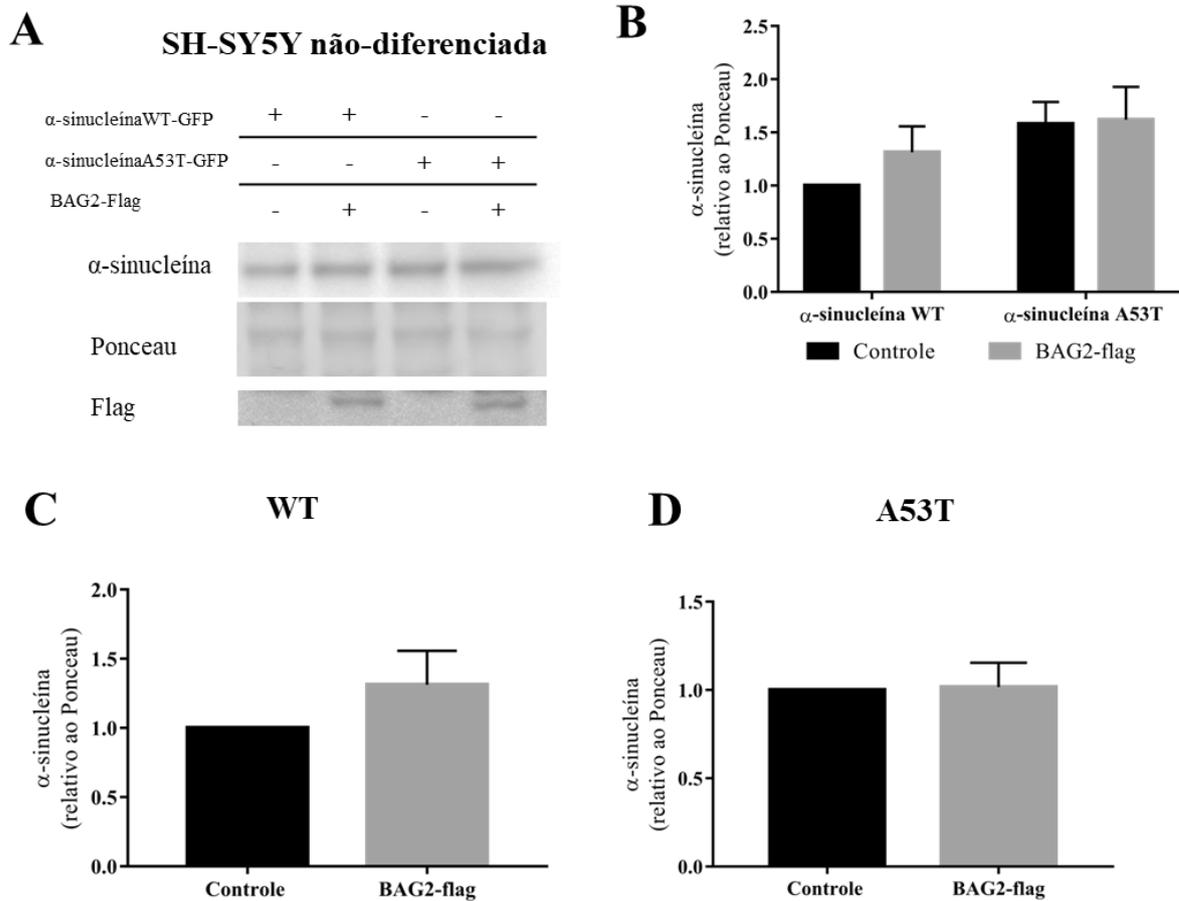


Figura 38: Expressão da proteína α -sinucleína selvagem e com a mutação A53T em células SH-SY5Y não diferenciadas transfectadas com eGFPBAG2flag. Amostras de cultura de SH-SY5Y não-diferenciadas transfectadas com os plasmídeos para α -sinucleína (WT ou A53T) e com eGFPBAG2flag por 48 horas, e marcadas com as proteínas indicadas (A). Quantificação dos dados obtidos em (A) (B). Quantificação dos dados obtidos em (A) comparando o grupo α -sin(WT)-GFP (C) ou com α -sin(A53T)-GFP (D). Dados representados com média \pm S.E.M. de três experimentos independentes, com teste ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Bonferroni para (A) ou *Student test* para C e D. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas.

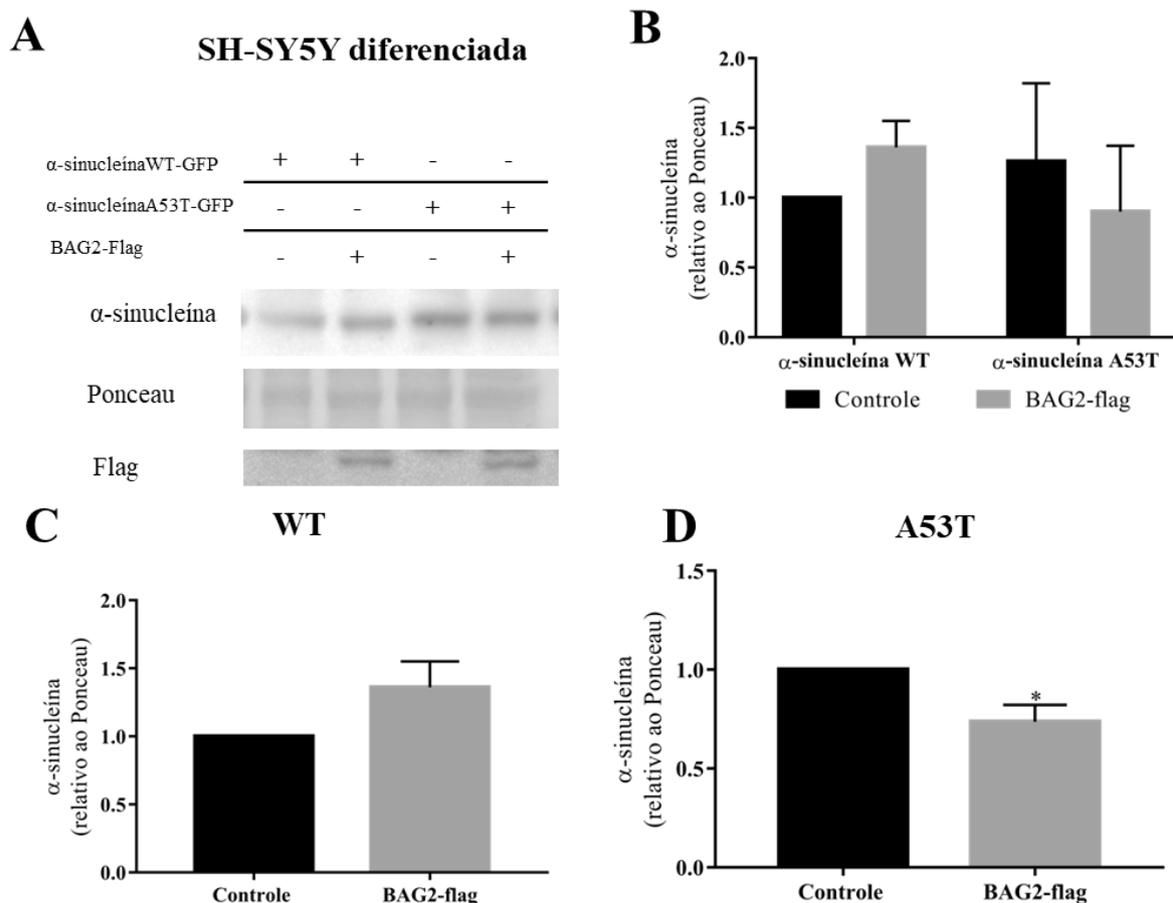


Figura 39: Expressão da proteína α -sinucleína selvagem e com a mutação A53T em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e transfectadas com eGFPBAG2flag. Amostras de cultura de SH-SY5Y diferenciadas transfectadas com os plasmídeos para α -sinucleína (WT ou A53T) e com eGFPBAG2flag por 48 horas, e marcadas com as proteínas indicadas (A). Quantificação dos dados obtidos em (A) (B). Quantificação dos dados obtidos em (A) comparando o grupo α -sin(WT)-GFP (C) ou com α -sin(A53T)-GFP (D). Dados representados com média \pm S.E.M. de três experimentos independentes, com teste ANOVA de uma via seguido por pós teste de Bonferroni para (A) ou *Student test* para C e D. * $p < 0,05$.

Nosso modelo com as células da linhagem SH-SY5Y revelaram uma diminuição significativa dos níveis de p62, somente para as células diferenciadas com superexpressão de BAG2 (Figura 37D), sendo que a resposta gerada nas células não-diferenciadas foi similar à resposta da região hipocampal, apesar desta resposta não ter sido significativa (Figura 36F). Sabe-se que o p62 é capaz de induzir a autofagia e que a sua falha leva a agregação de proteínas mal enoveladas (Liu et al., 2017), e que também é capaz de inibir a autofagia na presença de altos níveis de aminoácidos pois promove a ubiquitinação do mTOR (Sánchez-Martín and Komatsu, 2018) logo, a análise dessa proteína, dentro de um contexto doença específica, é fundamental para o entendimento das consequências celulares decorrentes na modificação dos seus níveis proteicos.

O acúmulo da α -sin, na PD, induz à agregação da p62 que é necessária para a degradação da própria α -sin (Wu et al., 2015). No nosso modelo, a superexpressão de BAG2 foi capaz de levar a diminuição nos níveis da proteína α -sin A53T somente em células diferenciadas com ácido retinóico (Figura 39D). Camundongos deficientes em Parkina acumularam p62 em

neurônios dopaminérgicos (Song et al., 2016) e a parkina ubiquitina a proteína p62. A inibição anormal de p62 pode ser inibida pela chaperona DJ-1 que é expressa em resposta ao estresse oxidativo e que a mutação em seu gene esta associada a uma forma familiar de PD (Maita et al., 2013). Curiosamente, um estudo realizado em 2015 demonstrou que os efeitos protetores da co-chaperona BAG2 em células SH-SY5Y tratadas com 50mM de MPP+ por 48 horas eram dependentes da DJ-1 (Song et al., 2015).

Em contrapartida, a diminuição dos níveis de p62 funcional foi detectado em pacientes com Alzheimer, com uma diminuição da autofagia e um acúmulo de proteína tau e peptídeos A β (Tanji et al., 2014), e que a diminuição dos níveis de p62 levaram à diminuição da degradação da pTau ubiquitinada ((Jung et al., 2013). Logo, o aumento da p62 pode ser efetivo no contexto específico da AD (Liu et al., 2017). Também de forma contrastante com a PD, o aumento da mitofagia na AD pode levar à deterioração sináptica e degeneração axonal com acúmulo da proteína tau nos neurônios que também afeta a depleção de parkina (Liu et al., 2017). Uma interação com a p62 poderia permitir a marcação específica de substratos pela BAG2 para a degradação via autofagia.

Em suma, os resultados obtidos nesta seção corroboram a hipótese proposta pelo grupo do nosso colaborador de que a co-chaperona BAG2 apresenta papéis e funções específicos para o tipo celular, substrato proteico e região cerebral em que está sendo expressa. Mais estudos devem ser realizados para se avaliar quais os mecanismos que permitem este efeito da co-chaperona BAG2 neste contexto célula e substrato específico.

4. CONCLUSÃO

Em suma, este trabalho possibilitou a melhor caracterização do modelo de neurodegeneração esporádica proposto pelo laboratório, assim como permitiu evidenciar que a co-chaperona BAG2 apresenta papéis e funções específicos para o tipo celular, substrato proteico e região cerebral em que está sendo expressa. De forma mais específica, o presente trabalho demonstrou que:

1. A disfunção autofágica precede a formação de agregados proteicos em células do hipocampo.
2. O tratamento com rotenona em células da linhagem SH-SY5Y mimetizam a disfunção da proteína tau, tanto em células não-diferenciadas como diferenciadas em neurônios.

3. O tratamento com 1nM de rotenona levou à disfunção da proteína tau, aumento nos níveis de Parkina e diminuição nos níveis proteicos de BAG2 endógena de forma semelhante aos resultados obtidos para a SH-SY5Y não-diferenciadas.
4. A co-chaperona BAG2 elevou os níveis proteicos de p62 em cultura de células do hipocampo, locus coeruleus e SH-SY5Y não-diferenciadas (não significativo), o que sugere a marcação específica de substratos pela co-chaperona analisada.
5. A superexpressão de BAG2 elevou os níveis proteicos de p62 e diminuiu a razão LC3II/LC3I em células do hipocampo, o que sugere uma ativação autofágica nesta região.
6. A co-chaperona BAG2 gerou um efeito inverso nas células SH-SY5Y diferenciadas, assim como nas células de substância negra, com diminuição nos níveis da proteína p62.
7. A superexpressão de BAG2 levou à diminuição dos níveis da proteína α sinucleína A53T somente em células SH-SY5Y diferenciadas.

5. FIGURA SUPLEMENTAR



Figura S1: Revelação do teste de reatividade da proteína PINK-1. Filme contendo amostras de hipocampo, substância negra e locus coeruleos de ratos neonatos e idosos além do controle positivo para a referida proteína (amostra de músculo) utilizado no processo de padronização. A marcação de PINK-1 destas amostras estão marcando acima do peso esperado (66kDa). Experimento realizado pela aluna Karla Pacheco de Melo.

CAPÍTULO III – EFEITO DAS PROTEÍNAS DNAJs, EM ESPECIAL A DNAJB6, SOBRE A PROTEÍNA α -SINUCLÉINA SELVAGEM E MUTANTE EM CÉLULAS HEK293T E SH-SY5Y

1. INTRODUÇÃO

A regulação do controle de qualidade proteico é mediada por chaperonas que atuam facilitando a conformação proteica, o transporte proteico através de membranas, o redobramento proteico, assim como o seu *refolding* e degradação (Kampinga and Craig, 2010).

As *heat shock proteins* (HSPs) são o maior grupo de chaperonas, sendo que muitas atuam prevenindo a agregação proteica. A classe das *heat shock* 70kDA (Hsp70s) formam um dos grupos mais importantes da maquinaria das chaperonas, atuando em inúmeras reações, sendo estudadas em grandes detalhes dentro do conceito da supressão da agregação proteica (Gao et al., 2015; Suh et al., 1998). A maquinaria da Hsp70 requer, além da própria Hsp70, membros da família das DNAJ/Hsp40 e dos fatores de troca de nucleotídeos (*nucleotide exchange factors* - NEF/Hsp110), como já citado na introdução geral desta pesquisa.

As DNAJs se ligam a Hsp70 por meio de um domínio conservado de histidina-prolina-aspartato, localizado no domínio J, e estimulam a atividade de ATPase da Hsp70. Tem-se sugerido que as DNAJs são as primeiras a se ligarem ao substrato com o posterior recrutamento da Hsp70 (Suh et al., 1998). Nesse sentido, DNAJs determinam a especificidade da maquinaria da Hsp70. Demonstrou-se recentemente que a DNAJB6, um dos 41 membros da família das DNAJ, atua suprimindo a agregação da α -sin de forma dependente da Hsp70 (Aprile et al., 2017). Dados anteriores também demonstraram a importância da região rica em serina/treonina (S/T) para os efeitos anti-agregadores da DNAJB6 em modelos de agregação com poly-Q (Hageman et al., 2011; Kakkar et al., 2016). Adicionalmente, a DNAJB6 também está presente no centro dos corpos de Lewy na região da substância negra e do córtex no cérebro post-mortem de pacientes com PD (Durrenberger et al., 2009), e está superexpressa em astrócitos presentes na região da substância negra (Ward, 2002). O mesmo estudo também mostrou que outro membro da família J, a DNAJB2, está superexpressa em astrócitos, e atua direcionando cargas ubiquitinadas para degradação, além de apresentar propriedades anti-agregação (Ward, 2002). Sugere-se que ambas – DNAJB6 e DNAJB2 – atuem via degradação proteossomal.

Em suma, essas descobertas sugerem que certas combinações de DNAs podem direcionar a maquinaria da Hsp70 para clientes específicos, dentre eles α -sin. Neste trabalho, foram realizadas conexões específicas entre diferentes DNAs (com foco principal na DNAJB6) e seus efeitos sobre a α -sin selvagem e com a mutação A53T, presente em casos da PD de origem familiar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura celular

As células das linhagens HEK293T e SH-SY5Y foram mantidas em meio DMEM ((Sigma-Aldrich) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FCS, Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina e estreptomicina (P/S). Quando atingida a confluência de 70 a 80%, as células foram transferidas para outra placa/garrafa usando tripsina/EDTA (Lonza) com base no protocolo de cultura de células padrão. Proporções de divisão de 1/20 a 1/40 foram utilizadas para garantir densidades similares entre as linhagens.

2.2. Plasmídeos utilizados

As células HEK293T e SH-SY5Y foram co-transfectadas com plasmídeos contendo as sequências da proteína α -sin WT ou a A53T com adição da cauda GFP (ANEXO X) e diferentes plasmídeos para as DNAs contendo uma tag V5. Para testar a hipótese da modulação da α -sin mediada pela DNAJB6 dependente da via da *N-end rule* plasmídeos contendo a sequência da α -sin com um resíduo de arginina na porção N-terminal, ao invés da metionina, foi utilizado (Figura 7B). Por fim, para salientar a importância da interação entre a DNAJB6 e a proteína α -sin foram utilizados plasmídeos da DNAJB6 contendo mutações na região S/T (Kakkar et al., 2016), fundamental para o reconhecimento do substrato.

2.3. Diferenciação neuronal das células SH-SY5Y

Para diferenciar a linhagem de células de neuroblastoma SH-SY5Y em células *neuron-like*, as células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 cells/cm² em placas pré-tratadas com poli-D-lisina (PDL). No dia seguinte, as células foram expostas a 10 μ M de ácido retinóico (Sigma) com DMEM suplementado com 10% de FCS por 5 dias, após este período, o meio foi trocado por DMEM contendo 10ng/ml de BDNF (Peprotech) para promover o crescimento das extensões neurais.

2.4. Determinação da agregação da α -sin em células HEK293T e SH-SY5Y

Como a proteína α -sin geralmente não agrega espontaneamente em células não-neuronais, foram utilizadas algumas abordagens com o intuito de acionar sua agregação, incluindo a inibição do proteassomo e da autofagia, ou diminuição da expressão da DNAJB6 (que foi demonstrando que aumentava a propensão da α -sin para formar agregados - (Aprile et al., 2017)).

Em diferentes momentos após a co-expressão da α -sin/chaperonas, a agregação da α -sin foi analisada com métodos bioquímicos de fracionamento proteico, seguido por western blot para a detecção da α -sin e das respectivas chaperonas utilizadas no experimento. Adicionalmente, foi empregado o *filter trap assay* – amplamente utilizado no laboratório do prof.Kampinga para a detecção de proteínas com repetições poli-Q (Eenjes et al., 2016; Månsson et al., 2014)- para a determinação da agregação da α -sin nos modelos analisados. Em paralelo, as células foram analisadas em microscopia confocal para inclusões de α -sin. Para tanto, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 minutos em temperatura ambiente (TA), seguida por três lavagens com PBS. As amostras foram permeabilizadas e bloqueadas com PBS contendo 0.1% Triton X-100, 1% BSA e 5% soro normal de cabra por 60 minutos em T.A. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo anti-MAP2 (para SH-SY5Y diferenciadas, 1:1000; Abcam) e anti- α -sin (1:500; Invitrogen), por 1 hora em T.A, seguida pela incubação dos anticorpos secundários fluorescentes (1:400) e DAPI para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal.

2.4.1. Protocolo de fracionamento proteico

Protocolos de fracionamento utilizando NP40 ou SDS foram utilizados nesta pesquisa.

Fracionamento com NP-40

Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram removidas com tampão de lise contendo 50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1%NP-40 (Igepal-Ca 630, Sigma) e coquetel inibidor de protease (Roche). O lisado celular foi sonicado com input de 50% por 5 segundos. Em seguida a concentração proteica foi obtida por meio do ensaio proteico DC (Bio-Rad), e uma parte foi mantida como a fração total (T – *input*). O volume remanescente foi centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado como a fração solúvel (S). O pellet foi lavado uma vez com o tampão de lise sem o NP-40 e, após outra centrifugação a 20.000g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso com 1/3 do volume inicial do tampão de lise, seguido por sonicação, representando a fração do *pellet* (P). Para todas as frações foi adicionado sample buffer Laemmli

4x (8% SDS, 40% glicerol, 20% β -mercaptoetanol, 0,001% azul bromofenol) e as amostras foram fervidas por 5 minutos e mantidas por -20°C até o uso.

Fracionamento com SDS

Todos os passos foram realizados como no protocolo da NP-40, com a adição de uma solubilização extra com SDS. Uma parte dos lisados de cada amostra foram mantidas como a fração total (T, input). O volume restante foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado e mantido como a fração solúvel 1%NP-40. O pellet foi lavado uma vez com o tampão de lise sem o detergente, seguido pela adição do tampão contendo 2% SDS. Após outra centrifugação de 20.000g por 30 minutos em T.A. e o sobrenadante foi retirado e mantido como a fração solúvel 2% SDS. O pellet final foi ressuspendido em 1/3 do volume inicial do tampão de lise sem detergente e, posteriormente foi sonicada e mantida como a fração pellet (P). Os passos restantes foram realizados de acordo com o protocolo de fracionamento NP-40.

2.4.2. Ensaio Filter trap

Vinte e quatro ou 48 horas após a transfecção as células foram lavadas com PBS e extraídas com tampão de lise (PBS 0.05% Triton X-100 e coquetel inibidor de protease) ou tampão de lise específico para filter trap (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% SDS), e transferidas para uma membrana de acetato (tamanho do poro 0.2 μm , GE Healthcare, Uppsala, Sweden) em um dispositivo Dot-Blot de vácuo. O material agregado foi capturado na membrana e lavada duas vezes com tampão do filter trap contendo 0.1% SDS. Após este procedimento, as membranas foram bloqueadas com PBS e leite 5% e incubadas com os anticorpos apropriados.

2.4.3. Inibição do proteassomo e autofagia

Para testar se as chaperonas aceleravam a degradação da α -sin (WT e A53T), foram usados inibidores do proteassomo (MG132 ou Bortezomida) ou uma combinação de inibidores da autofagia (bafilomicina A1, E64d e pepstatina A). o bloqueio proteassomal foi validado por western blot com o anticorpo contra proteínas ubiquitinadas (FK-2, 1:1000; Sigma). A inibição do fluxo autofágico foi validada com o anticorpo anti-LC3 (para LC3I e LC3II) por western blot.

2.5. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via usando o programa GraphPadPrism para Windows (versão 5.0, GraphPadSoftware, San Diego, Califórnia, USA), foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos da DNAJB6 sobre a expressão da proteína α -sinucleína

A proteína DNAJB6 está presente em todos os metazoários, mas suas funções fisiopatológicas ainda não foram desvendadas. Estudos recentes demonstraram um papel protetor desta chaperona contra a formação de placas amiloides (Bason et al., 2019; Gillis et al., 2013; Kakkar et al., 2016; Månsson et al., 2014; Sarparanta et al., 2012) e, em humanos, mutações no gene da DNAJB6 causa um tipo de distrofia muscular com a formação de estruturas amiloides em células musculares. Apesar dos estudos recentes terem focado no papel da DNAJB6 na supressão da agregação de proteínas poliQ em diferentes modelos (Kakkar et al., 2016), é possível que esta chaperona apresente um papel na agregação de outras proteínas associadas com doenças, como a AD e a PD. Com base nestas evidências, foi-se avaliado os efeitos da superexpressão da HSP40 DNAJB6b sobre a agregação proteica da proteína α -sin. O protocolo de fracionamento com diferentes detergentes (1%NP-40 e 2%SDS) foi utilizado para a obtenção dos lisados provenientes de células da linhagem HEK293T transfectadas com os plasmídeos para α -sin-GFP (WT ou com a mutação A53T) com ou sem a co-transfecção com o constructo V5-DNAJB6b por 48 horas. Parte da α -sin foi encontrada na fração insolúvel 2% SDS, o que sugere a agregação proteica (Figure 40, pellet). A co-expressão com a DNAJB6b não modificou o padrão de insolubilidade da α -sin (WT/A53T)-GFP (Figura 40).

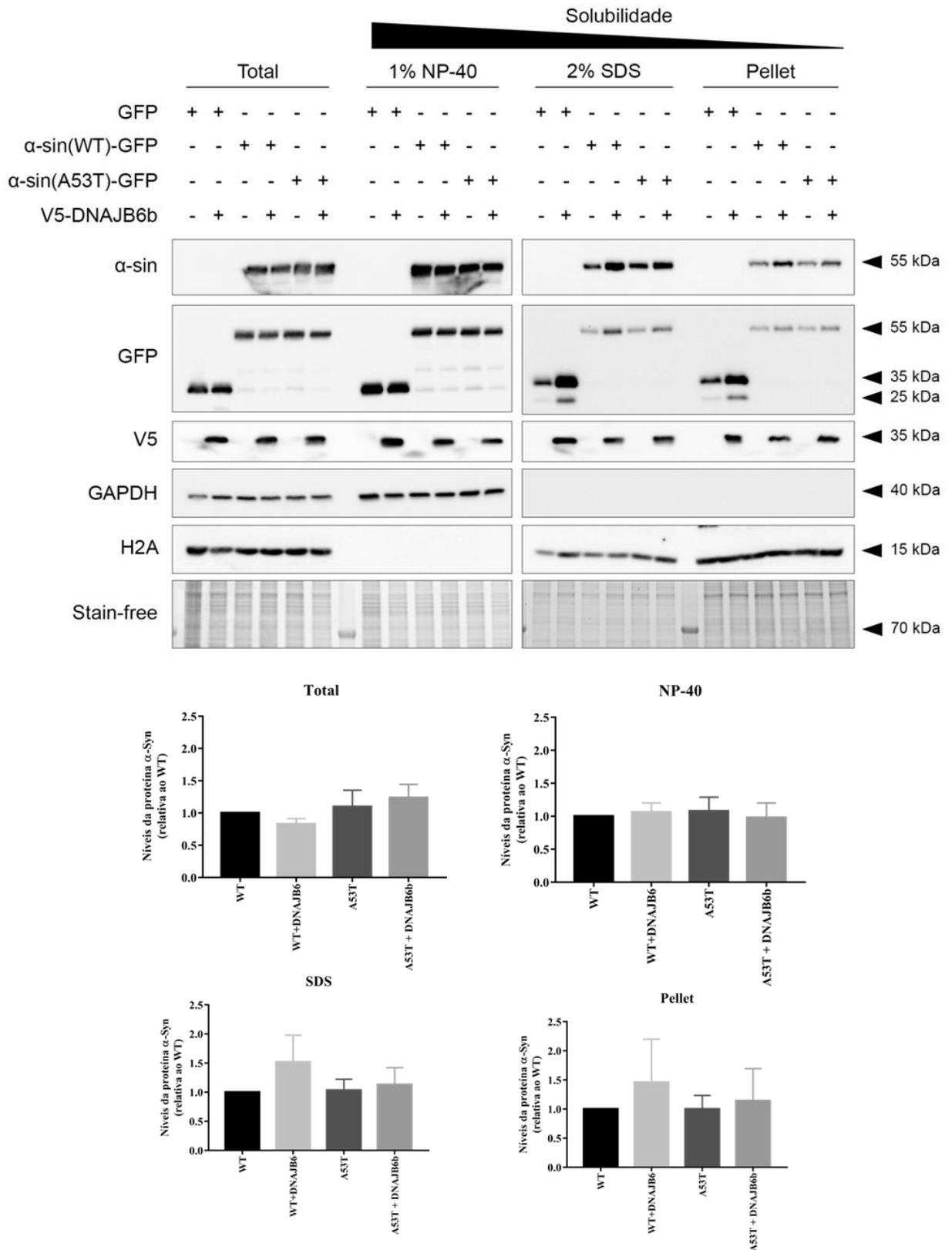


Figura 40: Protocolo de fracionamento proteico com diferentes detergentes. Imagens representativas de Western blot para as frações total, 1% NP-40, 2% SDS e pellet obtidas de células HEK293T co-transfectadas com GFP ou α -sin-GFP (WT ou A53T) com ou sem a co-transfecção com o plasmídeo V5-DNAJB6b por 48 horas, utilizando os anticorpos indicados. Os gráficos referem-se a quantificação dos níveis proteicos de α -sin (obtidos pela marcação com o anticorpo anti- α -sin) para α -sin(WT)-GFP e α -sin(A53T)-GFP nas frações

indicadas. Dados mostrados como média \pm S.E.M. de cinco (para as frações total e 1%NP-40) ou três (para as frações 2% SDS e pellet) experimentos independentes. Os níveis proteicos não diferem estatisticamente entre si em nenhuma das condições analisadas de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) e o pós-teste de Dunnett's para a comparação entre os grupos.

3.2. Inibição da autofagia em diferentes modelos celulares

Inúmeros trabalhos tem demonstrado a importância da autofagia para a agregação e degradação da α -sin (Cuervo, 2004; Wang et al., 2015). Para testar estes efeitos no nosso modelo, a autofagia foi inibida quimicamente em células HEK293T superexpressando a proteína α -sin com ou sem a co-expressão da chaperona DNAJB6b por 24 horas (Figura 41A). Nenhuma diferença foi encontrada entre as frações solúvel e insolúvel com o detergente NP-40 após 6 horas de inibição autofágica em amostras de células expressando somente a proteína α -sin-(A53T)-GFP (que apresenta maior poder de agregação) ou em combinação com V5-DNAJB6b (Figura Suplementar 2). A análise da marcação da proteína LC3, no entanto, não demonstrou acúmulo da fração LC3II quando comparada com as amostras controle tratadas com DMSO, o que sugere que a inibição da autofagia provocada não foi suficiente para promover uma diminuição significativa para esta via de degradação.

Trabalhos anteriores do laboratório demonstraram um acúmulo expressivo da proteína LC3II em células HEK293T tratadas com o coquetel inibidor de autofagia por 24 horas (Figura Suplementar 3). O protocolo foi testado e um aumento singular dos níveis de LC3II foi observado (Figura 41A). É possível notar que o tratamento com as substâncias bafilomicina A, E64d e pepstatina A não gerou modificações significativas nos níveis da proteína α -sin(WT). No entanto, é possível notar um aumento nos níveis da proteína mutante A53T. Em ambos os casos, a co-expressão com a DNAJB6b levou a diminuição dos níveis proteicos de α -sin independente do tratamento para inibir a autofagia. Essas descobertas sugerem que a modulação dos níveis da α -sin pela DNAJB6b pode ser independente da via de degradação autofágica.

Com base nos dados obtidos referentes à diminuição dos níveis de α -sin com a co-transfecção da DNAJB6b, foi analisado o mesmo protocolo na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y, que é comumente utilizada como modelo para a PD. Inicialmente, células não-diferenciadas foram utilizadas para analisar o potencial modulatório da DNAJB6b sobre os níveis totais da α -sin (Figura 41B e 41C). Em ambos os casos (WT e A53T), a superexpressão da DNAJB6b em combinação com a inibição da autofagia levou a redução dos níveis totais da α -sin, e tal efeito foi mais forte para a versão mutante A53T. Curiosamente, a superexpressão da DNAJB6b, por si só, levou ao aumento dos níveis de α -sin(WT).

O próximo passo foi avaliar se a mesma resposta seria observada em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico e BDNF. Após 10 dias de diferenciação, as células transfectadas transientemente (com os plasmídeos GFP ou WT e A53T α -sin-GFP) mostraram-se positivas para o marcador neuronal MAP2 (dado não mostrado). O Western blot das amostras, no entanto, não detectou a presença da proteína α -sin-GFP, somente a fração endógena da α -sin (Figura Suplementar 4B), o que salienta a necessidade da utilização de linhagens estáveis expressando a proteína α -sin.

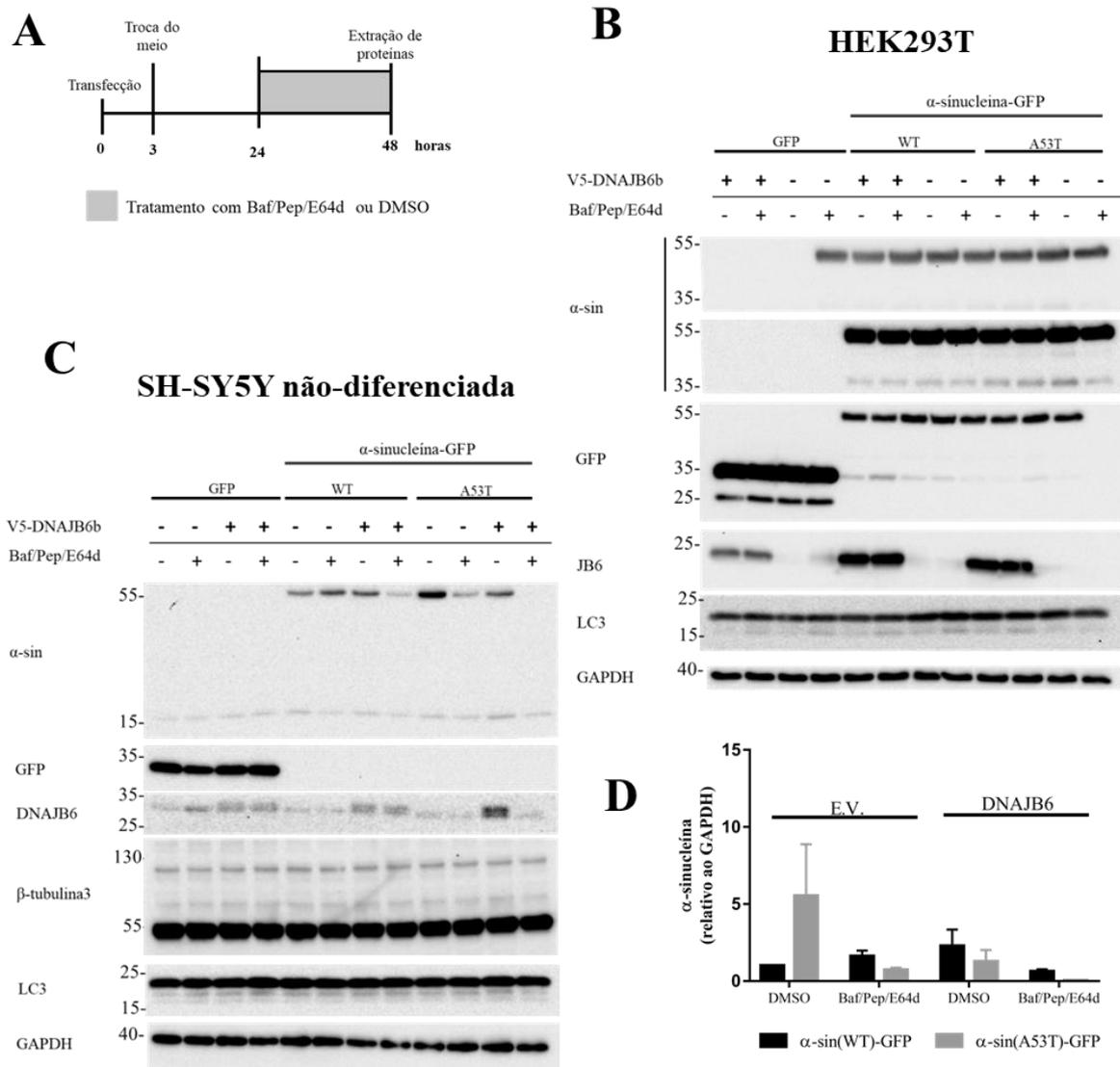


Figura 41: DNAJB6b selvagem reduz os níveis proteicos de α -sin-GFP após 48 horas em células HEK293T e SH-SY5Y não-diferenciadas. Design experimental da inibição da autofagia por 48 horas (A). Imagens representativas de Western blot de amostras de células transfectadas com GFP ou α -sin-GFP (WT e A53T) com ou sem a co-expressão da chaperona V5-DNAJB6b por 48 horas em células HEK293T (B) ou SH-SY5Y (C) tratadas com inibidores de autofagia (bafilomicina A, pesptatina A e E64d) por 24 horas ou com DMSO como controle, utilizando os anticorpos indicados. Quantificação dos dados obtidos em B com a α -sin(WT)-GFP DMSO como controle (D). Dados apresentados como média \pm S.E.M. de dois experimentos independentes.

3.3. Efeitos da chaperona DNAJB6b sobre a α -sinucleína com a presença de uma arginina na porção N-terminal

Aprile et al., (2017) observou que a chaperona DNAJB6 poderia suprimir a agregação da α -sin em um modelo celular, o que levantou a hipótese de que a chaperona em questão poderia modular os níveis proteicos totais e/ou a solubilidade da α -sin. O mesmo estudo demonstrou que células *knockout* para DNAJB6 (DNAJB6 KO) formavam mais punctas de α -sin do que células expressando DNAJB6 endógena. Um experimento muito similar foi realizado nesta pesquisa, também com células DNAJB6 KO, mas nenhuma puncta foi observada (Figura S5C). No entanto, Aprile et al., (2017) utilizou uma linhagem estável de células expressando α -Sin-DsRed2, enquanto que as nossas células superexpressavam α -sin-GFP de forma transiente. Eles também demonstraram em experimentos *in vitro* com proteínas purificadas, que a adição da HSP70 em conjunto com a DNAJB6 promoveram a inibição mais eficiente da formação de fibrilas de α -sin, quando comparadas somente com Hsp70, proporcionando alguns *insights* sobre como os diferentes componentes da maquinaria da Hsp70 atuam de forma sinérgica para suprimir a agregação da α -sin.

Curiosamente, resultados anteriores do grupo do prof. Kampinga, sugeriram que a DNAJB6b apresenta um papel na via de degradação da *N-end-rule* que opera via proteassomo (Figura Suplementar 5A). A via da *N-end-rule* compreende um *set* de sistemas proteolíticos que reconhecem proteínas contendo a presença de sinais para degradação na região N-terminal (chamados de N-degrons), levando para a degradação via proteassomo dessas proteínas (Oh et al., 2017). Estes resultados permitiram levantar a hipótese de que a DNAJB6b poderia modular os níveis de α -sin especificamente por esta via de degradação. Visando obter evidências para corroborar esta hipótese, os constructos de α -sin marcadas com GFP foram utilizados, mas o primeiro resíduo de metionina foi substituído por resíduo de arginina (apresentados a partir deste momento como α -sin(WT)-arginina-GFP e α -sin(A53T)-arginina-GFP), em células HEK293T, atuando portanto, como um sinal *degron* para esta via. Enquanto que a DNAJB6b não modulou os níveis totais dos constructos de α -sin sem o resíduo da arginina na porção N-terminal, ela foi capaz de diminuir de forma eficiente os níveis dos substratos marcados para a via da *N-end-rule* (ambos, α -sin(WT)-arginina-GFP e α -sin(A53T)-arginina-GFP; Figura 42A). As células foram fixadas com paraformaldeído 2% e analisadas em microscopia de fluorescência (Figura 42B e 42C). É possível notar a presença de algumas punctas, especialmente nas amostras expressando a α -sin mutante A53T, o que se assemelha ao padrão de pequenos agregados. O mesmo experimento foi realizado com células

HEK293T *knockout* para DNAJB6 (DNAJB6 KO), no entanto, nenhuma puncta GFP-positiva foi encontrada (dados não mostrados). Os níveis proteicos das variantes da α -sin-arginina nas células HEK293T selvagem e DNAB6 KO foram acessadas por Western blot (Figura 43A). Os resultados obtidos corroboraram as imunofluorescências, sugerindo que a co-expressão com a DNAJB6b resultou numa diminuição nos níveis de GFP nas células transfectadas com os constructos α -sin-arginina-GFP (Figura 43B).

Para testar se este modelo celular era capaz de induzir à agregação de α -sin-arginina-GFP e se a co-transfecção com DNAJB6b era capaz de resgatar este fenótipo, um ensaio de *filter trap* foi realizado, no entanto, nenhuma banda foi detectada, o que pode sugerir que a proteína α -sin(WT)-arginina-GFP é solúvel e não forma agregados neste modelo, ou que o protocolo para este ensaio requer outras otimizações para detectar a agregação de α -sin (dados não mostrados).

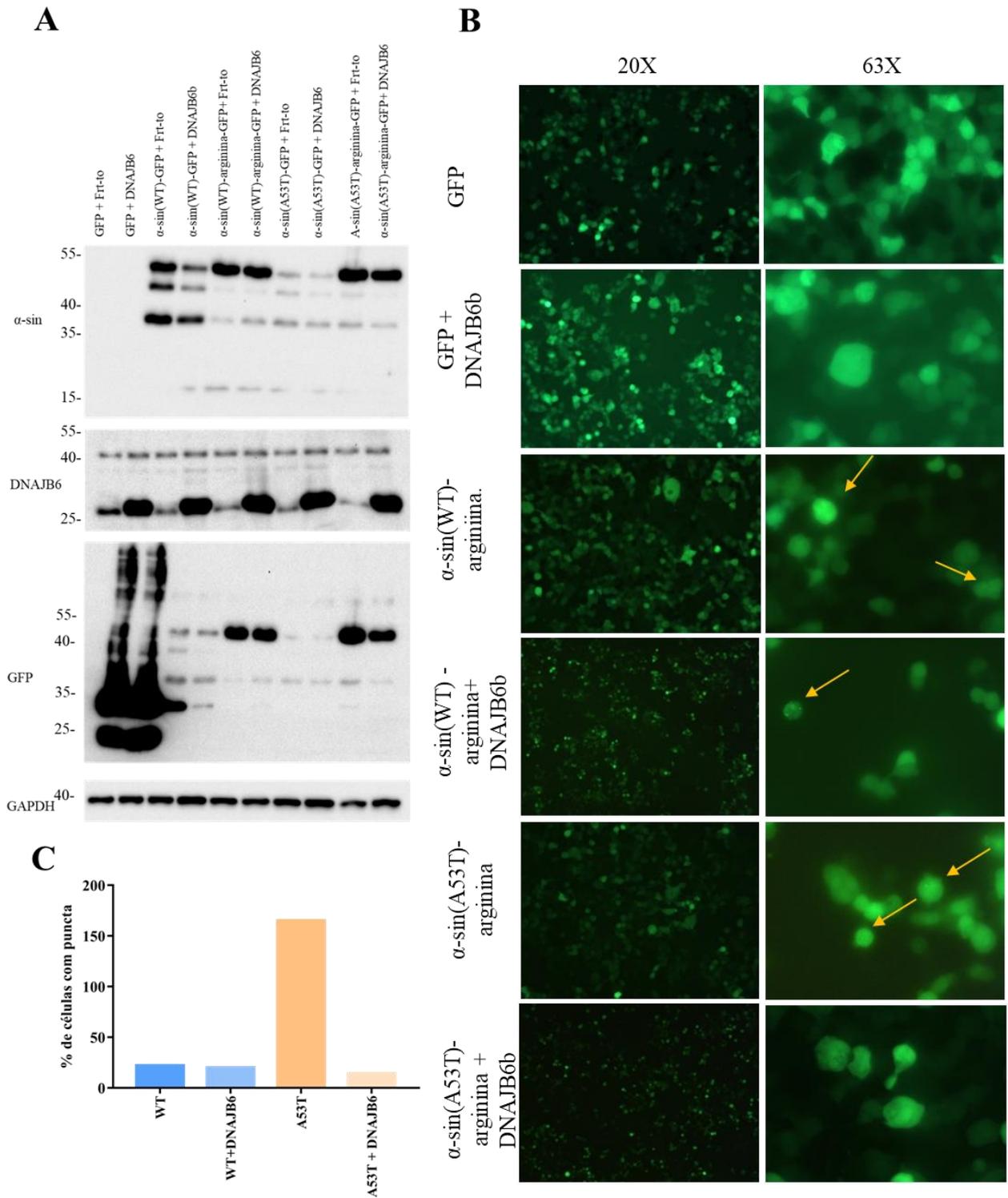


Figura 42: Efeito da DNAJB6 sobre os níveis proteicos de α -sin-arginina-GFP. Imagens representativas de Western blot de células transfectadas com o vetor vazio (Frt-to), GFP, α -sin(WT)-GFP, α -sin(A53T)-GFP, α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP e co-transfectadas ou não com V5-DNAJB6b, e marcadas com os anticorpos indicados (A). Imagens de imunofluorescência de células vivas transfectadas com GFP, α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP com ou sem a co-expressão de V5-DNAJB6b por 24 horas em células HEK293T (20 e 63X). Flechas amarelas apontam para estruturas em forma de puncta (B). Quantificação do dado obtido em B (C).

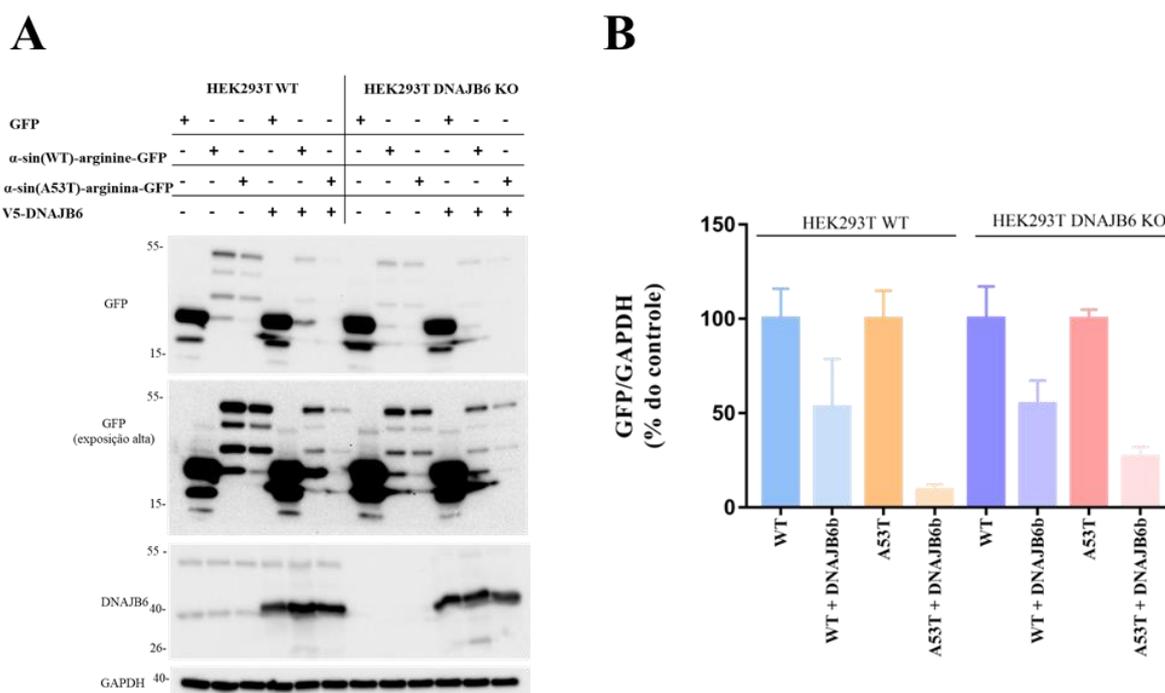


Figura 43: Diminuição nos níveis de α -sin(WT)-arginina-GFP e α -sin(A53T)-arginina-GFP em células superexpressando DNAJB6b. Os níveis de GFP foram acessados por Western blot em amostras extraídas com buffer RIPA 0.1% SDS (A). Quantificação dos dados obtidos em A para a intensidade de GFP (B). Os grupos co-transfectados com DNAJB6 foram comparados com os grupos transfectados somente com α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP extraídos com RIPA 0.1% SDS. Resultados obtidos como porcentagem do controle (WT e A53T) \pm SD de dois experimentos.

3.4. A região rica em S/T da DNAJB6 é necessária para a degradação da α -sinucleína-arginina-GFP

Dados anteriores do grupo do professor Kampinga revelaram a importância de uma região conservada rica em serina/treonina (S/T) no domínio C-terminal da chaperona DNAJB6 para a supressão da agregação de proteínas poliQ e para a inibição da sua nucleação primária (Hageman et al., 2011; Kakkar et al., 2016), sugerindo que a região em questão é o domínio de ligação ao substrato da chaperona DNAJB6. Recentemente demonstrou-se também o papel desta região na inibição da formação de fibrilas do peptídeo A β com 42 aminoácidos (Månsson et al., 2018). Kakkar et al (2016) gerou mutantes da proteína DNAJB6b em que 6, 13 ou 18 resíduos S/T foram substituídos por resíduos de alanina – denominados de mutantes M1, M2 e M3, respectivamente (Figura 44A). Os resultados obtidos até o momento, demonstraram que a DNAJB6b selvagem mostrou-se eficiente em promover a degradação do substrato α -sin-arginina-GFP (para ambas as variantes, WT e A53T). Logo, decidimos testar se a região rica em S/T também apresenta algum papel na degradação do substrato α -sin-arginina-GFP. Os resultados obtidos com Western blot para a

DNAJB6 WT mostrou uma redução significativa nos níveis de α -sin(WT/A53T)-arginina-GFP (salientando a reprodutibilidade dos resultados obtidos até o momento), mas que os três mutantes analisados, M1-M3, foram incapazes de reproduzir o mesmo fenótipo (Figuras 44B-D). Nenhuma diferença foi encontrada entre a DNAJB6b WT e seus mutantes em relação aos níveis da variante mutada A53T (Figura 44D).

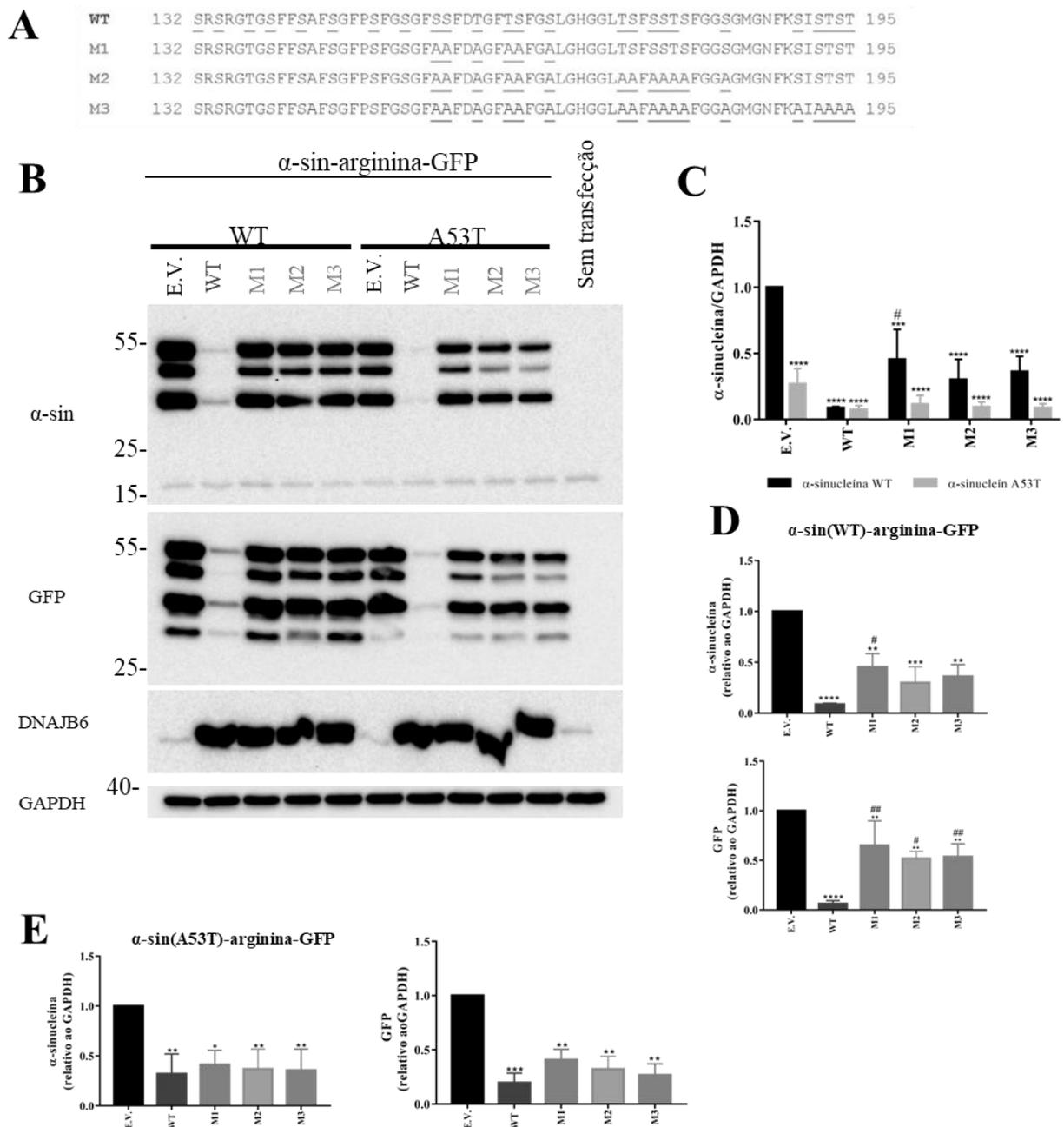


Figura 44: Mutantes da proteína DNAJB6b são incapazes de reduzir os níveis proteicos de α -Sin(WT)-arginina-GFP em células HEK293T. Sequência de aminoácidos da proteína DNAJB6b selvagem com os resíduos S/T sublinhados (WT), e as suas respectivas variantes mutantes (M1-M3), com 6, 13 e 18 resíduos S/T substituídos por alanina (A) sublinhados (modificado de Kakkar et al., 2016) (A). Western blot dos extratos celulares transfectados com α -sin-arginina-GFP (WT ou A53T) e V5-DNAJB6 (WT ou mutantes M1-M3), marcadas com os anticorpos indicados (B). Quantificação dos dados em (B) (C). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, comparado com o controle (E.V. α -SinWT-arginina-GFP); # $p < 0.05$ comparado com WT DNAJB6b. Análise de

variância de duas vias ANOVA com pós-teste de Tukey (média \pm SD de três experimentos independentes). Quantificação dos dados obtidos em (B) comparando o grupo α -sin(WT)-arginina-GFP (**D**) ou com α -sin(A53T)-arginina-GFP (**E**). Dados apresentados como média \pm S.E.M. de três experimentos. Análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ comparado com o controle (E.V.); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ comparado com WT DNAJB6b.

Com o intuito de se analisar de forma mais completa o efeito dos mutantes da DNAJB6b sobre a supressão da agregação do nosso substrato contendo o resíduo de argina, um ensaio de *filter trap* foi realizado, no entanto, os resultados utilizando o protocolo vigente não foi informativo, sugerindo que a proteína α -sin-arginina-GFP não forma verdadeiros agregados proteicos, ou que o ensaio necessita de melhor otimização.

3.5. Efeito de outros membros do grupo DNAJs/HSP40 nos níveis proteicos de α -sinucleína-arginina-GFP

Para investigar se outras chaperonas da família DNAJ/HSP40 também podiam levar a uma diminuição nos níveis da proteína α -sin-arginina-GFP, células HEK293T foram co-transfectadas com diferentes DNAJs (marcadas com a tag V5) e com a α -sin(A53T)-arginina-GFP. Entre todas as DNAJs testadas, a DNAB6b WT foi a que demonstrou maior eficiência na redução dos níveis da proteína analisada, seguida pela DNAJB1 e DNAJB2a (Figura 45). Como demonstrado anteriormente nesta pesquisa, as mutantes para DNAJB6b não foram efetivas em reduzir os níveis proteicos da α -sin(A53T)-arginina-GFP, quando comparadas com a amostra co-transfectada com o vetor vazio (E.V.- amostras controle). É importante ressaltar que a co-expressão de algumas DNAJs (DNAJB4 e DNAJA1) provocaram o efeito oposto ao da proteína DNAJB6b, levando ao aumento dos níveis proteicos de α -sin(A53T)-arginina-GFP. Analisados de forma conjunta, os dados obtidos sugerem que, apesar de não exclusivo, a diminuição do níveis do substrato α -sin(A53T)-arginina-GFP foi realizado de forma mais eficiente pela ação da chaperona DNAJB6b WT ($p < 0,05$), do que se comparado com as outras representantes da família das DNAJs.

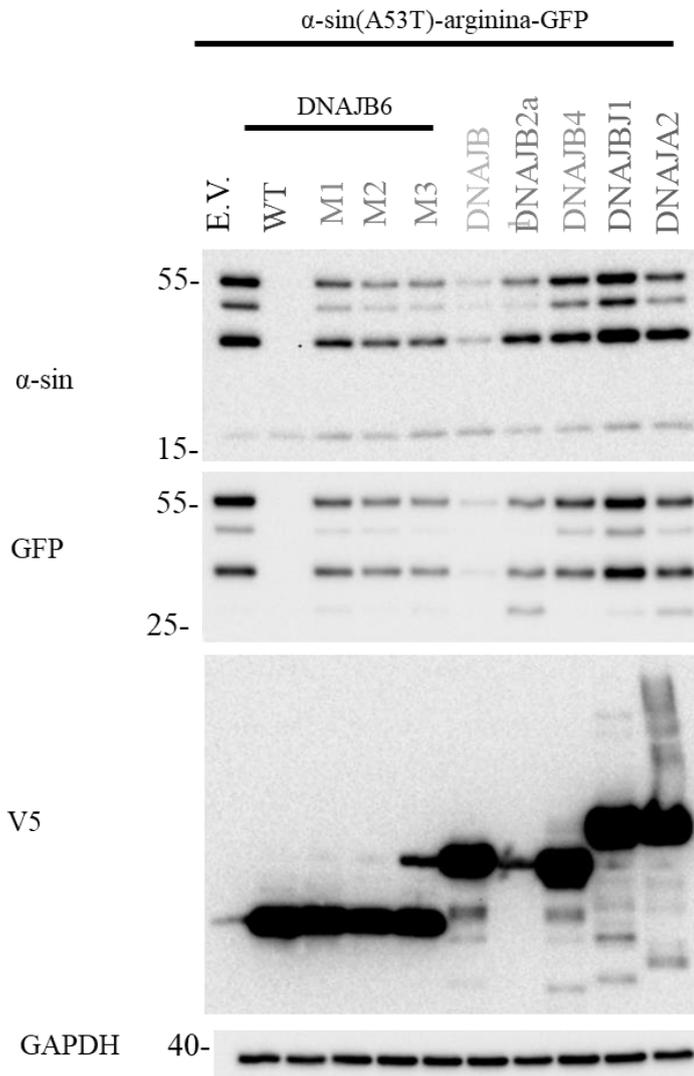
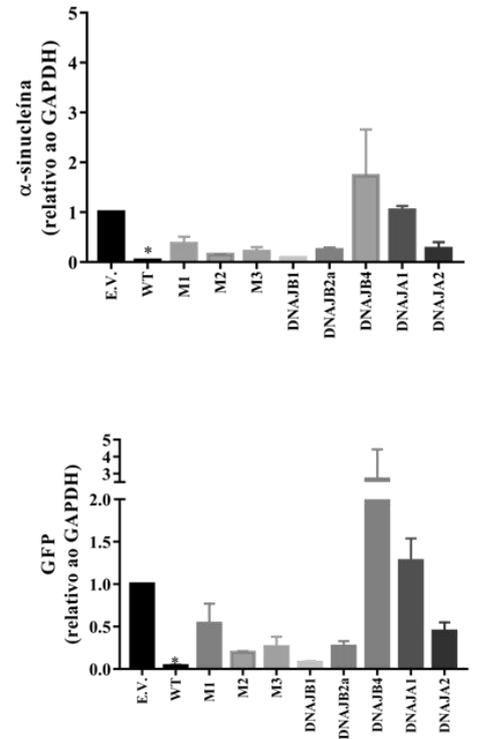
A**B**

Figura 45: DNAJB6b WT é a DNAJ mais eficiente em reduzir os níveis da proteína α -sin(A53T)-arginina-GFP em células HEK293T. Western blot de células transfectadas com α -sin(A53T)-arginina-GFP e diferentes plasmídeos V5-DNAJ marcadas com os anticorpos indicados (A). Quantificação dos dados obtidos em (A) (B). * $p < 0.05$; teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's (média \pm S.E.M. de três experimentos independentes).

3.6. Inibição do proteossomo com bortezomida e MG132 em células HEK293T para indução da agregação de α -sinucleína-arginina-GFP

Para tentar induzir a agregação do substrato α -sin-arginina-GFP por meio da perturbação da homeostase proteica, foi-se inserido diferentes inibidores do proteossomo em células HEK293T. As células foram tratadas com as substâncias bortezomida ou MG132 (Figura 46) por 6 e 15 horas, respectivamente. Nenhuma diferença foi encontrada no que diz respeito à formação de puncta com os tratamentos de 0.1 μ M de bortezomida ou 5 μ M de MG132, quando comparado com as amostras sem tratamento. Os níveis proteicos foram acessados por

Western blot para ambos os tratamentos (Figura 46A e 46B). Com o objetivo de investigar se o tratamento com a bortezomida levava a insolubilização da α -sin-arginina-GFP, um protocolo de fracionamento proteico foi realizado utilizando diferentes detergentes (Figura suplementar S6), mas apenas um arraste nas amostras expressando somente GFP (amostras controle) foi observado, o que sugere que a tag de GFP poderia formar agregados de forma espontânea (i.e., sem a necessidade da proteína α -sin) e que talvez possa afetar o padrão de insolubilidade da proteína α -sin, indicando que a inibição do proteassomo não gerou qualquer efeito no modelo proposto. O tratamento com MG132, por sua vez, diminuiu os níveis de α -sin-arginina-GFP (WT e A53T), o que pode indicar um aumento na via de degradação autofágica em decorrência do tratamento, causando a degradação acelerada da proteína α -sin(A53T)-arginina-GFP (Figura 46B). A inibição proteassomal com MG132 resulta na diminuição da proliferação celular e no estímulo autofágico por meio da regulação das proteínas Beclina-1 e LC3 (Kocaturk and Gozuacik, 2018)

A inibição proteassomal gerada pelo tratamento com a bortezomida elevou os níveis proteicos da α -sin(A53T)-arginina-GFP. O efeito da superexpressão da DNAJB6b também foi notado, levando a diminuição dos dois substratos α -sin-arginina-GFP, evidenciado pela marcação com os anticorpos anti-GFP ou anti- α -sin (Figura 46A). Deve ser salientado, no entanto, que a inibição proteassomal com bortezomida foi menos agressiva do que aquela induzida por MG132, com base nas marcações obtidas para os níveis totais de proteínas ubiquitinadas.

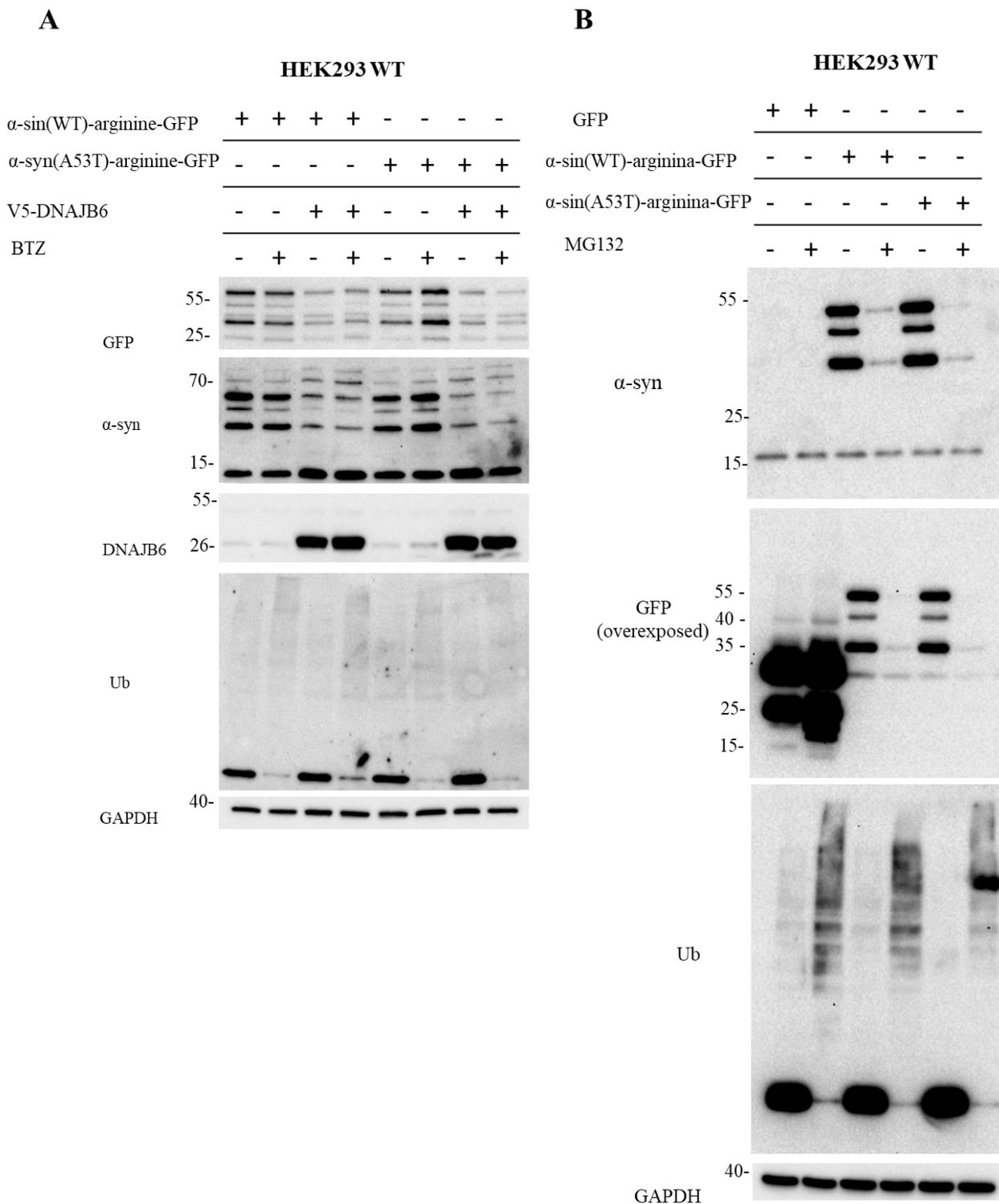


Figura 46: Inibição do proteassomo com bortezomida ou MG132 em células HEK293T transfectadas com os constructos α -sin-arginina-GFP. Imagens representativas de Western blot de células transfectadas com α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP, e com V5-DNAJB6b, tratadas com 0,1 μ M de bortezomida ou 0,1% de DMSO por 6 horas e marcadas com os anticorpos indicados (A). Imagens representativas de Western blot de células transfectadas com GFP ou α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP e tratadas com o inibidor de proteassomo MG132 por 12 horas, ou com DMSO como controle, e marcadas com os anticorpos indicados (B).

As amostras celulares foram fixadas com paraformaldeído 2% e posteriormente foram submetidas à imunomarcagem com o anticorpo anti- α -sin. Curiosamente, a inibição do proteossomo pela ação da bortezomida levou a um padrão mais difuso na marcação da proteína α -sin se comparado com a formação das punctas bem visíveis e delimitadas nas amostras controle (Figura 47). A co-expressão com a chaperona DNAJB6b levou à diminuição nos níveis de GFP e na imunorreatividade da α -sin em células expressando α -sin(WT)-arginina-GFP (Figura 47A). Em contraste, as células transfectadas com α -sin(A53T)-arginina-GFP tiveram punctas bem definidas independentemente da co-expressão com DNAJB6b (Figura 47B). Sobre a ação da inibição proteica conjuntamente com a co-expressão com DNAJB6b, todas as punctas α -sin positivas estavam localizadas em regiões específicas próximas ao núcleo celular, semelhante a estruturas denominadas de agregossomos (Figura 47B).

Uma observação fundamental é que os construtos utilizados para a superexpressão da α -sin apresentavam uma tag GFP, o que por si só poderia perturbar o padrão de agregação da α -sin, como demonstrado por diferentes autores (McLean et al., 2001; Opazo et al., 2008), e também demonstrado nesta pesquisa com inclusões positivas para α -sin sem apresentar um sinal GFP (Figura 47). McLean et al., (McLean et al., 2001) demonstrou que a tag GFP era clivada nos constructos α -sin-GFP, levando à formação de proteínas parcialmente truncadas de 27kDa. O mesmo trabalho também demonstrou que tais inclusões não fluorescentes levavam a formação espontânea de inclusões de α -sin em neurônios de camundongos e em cultura de células de neuroglioma em uma quantidade superior do que as células transfectadas com o constructo intacto de α -sin-GFP. Uma importante evidência deste estudo foi de que a α -sin sem a presença de uma tag não apresentava a capacidade de formar agregados, o que aponta a utilização de diferentes proteínas repórteres em futuros experimentos para acionar a agregação da proteína α -sin.

É importante ressaltar que o objetivo do capítulo 3 desta pesquisa foi acessar o efeito de diferentes chaperonas, membros da família DNAJ/HSP40, especialmente a DNAJB6, sobre a superexpressão da α -sin, tanto selvagem quanto a versão A53T mutante responsável por uma forma familiar da PD. Como a DNAJB6 é um poderoso supressor da agregação de poliQ, hipotetizamos se o mesmo cenário poderia ser verdadeiro para a agregação da proteína α -sin. No entanto, a maior limitação desta parte do trabalho foi estabelecer um modelo em que a α -sin estivesse de fato formando agregados. Como descrito aqui, os ensaios de *filter trap* não foram capazes de detectar agregados de α -sin (dados não mostrados), que, por sua vez,

detectaram de forma satisfatória agregados de poliQ (Hageman et al., 2011; Kakkar et al., 2016). Esses dados sugerem que o protocolo de *filter trap* deve ser otimizado para a detecção de agregados contendo α -sin, ou ainda, que as punctas de α -sin detectadas por imunofluorescência não eram verdadeiros agregados SDS-insolúveis (Figura 47). Apesar de a literatura apontar a importância dos agregados de α -sin na PD, é importante delimitar se de fato a agregação da referida proteína é fundamental para o seu efeito neurotóxico. A mutação H50Q eleva a capacidade de agregação da α -sin, no entanto, outra mutação familiar de origem precoce da PD, a mutação G51D apresenta um efeito oposto com diminuição dessa capacidade de formação de inclusões (Emanuele and Chiergatti, 2015).

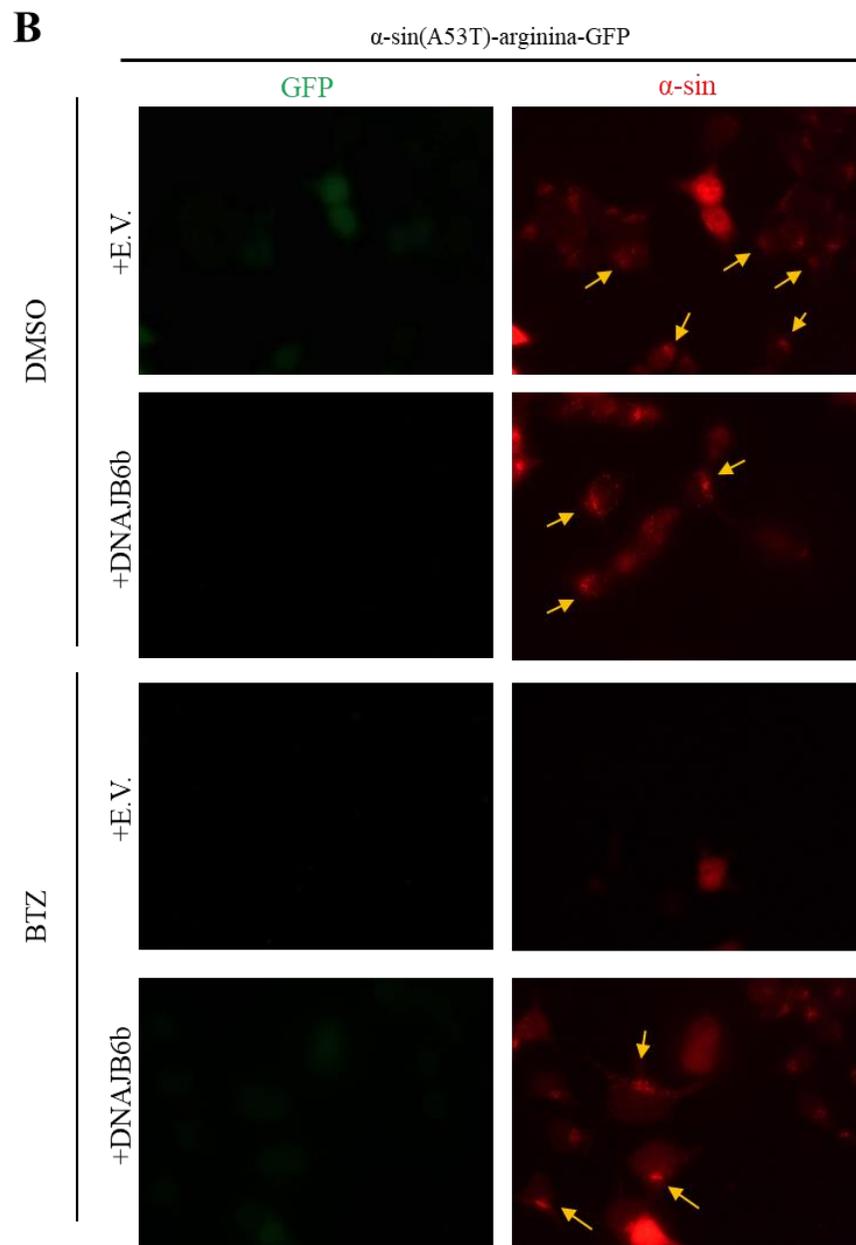
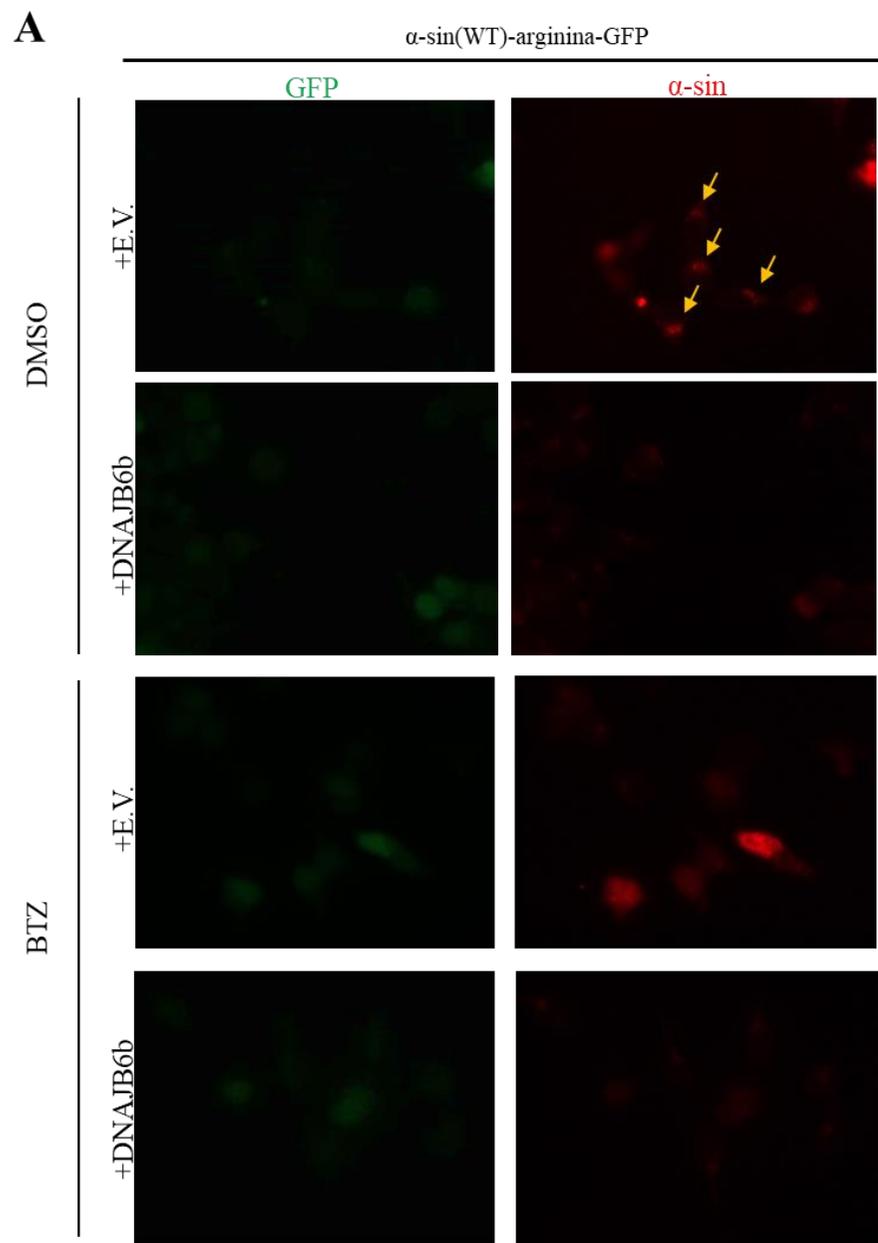


Figura 47 (página anterior): Efeito da inibição do proteassomo pela ação da bortezomida em células HEK293T superexpressando somente a α -sin-arginina-GFP ou em combinação com V5-DNAJB6b. Imagens digitais ilustrativas revelando a imunoreatividade contra a proteína α -sin (vermelho) e GFP (verde) para células transfectadas com α -sin(WT)-arginina-GFP (A) ou com α -sin(A53T)-arginina-GFP (B) tratadas com bortezomida ou DMSO como controle. Setas amarelas evidenciam a formação de punctas.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os experimentos realizados e os dados apresentados acima, podemos concluir que:

1. A chaperona DNAJB6 não modificou o padrão de insolubilidade da α -sin(WT/A53T)-GFP.
2. A tag GFP pode perturbar o padrão de agregação da α -sinucleína.
3. A chaperona DNAJB6 foi eficiente em reduzir os níveis proteicos dos os constructos da α -sin-arginina-GFP, o que apontam para um possível papel na via de degradação da *N-end-rule*.
4. A região rica em S/T da DNAJB6 é fundamental para o reconhecimento e redução do substrato α -sin-arginina-GFP.
5. A chaperona DNAJB6 foi a mais eficiente entre as proteínas J analisadas, na redução dos níveis proteicos de α -sin-arginina-GFP.

Outros experimentos precisam ser realizados com para que os efeitos da chaperona DNAJB6 nas vias de degradação analisadas sejam delimitadas de forma mais contundente e apropriada.

5. FIGURAS SUPLEMENTARES

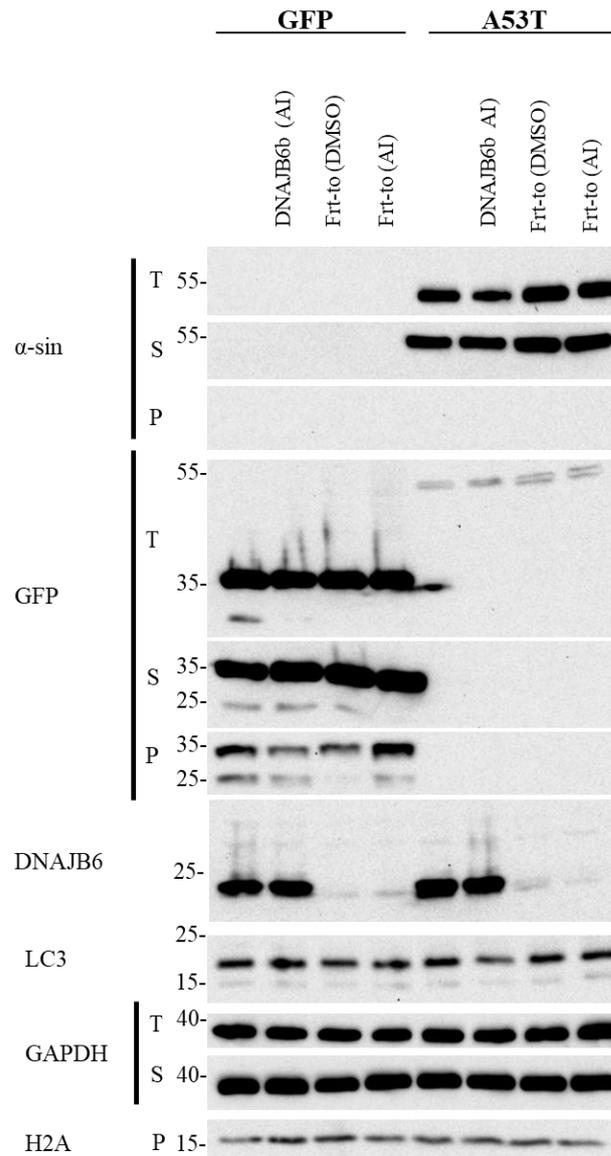


Figura S2: Protocolo de fracionamento proteico com inibição da autofagia. Imagens representativas de Western blot do fracionamento proteico NP-40 em células HEK293T co-transfectadas com plasmídeos Frt-to contendo GFP ou com α -sin-A53T-GFP com ou sem a co-expressão da V5-DNAJB6b, tratada com inibidores da autofagia (bafilomicina, pepstatina A e E64d- AI) ou DMSO por 6 horas, usando os anticorpos indicados.

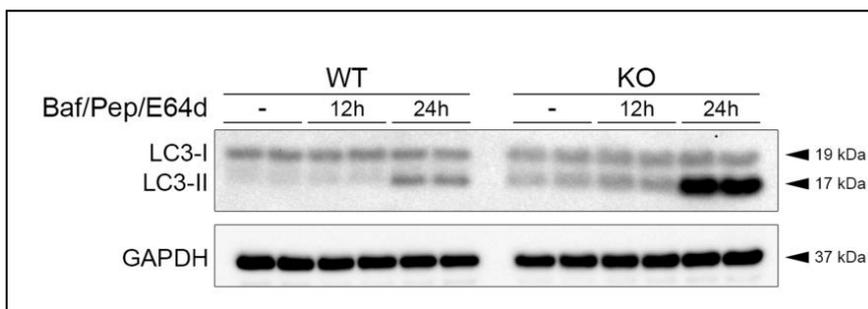


Figura S3: Inibição da autofagia por 12 e 24 horas. Resultados anteriores do laboratório do professor Kampinga demonstrando o aumento nos níveis da LC3II após a inibição autofágica por 24 horas em células HEK293T selvagens (WT) e DNAJB6 knockout (KO).

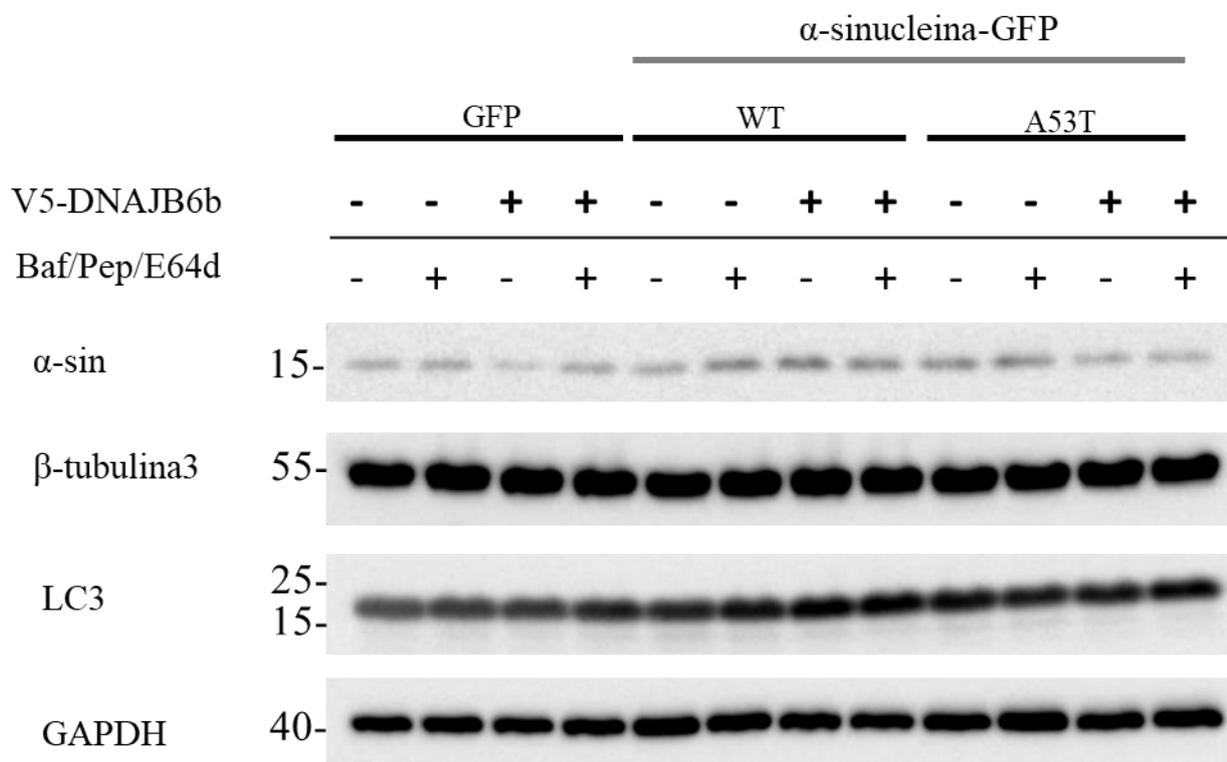


Figura S4: Protocolo de diferenciação de células SH-SY5Y expressando, de forma transiente, constructos de α -sin. Imagens representativas de Western Blot obtida dos extratos celulares de células SH-SY5Y diferenciadas e transfectadas com GFP ou α -sin(WT)-GFP ou α -sin(A53T)-GFP com ou sem a co-expressão da V5-DNAJB6b por 48 horas e tratadas com inibidores da autofagia (bafilomicina, pepstatina A e E64d) por 24 horas ou com DMSO como controle, com os anticorpos indicados.

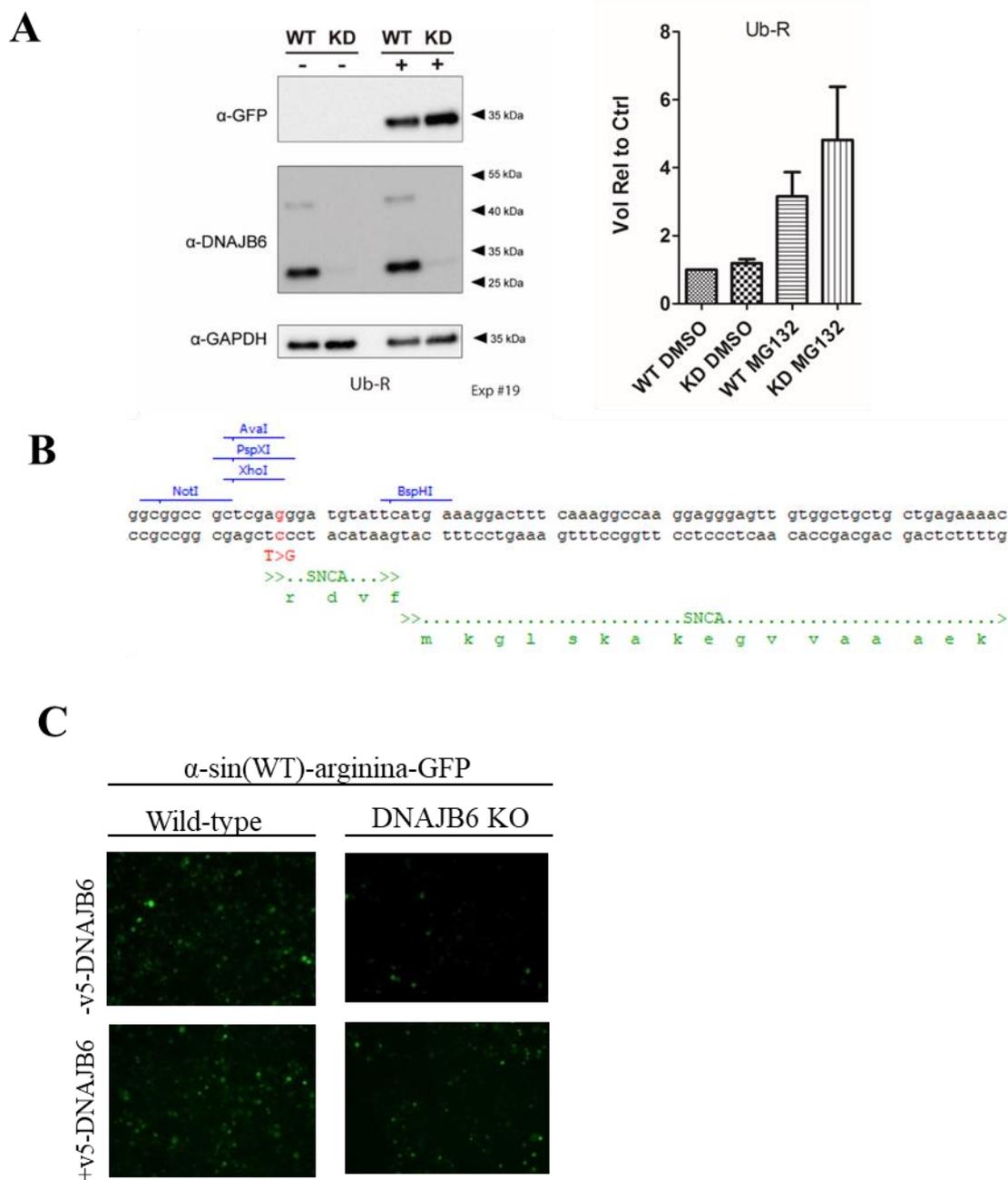


Figura S5: Níveis de α -sin-arginina-GFP em células HEK293T selvagem (WT) ou *knockout* (KO) para DNAJB6. Resultados anteriores do laboratório do professor Kampinga com células HEK293T WT e KO para DNAJB6 transfectadas com Ub-R-GFP (um plasmídeo repórter para a via N-end-rule) e tratada com MG132, um inibidor proteossomal, indicando um prejuízo da via da N-end rule na ausência de DNAJB6 (A). Sequencia de aminoácidos dos constructos de α -sin-arginina-GFP, que codifica para um resíduo de argina na porção N-terminal da proteína (B). Imagens de imunofluorescência mostrando células HEK293T transfectadas com α -sin(WT)-arginina-GFP com ou sem a co-transfecção com V5-DNAJB6b por 48 horas. Os níveis de GFP foram acessados por microscopia de fluorescência (10X) (C).

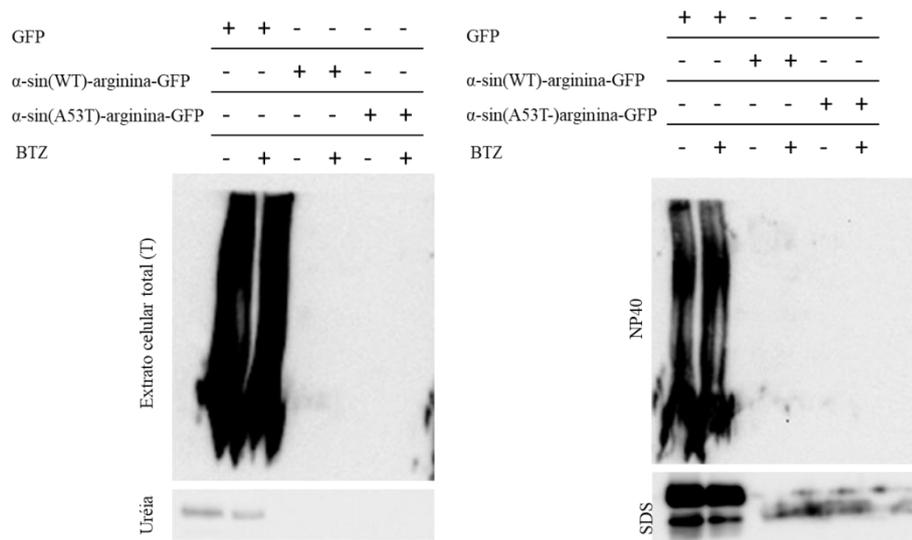


Figura S6: Padr es de solubiliza o de c lulas HEK293T superexpressando α -sin-arginina-GFP sobre inibi o do proteassomo. Western blot representativo das fra es do extrato celular total (T), NP-40, SDS e ur ia transfectedas com GFP, α -sin(WT)-arginina-GFP ou α -sin(A53T)-arginina-GFP sobre inibi o proteassomal com Bortezomida. As membranas foram marcadas com anticorpo anti-GFP.

CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES FINAIS

O tratamento com rotenona foi capaz de induzir a uma disfunção autofágica em células de cultura primária do hipocampo na concentração de 0,3nM de rotenona, por 48 horas, em um cenário de disfunção proteica anterior à formação de agregados.

Os níveis endógenos da co-chaperona BAG2 diminuíram de forma significativa em células de cultura primária de hipocampo expostas à 1nM de rotenona por 48 horas, o que também ocasionou o aumento dos níveis de proteína pTau.

O tratamento com 1μM de rotenona em células SH-SY5Y não-diferenciadas e diferenciadas com ácido retinóico, por 4,5 horas levou à disfunção mitofágica e aumento dos níveis da proteína pTau.

A superexpressão da co-chaperona BAG2 induziu ao aumento dos níveis da proteína p62/SQSTM1 em células de cultura primária do hipocampo e do locus coeruleus e levou à diminuição dos níveis desta mesma proteína em células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico, o que reforça a hipótese de que a co-chaperona analisada apresenta um papel região e célula específica.

A co-chaperona BAG2 foi capaz de levar à redução dos níveis da proteína α-sinucleína A53T somente em células SH-SY5Y diferenciadas, o que salienta a hipótese de que a referida co-chaperona possa apresentar uma ação substrato específica.

A chaperona DNAJB6 levou à diminuição dos níveis da proteína α-sinucleína em células SH-SY5Y não-diferenciadas quando submetidas à inibição autofágica, sugerindo que o seu papel da degradação do referido substrato é dependente da autofagia .

A diminuição dos níveis proteicos do substrato de α-sin-arginina-GFP com a co-expressão de DNAJB6 WT apontam para um papel da chaperona na via de degradação da N-end-rule, cujo papel é dependente do reconhecimento do substrato por meio da região rica em S/T.

A co-expressão da chaperona DNAJB6 foi capaz de induzir à formação de estruturas semelhantes a agregossomos em células HEK293T que superexpressavam α-sin(A53T)-arginina-GFP .

A chaperona DNAJB6 foi a mais eficiente na redução dos níveis do constructo α -sin-arginina-GFP se comparada com outros membros da família das HSP40s.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aprile, F.A., Källstig, E., Limorenko, G., Vendruscolo, M., Ron, D., and Hansen, C. (2017). The molecular chaperones DNAJB6 and Hsp70 cooperate to suppress α -synuclein aggregation. *Sci. Rep.* *7*.
- Bason, M., Meister-Broekema, M., Alberts, N., Dijkers, P., Bergink, S., Sibon, O.C.M., and Kampinga, H.H. (2019). Astrocytic expression of the chaperone DNAJB6 results in non-cell autonomous protection in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* *124*, 108–117.
- Bondareff, W., Mountjoy, C.Q., and Roth, M. (1982). Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* *32*, 164–168.
- Brive, L., Takayama, S., Briknarová, K., Homma, S., Ishida, S.K., Reed, J.C., and Ely, K.R. (2001). The carboxyl-terminal lobe of Hsc70 ATPase domain is sufficient for binding to BAG1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *289*, 1099–1105.
- Brunnström, H., Friberg, N., Lindberg, E., and Englund, E. (2011). Differential degeneration of the locus coeruleus in dementia subtypes. *Clin. Neuropathol.* *30*, 104–110.
- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.
- Cabello, C.R., Thune, J.J., Pakkenberg, H., and Pakkenberg, B. (2002). Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *28*, 283–291.
- Carrettiero, D.C., Hernandez, I., Neveu, P., Papagiannakopoulos, T., and Kosik, K.S. (2009). The Co-chaperone BAG2 Sweeps PHF Insoluble Tau from the Microtubule. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 2151–2161.
- Chaves, R.S., Melo, T.Q., Martins, S.A., and Ferrari, M.F. (2010). Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neurosci.* *11*, 144.
- Chaves, R.S., Kazi, A.I., Silva, C.M., Almeida, M.F., Lima, R.S., Carrettiero, D.C., Demasi, M., and Ferrari, M.F.R. (2016). Presence of insoluble Tau following rotenone exposure ameliorates basic pathways associated with neurodegeneration. *IBRO Rep.* *1*, 32–45.
- Che, X., Tang, B., Wang, X., Chen, D., Yan, X., Jiang, H., Shen, L., Xu, Q., Wang, G., and Guo, J. (2013). The BAG2 protein stabilises PINK1 by decreasing its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *441*, 488–492.
- Chen, K.-H., Wu, R.-M., Lin, H.-I., Tai, C.-H., and Lin, C.-H. (2015). Mutational analysis of SYNJ1 gene (PARK20) in Parkinson's disease in a Taiwanese population. *Neurobiol. Aging* *36*, 2905.e7-8.
- Cheng, F., Vivacqua, G., and Yu, S. (2011). The role of α -synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J. Chem. Neuroanat.* *42*, 242–248.
- Ciaccioli, G., Martins, A., Rodrigues, C., Vieira, H., and Calado, P. (2013). A powerful yeast model to investigate the synergistic interaction of α -synuclein and tau in neurodegeneration. *PLoS One* *8*, e55848.

- Cuervo, A.M. (2004). Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305, 1292–1295.
- Dahlmann, B. (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem.* 8 Suppl 1, S3.
- Daulatzai, M.A. (2016). Dysfunctional Sensory Modalities, Locus Coeruleus, and Basal Forebrain: Early Determinants that Promote Neuropathogenesis of Cognitive and Memory Decline and Alzheimer's Disease. *Neurotox. Res.* 30, 295–337.
- De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., and Miller, C.C.J. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 151–173.
- Deng, H., Wang, P., and Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res. Rev.* 42, 72–85.
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 193–224.
- Donmez, G. (2013). Aging and Neurodegeneration. *J. Mol. Genet. Med.* 07.
- Durrenberger, P.F., Filiou, M.D., Moran, L.B., Michael, G.J., Novoselov, S., Cheetham, M.E., Clark, P., Pearce, R.K.B., and Graeber, M.B. (2009). DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly up-regulated in parkinsonian astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87, 238–245.
- Eenjes, E., Dragich, J.M., Kampinga, H.H., and Yamamoto, A. (2016). Distinguishing aggregate formation and aggregate clearance using cell-based assays. *J. Cell Sci.* 129, 1260–1270.
- Elkon, H., Don, J., Melamed, E., Ziv, I., Shirvan, A., and Offen, D. (2002). Mutant and wild-type α -synuclein interact with mitochondrial cytochrome C oxidase. *J. Mol. Neurosci.* 18, 229–238.
- Emanuele, M., and Chiergatti, E. (2015). Mechanisms of α -synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules* 5, 865–892.
- Emmanouilidou, E., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging* 31, 953–968.
- Eskelinen, E.-L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 664–673.
- Feleciano, D.R., Juenemann, K., Iburg, M., Brás, I.C., Holmberg, C.I., and Kirstein, J. (2019). Crosstalk Between Chaperone-Mediated Protein Disaggregation and Proteolytic Pathways in Aging and Disease. *Front. Aging Neurosci.* 11, 9.
- Frake, R.A., Ricketts, T., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2015). Autophagy and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 125, 65–74.
- Frost, B., Götz, J., and Feany, M.B. (2015). Connecting the dots between tau dysfunction and neurodegeneration. *Trends Cell Biol.* 25, 46–53.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164.

- Gamerding, M., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Clement, A.M., and Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* *12*, 149–156.
- Gao, X., Carroni, M., Nussbaum-Krammer, C., Mogk, A., Nillegoda, N.B., Szlachcic, A., Guilbride, D.L., Saibil, H.R., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2015). Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked α -Synuclein Amyloid Fibrils. *Mol. Cell* *59*, 781–793.
- García-Arencibia, M., Hochfeld, W.E., Toh, P.P.C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 691–698.
- Gillis, J., Schipper-Krom, S., Juenemann, K., Gruber, A., Coolen, S., van den Nieuwendijk, R., van Veen, H., Overkleeft, H., Goedhart, J., Kampinga, H.H., et al. (2013). The DNAJB6 and DNAJB8 protein chaperones prevent intracellular aggregation of polyglutamine peptides. *J. Biol. Chem.* *288*, 17225–17237.
- Gispert-Sanchez, S., and Auburger, G. (2006). The role of protein aggregates in neuronal pathology: guilty, innocent, or just trying to help? *J. Neural Transm. Suppl.* 111–117.
- Greene, M.K., Maskos, K., and Landry, S.J. (1998). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6108–6113.
- Gros, F., and Muller, S. (2014). Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease: Autophagy and lupus. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 4337–4359.
- Grudzien, A., Shaw, P., Weintraub, S., Bigio, E., Mash, D.C., and Mesulam, M.M. (2007). Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *28*, 327–335.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., and Davies, K.J.A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2519–2530.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 101–112.
- Hageman, J., van Waarde, M.A.W.H., Zylicz, A., Walerych, D., and Kampinga, H.H. (2011). The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochem. J.* *435*, 127–142.
- Hasegawa, K., and Kowa, H. (1997). Autosomal dominant familial Parkinson disease: older onset of age, and good response to levodopa therapy. *Eur. Neurol.* *38 Suppl 1*, 39–43.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.
- Höglinger, G.U., Lannuzel, A., Khondiker, M.E., Michel, P.P., Duyckaerts, C., Féger, J., Champy, P., Prigent, A., Medja, F., Lombes, A., et al. (2005). The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J. Neurochem.* *95*, 930–939.
- Hongo, H., Kihara, T., Kume, T., Izumi, Y., Niidome, T., Sugimoto, H., and Akaike, A. (2012). Glycogen synthase kinase-3 β activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *426*, 94–99.

- Jaeger, P.A., and Wyss-Coray, T. (2010). Beclin 1 complex in autophagy and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *67*, 1181–1184.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* *117*, 4837–4848.
- Ji, C.H., and Kwon, Y.T. (2017). Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol. Cells* *40*, 441–449.
- Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Lafer, E.M., and Sousa, R. (2007). Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol. Cell* *28*, 422–433.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1287–1295.
- Jung, H.-J., Kim, Y.-J., Eggert, S., Chung, K.C., Choi, K.S., and Park, S.A. (2013). Age-dependent increases in tau phosphorylation in the brains of type 2 diabetic rats correlate with a reduced expression of p62. *Exp. Neurol.* *248*, 441–450.
- Junn, E., and Mouradian, M.M. (2002). Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci. Lett.* *320*, 146–150.
- Kabbage, M., and Dickman, M.B. (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 1390–1402.
- Kakkar, V., Månsson, C., de Mattos, E.P., Bergink, S., van der Zwaag, M., van Waarde, M.A.W.H., Kloosterhuis, N.J., Melki, R., van Cruchten, R.T.P., Al-Karadaghi, S., et al. (2016). The S/T-Rich Motif in the DNAJB6 Chaperone Delays Polyglutamine Aggregation and the Onset of Disease in a Mouse Model. *Mol. Cell* *62*, 272–283.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 579–592.
- Kazemi-Esfarjani, P., and Benzer, S. (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* *287*, 1837–1840.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* *3*, 452–460.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J., and Miller, J.H. (2001). Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* *6*, 91–99.
- Klein, C., and Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a008888–a008888.
- Kocaturk, N.M., and Gozuacik, D. (2018). Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*, 128.
- Koo, E.H., Lansbury, P.T., and Kelly, J.W. (1999). Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9989–9990.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* *584*, 1393–1398.

- Liu, H., Dai, C., Fan, Y., Guo, B., Ren, K., Sun, T., and Wang, W. (2017). From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* *49*, 413–422.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Luo, Y., Zhou, J., Li, M.-X., Wu, P.-F., Hu, Z.-L., Ni, L., Jin, Y., Chen, J.-G., and Wang, F. (2015). Reversal of aging-related emotional memory deficits by norepinephrine via regulating the stability of surface AMPA receptors. *Aging Cell* *14*, 170–179.
- Maita, C., Maita, H., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (2013). Monomer DJ-1 and its N-terminal sequence are necessary for mitochondrial localization of DJ-1 mutants. *PloS One* *8*, e54087.
- Månsson, C., Kakkar, V., Monsellier, E., Sourigues, Y., Härmak, J., Kampinga, H.H., Melki, R., and Emanuelsson, C. (2014). DNAJB6 is a peptide-binding chaperone which can suppress amyloid fibrillation of polyglutamine peptides at substoichiometric molar ratios. *Cell Stress Chaperones* *19*, 227–239.
- Månsson, C., van Cruchten, R.T.P., Weininger, U., Yang, X., Cukalevski, R., Arosio, P., Dobson, C.M., Knowles, T., Akke, M., Linse, S., et al. (2018). Conserved S/T Residues of the Human Chaperone DNAJB6 Are Required for Effective Inhibition of A β 42 Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry* *57*, 4891–4902.
- Marmolino, D., Foerch, P., Atienzar, F.A., Staelens, L., Michel, A., and Scheller, D. (2016). Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* *71*, 92–101.
- Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., Yokochi, M., Kobayashi, T., Igarashi, S., Takano, H., et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 588–596.
- McLean, P.J., Kawamata, H., and Hyman, B.T. (2001). Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience* *104*, 901–912.
- Melo, T.Q., Copray, S.J.C.V.M., and Ferrari, M.F.R. (2018). Alpha-Synuclein Toxicity on Protein Quality Control, Mitochondria and Endoplasmic Reticulum. *Neurochem. Res.* *43*, 2212–2223.
- Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., et al. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* *93*, 1015–1034.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* *140*, 313–326.
- Mokhtar, S.H., Bakhuraysah, M.M., Cram, D.S., and Petratos, S. (2013). The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2013*, 910502.
- Nizynski, B., Dzwolak, W., and Nieznanski, K. (2017). Amyloidogenesis of Tau protein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *26*, 2126–2150.

- Oh, J.-H., Hyun, J.-Y., and Varshavsky, A. (2017). Control of Hsp90 chaperone and its clients by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E4370–E4379.
- Opazo, F., Krenz, A., Heermann, S., Schulz, J.B., and Falkenburger, B.H. (2008). Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *J. Neurochem.* *106*, 529–540.
- de Paula, C.A.D., Santiago, F.E., de Oliveira, A.S.A., Oliveira, F.A., Almeida, M.C., and Carrettiero, D.C. (2016). The Co-chaperone BAG2 Mediates Cold-Induced Accumulation of Phosphorylated Tau in SH-SY5Y Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 593–602.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Amsterdam; Boston: Elsevier).
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., et al. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2190–2199.
- Pilla, E., Schneider, K., and Bertolotti, A. (2017). Coping with Protein Quality Control Failure. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *33*, 439–465.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045–2047.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* *43*, 815–825.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., and Steeves, T.D.L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis: PD PREVALENCE. *Mov. Disord.* *29*, 1583–1590.
- Qin, L., Guo, J., Zheng, Q., and Zhang, H. (2016). BAG2 structure, function and involvement in disease. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *21*, 18.
- Qu, D., Hage, A., Don-Carolis, K., Huang, E., Joselin, A., Safarpour, F., Marcogliese, P.C., Rousseaux, M.W.C., Hewitt, S.J., Huang, T., et al. (2015). BAG2 Gene-mediated Regulation of PINK1 Protein Is Critical for Mitochondrial Translocation of PARKIN and Neuronal Survival. *J. Biol. Chem.* *290*, 30441–30452.
- Rommel Almeida Fechine, B. (2012). O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES QUE ACONTECEM COM O IDOSO COM O PASSAR DOS ANOS. *Inter Sci. Place* *1*, 106–132.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* *10*, S10–S17.
- Sánchez, I., Mahlke, C., and Yuan, J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* *421*, 373–379.
- Sánchez-Martín, P., and Komatsu, M. (2018). p62/SQSTM1 - steering the cell through health and disease. *J. Cell Sci.* *131*.

- Sariyer, I.K., Merabova, N., Patel, P.K., Knezevic, T., Rosati, A., Turco, M.C., and Khalili, K. (2012). Bag3-Induced Autophagy Is Associated with Degradation of JCV Oncoprotein, T-Ag. *PLoS ONE* 7, e45000.
- Sarparanta, J., Jonson, P.H., Golzio, C., Sandell, S., Luque, H., Screen, M., McDonald, K., Stajich, J.M., Mahjneh, I., Vihola, A., et al. (2012). Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 44, 450–455, S1-2.
- Schönbühler, B., Schmitt, V., Huesmann, H., Kern, A., Gamberdinger, M., and Behl, C. (2016). BAG2 Interferes with CHIP-Mediated Ubiquitination of HSP72. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Sheehan, J.P., Palmer, P.E., Helm, G.A., and Tuttle, J.B. (1997). MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: an electron microscope study. *J. Neurosci. Res.* 48, 226–237.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R., and Greenamyre, J.T. (2002). An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7006–7015.
- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Neurol.* 179, 9–16.
- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., and Elazar, Z. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* 12, 226.
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., et al. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6, 6.
- Small, S.A., and Duff, K. (2008). Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60, 534–542.
- Song, P., Li, S., Wu, H., Gao, R., Rao, G., Wang, D., Chen, Z., Ma, B., Wang, H., Sui, N., et al. (2016). Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Protein Cell* 7, 114–129.
- Song, Z., Xu, S., Song, B., and Zhang, Q. (2015). Bcl-2-associated athanogene 2 prevents the neurotoxicity of MPP+ via interaction with DJ-1. *J. Mol. Neurosci.* MN 55, 798–802.
- Squier, T.C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* 36, 1539–1550.
- Suh, W.C., Burkholder, W.F., Lu, C.Z., Zhao, X., Gottesman, M.E., and Gross, C.A. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15223–15228.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902–906.

Tanji, K., Miki, Y., Ozaki, T., Maruyama, A., Yoshida, H., Mimura, J., Matsumiya, T., Mori, F., Imaizumi, T., Itoh, K., et al. (2014). Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 50.

Trześniewska, K., Brzyska, M., and Elbaum, D. (2004). Neurodegenerative aspects of protein aggregation. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 64, 41–52.

Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., and Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354, 1036–1041.

Vilchez, D., Saez, I., and Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat. Commun.* 5, 5659.

Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40, 7812–7819.

Wang, Y., and Mandelkow, E. (2012). Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 644–652.

Wang, M.-X., Cheng, X.-Y., Jin, M., Cao, Y.-L., Yang, Y.-P., Wang, J.-D., Li, Q., Wang, F., Hu, L.-F., and Liu, C.-F. (2015). TNF compromises lysosome acidification and reduces α -synuclein degradation via autophagy in dopaminergic cells. *Exp. Neurol.* 271, 112–121.

Ward, W.F. (2002). Protein degradation in the aging organism. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 29, 35–42.

Weinshenker, D. (2008). Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 342–345.

Wu, F., Xu, H.-D., Guan, J.-J., Hou, Y.-S., Gu, J.-H., Zhen, X.-C., and Qin, Z.-H. (2015). Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience* 284, 900–911.

Xu, Z., Page, R.C., Gomes, M.M., Kohli, E., Nix, J.C., Herr, A.B., Patterson, C., and Misra, S. (2008). Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the Hsp70 cochaperone Bag2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1309–1317.

Yue, Z. (2007). Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy* 3, 139–141.

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., et al. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601–607.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo da autofagia como mecanismo para o desencadeamento de doenças neurodegenerativas**”, registrada com o nº 271/2016 (Proc. 16.1.607.41.7), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e com a participação dos colaboradores Raquel de Souza Lima (IB/USP), Karla Pacheco Melo (IB/USP), Thais Alexandre Falkembach Andreis (IB/USP), Rafaela Regina Cardoso (IB/USP), Nathan Cogliatti Ribeiro de Lima (IB/USP), Barbara Santos de Oliveira (IB/USP) e Natália Fagundes Borges Teruel (IB/USP), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

Vigência da autorização: 13/12/2016 a 12/12/2019

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécies/linhagens: 1) camundongos transgênicos (*Mus musculus*)/B6SJL1-tg (SOD1*G93A)1Gur/J – SOD1, B6SJL1-tg (SOD1)2Gur/J – SOD1, B6 Eic3Sn-Rb(12.Ts1716Dn)2Cje/CjeDnJ-Down; 2) camundongos heterogênicos/controle do SOD1 e controle do Down; 3) ratos isogênicos (*Rattus norvegicus*)/Lewis.

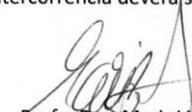
Nº de animais: 1.295

Peso/Idade: 2 meses e 1-2 dias/5g, 10, 20g e 200g

Sexo: (M+F)

Origem: Biotério do Laboratório de Biologia Celular da Neurodegeneração do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

OBS.: Qualquer alteração e/ou intercorrência deverá ser comunicada a CEUA-IB.



Prof. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

BIOGRAFIA

Raquel de Souza Lima

Nome usado em citações: Lima, RS.; de Souza Lima, R.; Raquel S. Lima

Filiação: Sônia Maria de Souza Lima e Israel Correia de Lima

Nascimento: 10/09/1990 – São Paulo, SP- Brasil

Email: raquel.lima@usp.br

Formação acadêmica/titulação:

2016-2019

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Genética) (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Efeito das chaperonas BAG2 e DNAJB6 na degradação proteica em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. Orientadora: Profa Dra Merari F.R. Ferrari.

Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP

Palavras-chave: Neurodegeneração. Alzheimer. Parkinson. Autofagia. Mitofagia. Rotenona. Chaperonas. BAG2. DNAJB6. α -sinucleína.

Grande área: Ciências Biológicas

Março 2018/ agosto 2018

Estágio Internacional - University Medical Center Groningen – UMCG – Groningen – Holanda. Departamento de Biologia Celular.

Título: Maquinaria de chaperonas para combater a doença de Parkinson.

Supervisor: Prof. Dr. Harm H. Kampinga

Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP. Bolsa BEPE.

2011- 2015

Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo - USP- São Paulo- Brasil

Título: Análise da autofagia durante a agregação proteica associada com a Doença de Alzheimer. Orientadora: Profa Dra Merari F.R. Ferrari.

Formação complementar:

2017

Monitora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da disciplina de graduação BIO-0300- Abordagens multidisciplinares em Genética. Instituto de Biosciências – Universidade de São Paulo USP- São Paulo, Brasil.

Publicações:

1. Olino, João Vitor; Lubiana Alves, Tiago; Ferreira-Camargo, Livia; Croce, Miguel; Tanaka, Allan; Buson, Felipe; Ribeiro, Pedro; Campos-Salazar, Antony; Antonio, Eduardo; Maziel, André; Siratuti,

Viviane; Costa, Claudia; Wlodarczyk, Samarina; **de Souza Lima, Raquel**; Mello, Fabio; Mayfield, Stephen; Carvalho, João. **Chimeric spider silk production in microalgae: a modular bionanomaterial**. Research Ideas and Outcomes, v. 2, p. e9342, 2016.

2. Rodrigo S. Chaves, Amajad I. Kazi, Carrolliny M. Silva, Michael F. Almeida, **Raquel S. Lima**, Daniel C. Carrettiero, Marilene Demasi, Merari F.R. Ferrari. **Presence of insoluble Tau following rotenone exposure ameliorates basic pathways associated with neurodegeneration**. IBRO Reports - Volume 1, December 2016, Pages 32–45.

Apresentações em congressos:

1. **LIMA, RS.**; CHAVES.RS; FERRARI, MFR. 2016. **Analysis of autophagic flux over protein aggregates typical of neurodegenerative diseases in hippocampal culture of neonatal rats exposed to rotenone**. Evento: Prêmio Oswald Frota Pessoa – Incentivo para a pesquisa genética; 2016; (Simpósio); Apresentação de pôster; São Paulo (SP)- Brasil
2. **LIMA, RS.**; CHAVES.RS; FERRARI, MFR. 2017. **Analysis of autophagic flux in hippocampus cell culture exposed to rotenone**. Simpósio HUG-CELL CEPID- Comitê Internacional, 2017. Apresentação de pôster. São Paulo (SP)- Brasil
3. **LIMA, RS**; SILVA, CM; FERRARI. 2017. **Analysis of autophagy, cochaperone BAG-2, proteasome activity and physical exercise during early neurodegeneration**. Evento: I WORKSHOP –Molecular Mechanisms of Autophagy and their application to diseases; Apresentação de pôster; São Paulo (SP) Brasil.
4. **LIMA, RS**; SILVA, CM; FERRARI. 2017. **Effects of physical exercise upon proteostasis during early neurodegeneration**. Evento: XXXII Reunião Anual da FeSBE; Campos do Jordão (SP) Brasil. Apresentação de pôster.
5. **Lima, RS**; de Mattos, EP; de Mello, TQ; Bergink, S; Kampinga, HH; Ferrari, MRF. 2019. **DNAJB6b efficiently reduces the protein expression levels of α -synuclein with a N-degron signal**. Evento: Workshop New Insights of Stress Proteins in Health and Diseases: Chaperones and Beyond; ICB- USP. Apresentação de palestra.

Prêmios:

2013

Primeiro lugar: Olimpíadas do Conhecimento – USP- São Paulo, Brasil

Projeto: Uma abordagem lúdica como estratégia diferenciada para o ensino de Biologia molecular. Orientadora: Maria Elice de Brzezinski Prestes

2013

Medalha de prata - Internacional Genetically Engineered machine Competition – iGEM, 2013 – Santiago, Chile.

Projeto: DETECTHOL

2016

Medalha de prata - Internacional Genetically Engineered machine Competition – iGEM, 2016 – MIT, EUA.

Projeto: AlgAranha

2016

VII Prêmio Oswaldo Frota Pessoa – Incentivo para à pesquisa genética – IB-USP – Mênção Honrosa.

2019

Workshop New Insights of Stress Proteins in Health and Diseases: Chaperones and Beyond; ICB-USP – Mênção Honrosa, segundo lugar.

ARTIGOS EM ELABORAÇÃO

Artigo intitulado: “**The co-chaperone BAG2 overexpression increases p62/SQSTM1 in hippocampus and locus coeruleus cells**”. Com autoria de: Raquel de S. Lima; Daniel Carneiro Carrettiero e Merari F. R. Ferrari.

Artigo intitulado: “**BAG2 role in neurodegenerative disorders: an overview**”. Com autoria de: Raquel de S. Lima; Thaiany Q. de Melo e Merari F. R. Ferrari.