RODRIGO DOS SANTOS CHAVES

**Influência do cálcio e das proteínas Miro na mobilidade
mitocondrial anteriormente e durante a agregação de proteínas
envolvidas em neurodegeneração.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências, Programa de
Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Prof^a Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari.

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

São Paulo

2015

RODRIGO DOS SANTOS CHAVES

**Influência do cálcio e das proteínas Miro na mobilidade
mitocondrial anteriormente e durante a agregação de proteínas
envolvidas em neurodegeneração.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutor em Ciências, Programa de
Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Prof^a Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari.

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

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autoriza pelo autor

Chaves, Rodrigo dos Santos

Influência do cálcio e das proteínas Miro na modalidade mitocondrial
anteriormente e durante a agregação de proteínas envolvidas em neurodegeneração /
Rodrigo dos Santos Chaves. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Merari de Fatima Ramires Ferrari.

Coorientador: Daniel Carneiro Carrettiero.

Descritores: 1.Regeneração nervosa 2.Mitocôndrias 3.Proteínas rho de
ligação ao GTP 4.Cálcio 5.Transporte proteico 6.Agregação patológica de
proteínas 7.Doença de Alzheimer 8.Doença de Parkinson 9.Proteína Miro-1
humana

USP/FM/DBD-276/15

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente ao
Senhor todo poderoso criador do céu e da
terra, à Senhora minha Mãe, ao Senhor meu
Pai, ao meu jovem Irmão, ao meu Amor e
aos meus familiares, especialmente ao meu
Padrinho e minha falecida vó Joaquina, os
quais me auxiliaram e ainda me auxiliam
andar sobre o vale das sombras sempre em
direção a luz....*

Um hino de importância ímpar na minha vida:

Jah,

Para onde ele me guia, eu vou.

Para onde ele me guia, eu vou.

Eu vou!

Meu pai é meu Rei e sempre me guiará.

Meu pai é meu Rei sempre me guiará.

Meu senhor é meu pastor e nada.

E nada me faltará.

Nada me faltará, não faltará!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, inicialmente pela “mente aberta” e seriedade que permitiram meu ingresso nesse cenário de pesquisa acadêmica. Bem como pela confiança, paciência, competência e dedicação, virtudes as quais me possibilitaram realizar este trabalho, deixo o meu sincero muito obrigado! E digo que estou feliz em fazer parte da sua F1!

Aos Professores: das Escolas: EMEF Maria Helena Faria Lima, E.E Doutor Justino Cardoso e EMEFM Professor Derville Allegretti, da Universidade Metodista de São Paulo, especialmente Nicolás Antonio Douglas Gomez, Rosemeire Aparecida Bom Personi, Daniela Silvestre Alves, Liliana Rúbia de Ascensão Medeiros, Candida Conceição de Jesus Vieira e Antonio Degas Mendes Neto Storelli e Professores encontrados durante a realização dessa tese especialmente Daniel Carneiro Carrettiero, da UFABC, Marilene Demasi, do Instituto Butantan e muitos outros os quais atuaram ativamente na minha formação Acadêmica, ficam aqui meus agradecimentos....

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

Aos especialistas e técnicos os quais estive em contato durante a realização deste projeto: Waldir Caldeira, Mario Costa Cruz, Thiago Alegria, Adrian Hand e tantos outros, muito obrigado.

Aos colegas de trabalho (USP, UFABC e UCSD) Karen Lisneiva, Thaiany Quevedo, Michael Fernandes, Nicole Caroline, Débora Mesquita, Fernando Santiago, Amajad Iqbal e tantos outros pelo ambiente descontraído, pela ajuda empreendida na realização dos experimentos, pelas conversas, colaborações,

desentendimentos, bagunças, festas e principalmente pelas histórias as quais eu irei recordar e contar em algum momento da minha vida, valeu mesmo....

Regarding my internship in United State at University of California San Diego, I would like to acknowledge:

Larry Goldstein for give me the opportunity of join his lab and work with his amazing team, also for the time spent discussing my data and for always be friendly and patient with my pronunciation issues.

Chun H.C, my housemate and friend, for help me to deal with several issues when I was in San Diego, and for make my time in his house a good time.

Rik van der Kant and his wife Dalila for the amazing friendship built during this one year abroad that helped me cure my homesickness.

The Goldstein lab girls, an amazing group of ladies (Post doc, PhDs, MDs, and Lab Managers) who helped me a lot during my time in the Lab, plus John Steele a very good friend, who also helped me a lot.

Alisson Muotri and his Brazilian team, especially Helen Cristiana, Cassiano Carromeu and Fabiele Russo for help me get used to San Diego and for allow me speak a little bit of Portuguese in the lab.

A minha companheira e grande amiga Ádara Dandara Domênyka Oliveira Marcelino, fica aqui o meu muito obrigado, pela compreensão, amor, ajuda e capacidade de me aturar durante todo o período de realização deste projeto.

Aos irmãos de militância Leandro Rodrigues, Samuel Pedro e Zenildo Conceição os quais sempre abastecerão meus pensamentos com ideias e

argumentos, gerando sempre calorosos debates sobre novas perspectivas as quais me ajudarão a seguir em frente. Fica aqui meu muito obrigado.

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.

E aos que não acreditavam na possibilidade de realização deste projeto deixo meus agradecimentos pelos estímulos frequentemente fornecidos.

EPÍGRAFE

*“Nessa luta todos são bem vindos, porém, na
linha de frente só estaremos nós mesmos”*
Steve BantuBiko

NORMAS

Este texto está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Apresentadas de acordo com as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Estrutural textual: Desenvolvida de acordo com o disposto em:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

APOIO FINANCEIRO

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

Processos: 2011/00478-2 (bolsa de Doutorado Direto), 2013/18028-9 (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE)), 2008\04480-9 (auxílio à pesquisa regular - Profª Merari F.R. Ferrari), 2011/064347 (auxílio à pesquisa regular - Profª Merari F.R. Ferrari) e 2012/15495-2 (auxílio à pesquisa regular - Profª Merari F.R. Ferrari).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Processo: 471779/2010-5 e 471999/2013-0 (Editais Universais – responsável: Profª Merari F.R. Ferrari).

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iv
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPIÍGRAFE	ix
NORMAS.....	x
APOIO FINANCEIRO.....	xi
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xix
RESUMO	xxv
ABSTRACT.....	xxvi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Envelhecimento	1
1.2 Doenças neurodegenerativas e agregação proteica	6
1.3 Transporte mitocondrial e doenças neurodegenerativas.....	11
1.4 Alterações das concentrações citoplasmáticos de Ca ²⁺ e doenças neurodegenerativas	16
2.OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO II – MODELO DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADO A AGREGAÇÃO PROTEICA EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS DE RATOS	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Animais	26
2.2 Cultura de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte	26
2.3 Caracterização das culturas de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte.....	28
2.4 Exposição das células em cultura à rotenona	31
2.5 Avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros antes da formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração em cultura de células do hipocampo	32

2.5.1 Análise do percentual de morte celular após exposição a baixas concentrações de rotenona	32
2.5.1.1 Corante Azul de tripan	32
2.5.1.2 Redução do MTT.....	33
2.5.2 Análise da influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Tau hiperfosforilada e sua agregação	33
2.5.2.1 Análise dos níveis de Tau total e Tau hiperfosforilada	33
2.5.2.2 Análise da agregação de Tau hiperfosforilada por imunofluorescência	35
2.5.2.3 Análise da agregação de Tau total por Western Blot	36
2.5.3. Análise da atividade proteolítica proteassomal.....	37
2.5.4. Análise do fluxo autofágico	38
2.5.5. Análise da influência da exposição à rotenona sobre a homeostase Redox	40
2.5.5.1 Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio.....	40
2.5.5.2 Análise dos níveis totais de proteínas carboniladas	41
2.5.5.3 Análise dos níveis de peróxido de hidrogênio	43
2.6 Análise da mobilidade mitocondrial em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados	44
2.6.1 Análise da mobilidade mitocondrial.....	44
2.6.2 Validação do método de análise da mobilidade mitocondrial	46
2.7 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos	47
2.7.1 Incubação das culturas de células com Fura-2AM e análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}	47
2.7.2 Validação do método de análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}	49
2.7.3 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após exposição momentânea à rotenona	49
2.7.4 Análise da possibilidade da exposição à rotenona potencializar o influxo induzido de Ca^{2+}	50
2.8 Análise da relação entre a proteína Miro e alterações do tráfego mitocondrial	51
2.8.1 Construção da proteína Miro mutante.....	51
2.8.2 Preparação dos clones e transfecção.....	52

2.8.3 Ensaio de co-localização das proteínas Miro 1 clonadas com mitocôndrias	55
2.8.4 Análise da influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Miro	56
2.9 Análise dos resultados	56
3. RESULTADOS	58
3.1 Caracterização das culturas de células	58
3.2 Exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros celulares que antecedem a formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração em cultura de células do hipocampo	60
3.2.1 Análise do percentual de morte celular após exposição a baixas concentrações de rotenona	60
3.2.2 Influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Tau hiperfosforilada e sua agregação	61
3.2.3 Atividade proteolítica proteassomal encontra-se diminuída antes e durante a agregação proteica.....	67
3.2.4. O fluxo autofágico diminui nos momentos que antecedem a agregação proteica ...	68
3.2.5. A homeostase Redox está prejudicada antes da formação de agregados proteicos	69
3.3 Validação dos métodos de análise da mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca²⁺	76
3.4 Análise da mobilidade mitocondrial em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados	79
3.4.1 Culturas de células do hipocampo	79
3.4.2 Culturas de células do locus coeruleus	85
3.4.3 Culturas de células da substância negra	89
3.5 Análise da relação entre a proteína Miro e alterações do tráfego mitocondrial	99
3.5.1 Ensaio de co-localização das proteínas Miro 1 clonadas com mitocôndrias em culturas de células do hipocampo	99
3.5.2 Diminuição dos níveis de Miro antes e durante a agregação proteica	99
4. DISCUSSÃO.....	102
4.1 Avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros celulares anteriores à formação dos agregados proteicos.....	102

4.2 Análise da mobilidade mitocondrial e dos níveis de Ca^{2+} em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos	111
5. CONCLUSÕES.....	122
<i>CAPÍTULO III – MUTAÇÃO ΔE9 EM PRESENILINA 1 COMO MODELO DE NEURODEGENERAÇÃO NÃO ASSOCIADO A AGREGAÇÃO PROTEICA EM CÉLULAS HUMANAS ISOGÊNICAS.....</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	124
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	130
2.1 Comitê de Ética.....	130
2.2 Cultura de células iPSC.....	130
2.3 Geração de células iPSC isogênicas	130
2.4 Diferenciação, purificação e cultura de NPCs	132
2.5 Diferenciação, purificação e cultura de neurônios.....	132
2.6 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em NPC e neurônios.....	133
2.7 Análise dos níveis de Ca^{2+} no RE de neurônios.....	135
2.8 Análise do transporte, potencial de membrana e densidade mitocondrial em neurônios	135
2.9 Análise dos níveis de Miro em neurônios.....	137
2.9.1 Análise dos níveis de Miro por Western blot.....	137
2.9.2 Análise dos níveis de Miro por Imunocitoquímica.....	137
2.10 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão em neurônios	138
2.11 Análise dos resultados	139
3. RESULTADOS.....	140
3.1 Caracterização dos neurônios.....	140
3.2 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em NPC e neurônios.....	142
3.3 Análise dos níveis de Ca^{2+} no RE de neurônios.....	145
3.4 Análise do transporte mitocondrial em neurônios	145
3.5 Análise dos níveis de Miro	150
4. DISCUSSÃO.....	152
5. CONCLUSÃO	157
<i>CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES FINAIS.....</i>	<i>158</i>
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....</i>	<i>159</i>

ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	183
Artigos científicos publicados	184
Artigos científicos em preparação.....	185

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biomarcadores celulares e teciduais do envelhecimento.

Tabela 2. Caracterização das culturas de células do locus coeruleus, substância negra e hipocampo.

Tabela 3. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

Tabela 4. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

Tabela 5. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

Tabela 6. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

Tabela 7. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

Tabela 8. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

Tabela 9. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

Tabela 10. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

Tabela 11. Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do modelo de transporte e ancoramento mitocondrial.

Figura 2. Ilustração dos mecanismos de inibição do transporte de mitocôndria através da ligação do Ca^{2+} aos domínios EF hands da proteína Miro.

Figura 3. Fotomicrografias digitais de cultura de células do hipocampo (HP) e locus coeruleus (LC) expostas a 0,5, 1 e 10nM de rotenona em durante 48 horas, marcadas com anticorpos anti Tau hiperfosforilada (Tau p), α -sinucleína e A β .

Figura 4. 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.

Figura 5. Imagens representativas de secções do encéfalo de rato contendo as regiões dissecadas para a cultura de células.

Figura 6. Ilustração dos alinhamentos das sequências de aminoácidos dos domínios EF hand das proteínas Miro 1 e 2, selvagens e mutantes, de humanos e ratos, com os aminoácidos dos domínios EF hands e as mutações destacados.

Figura 7. Fotomicrografias ilustrando a imunoreatividade a MAP2 em células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra, e a TH em células do locus coeruleus e substância negra.

Figura 8. Fotomicrografias ilustrando culturas de células do hipocampo exposta a DMSO ou 0,3nM de rotenona durante 48 horas e posteriormente coradas com azul de tripan e os níveis de redução de MTT.

Figura 9. Níveis de Tau hiperfosforilada em relação a beta-actina ou a Tau total em culturas de células do hipocampo expostas a DMSO, 0,3 ou 0,5nM de rotenona durante 48 horas.

Figura 10. Fotomicrografias ilustrando células do hipocampo expostas a 0,3, 0,5 e 1nM de rotenona ou DMSO durante 48 horas marcadas com anticorpos anti-Tau hiperfosforilada e anti-MAP2 e com o núcleo marcado com DAPI.

Figura 11. Níveis de Tau total na fração proteica insolúvel em culturas de células do hipocampo exposta à rotenona em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Figura 12. Níveis de Tau hiperfosforilada em relação a beta-actina e a Tau total em culturas de células do hipocampo expostas a DMSO ou 0,3nM de rotenona durante 72 horas.

Figura 13. Fotomicrografias ilustrando células do hipocampo expostas a 0,3nM de rotenona ou DMSO durante 72 horas marcadas com anticorpos anti-Tau hiperfosforilada e anti-MAP2 e com o núcleo marcado com DAPI.

Figura 14. Análise da atividade quimiotripsínica proteossomal em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas.

Figura 15. Análise do fluxo autofágico utilizando LC3-EGFP-mCherry em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas.

Figura 16. Análise dos níveis de ROS utilizando CM-H₂DCFDA em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas.

Figura 17. Níveis de proteínas carboniladas em culturas de células do hipocampo exposta à 0,3, 0,5nM de rotenona e DMSO durante 48h.

Figura 18. Níveis de peróxido de hidrogênio em culturas de células hipocampo exposta à 0,3, 0,5nM de rotenona e DMSO durante 48h.

Figura 19. Níveis de ROS utilizando CM-H₂DCFDA em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3nM de rotenona ou DMSO por 48 e 72 horas.

Figura 20. Resumo das alterações nos níveis de Tau hiperfosforilação, H₂O₂, carbonilação de proteínas, atividade proteassomal e do fluxo autofágico, observadas em culturas de células do hipocampo após a exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas.

Figura 21. Validação da técnica de análise da mobilidade mitocondrial.

Figura 22. Validação da técnica de análise dos níveis citoplasmático de Ca²⁺.

Figura 23. Monitoramento da intensidade da fluorescência emitida por Fluo 4 em células de células do hipocampo controles exposta a 1nM e 1μM de rotenona.

Figura 24. Análise da mobilidade mitocondrial e dos níveis citoplasmático de Ca²⁺ em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona durante 48 horas.

Figura 25. Análise da mobilidade mitocondrial e dos níveis citoplasmático de Ca²⁺ de células do hipocampo expostas à rotenona durante 24, 48 e 72 horas.

Figura 26. Esquema exibindo o resumo dos resultados obtido em culturas de células do hipocampo antes e durante a agregação proteica.

Figura 27. Análise da mobilidade mitocondrial e dos níveis citoplasmático de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona durante 48 horas.

Figura 28. Mobilidade mitocondrial e dos níveis citoplasmático de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona durante 24, 48 e 72 horas.

Figura 29. Esquema exibindo o resumo dos resultados obtido em culturas de células do locus coeruleus antes e durante a agregação proteica.

Figura 30. Mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmático de Ca^{2+} em culturas de células da substância negra expostas à rotenona durante 48 horas.

Figura 31. Mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da substância negra expostas à rotenona durante 24, 48 e 72 horas.

Figura 32. Esquema exibindo o resumo dos resultados obtidos em culturas de células da substância negra antes e durante a agregação proteica.

Figura 33. Co-transfecção de Miro selvagem e mutante com DsRed-mito em culturas de células do hipocampo.

Figura 34. Níveis de Miro em culturas de células do hipocampo expostas a DMSO, 0,3 ou 0,5nM de rotenona durante 48 horas.

Figura 35. Esquema demonstrando as alterações identificadas, nos níveis de fosforilação de Tau, H_2O_2 , carbonilação de proteínas, atividade proteassomal e

do fluxo autofágico, observadas em culturas de células do hipocampo antes e durante a formação de agregados proteicos.

Figura 36. Modelo ilustrando os possíveis efeitos dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} sobre o transporte mitocondrial em células controles (WT) e em células expressando PS1 Δ E9.

Figura 37. Ilustração do protocolo experimental utilizado para obtenção de neurônios isogênicos humanos PS1 Δ E9 mutantes.

Figura 38. Caracterização dos neurônios isogênicos purificados quanto à expressão de MAP2 e variações espontâneas nos níveis de Ca^{2+} .

Figura 39. Eletromicrografias ilustrando os neurônios isogênicos purificados.

Figura 40. Quantificação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em células precursoras neurais derivadas de iPSC.

Figura 41. Quantificação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em neurônios humanos derivados de iPSC.

Figura 42. Quantificação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em neurônios utilizando as técnicas ratiométricas Fluo4/FuraRed e GCaMP/mCherry.

Figura 43. Quantificação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após a depleção dos níveis de Ca^{2+} do RE utilizando Ionomicina.

Figura 44. Quantificação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após a depleção dos níveis de Ca^{2+} do RE utilizando Thapsigargina.

Figura 45. Potencial de membrana, quantidade e morfologia das mitocôndrias de neurônios humanos derivados de iPSCs selvagens e com a mutação PS1 Δ E9.

Figura 46. Mobilidade mitocondrial em neurônios humanos derivados de iPSCs selvagens e com a mutação PS1 Δ E9 em homozigose e heterozigose.

Figura 47. Níveis de Miro em neurônios humanos derivados de iPSCs selvagens e com a mutação PS1 Δ E9.

Figura 48. Esquema exibindo o resumo dos resultados obtidos em neurônios homozigotos para a mutação PS1 Δ E9 em relação a neurônios com a forma constitutiva de PS1.

RESUMO

Chaves RS. *Influência do cálcio e das proteínas Miro na mobilidade mitocondrial anteriormente e durante a agregação de proteínas envolvidas em neurodegeneração* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A inibição do transporte axonal é um evento que ocorre prematuramente no curso das doenças neurodegenerativas, inclusive antes da formação dos agregados proteicos, os quais estariam envolvidos no processo fisiopatológico das doenças neurodegenerativas. No presente estudo avaliou-se a hipótese de que alterações no transporte de mitocôndrias ocorrem antes da formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração, devido a desregulação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e o envolvimento da modulação do transporte mitocondrial provido pela proteína Miro neste cenário. Utilizaram-se dois modelos experimentais: o primeiro utilizando a exposição à rotenona em culturas primárias de neurônios do locus coeruleus, hipocampo e substância negra de ratos, e o segundo utilizando neurônios derivados de células tronco de pluripotência induzida (iPSC), isogênicas humanas contendo mutações que levam à deleção do exon 9 da (ΔE9) no gene da presenilina 1 (PS1), o qual apresenta aumento da síntese do peptídeo beta-amiloide com 42 aminoácidos ($\text{A}\beta_{42}$), sem a formação de agregados proteicos. Os resultados mostram disfunções nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em ambos modelos. A mobilidade mitocondrial alterou-se no hipocampo, locus coeruleus e substância negra após exposição à rotenona. No entanto, a direção das alterações observadas não se correlacionaram com os níveis de Ca^{2+} , de acordo com o já descrito na literatura. Não houve alteração da mobilidade mitocondrial, nem nos níveis de Miro1, nos neurônios derivados de iPSC. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que alterações nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} ocorrem antes e durante a formação de agregados proteicos, o que pode ser importante para a etiologia de doenças neurodegenerativas. Foi também demonstrado que mudanças na mobilidade mitocondrial, acompanhadas por alterações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , em níveis fisiológicos, ocorrem de forma independente dos níveis da proteína Miro1 em culturas de células. Porém são necessários novos estudos a fim de relacionar alterações na mobilidade mitocondrial e a indução da neurodegeneração.

Descritores: 1.Regeneração nervosa 2.Mitocôndrias 3.Proteínas rho de ligação ao GTP 4.Cálcio 5.Transporte proteico 6.Agregação patológica de proteínas 7.Doença de Alzheimer 8.Doença de Parkinson 9.Proteína Miro-1 humana

ABSTRACT

Chaves RS. Influence of calcium and Miro proteins on mitochondrial mobility before and during protein aggregation involved in neurodegeneration [thesis]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

The axonal transport impairment occurs early in neurodegenerative diseases, even before the formation of protein aggregates, which are related with the neuropathophysiology mechanism in neurodegenerative diseases. In this study, we evaluate the hypothesis that disruptions in mitochondria transport occurs before the formation of protein aggregate related with neurodegeneration, triggered by dysregulations in cytosolic Ca^{2+} levels and the involvement of Miro Ca^{2+} dependent mechanism of mitochondria trafficking modulation. We employed two experimental models, first using rotenone exposure in primary neuronal cell cultures from locus coeruleus, substantia nigra and hippocampus of newborn rats. Second, using isogenic human neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs), harboring mutations, those induce exon 9 deletion (ΔE9) in Presenilin 1 (PS1) gene, and showing increased synthesis of amyloid beta peptide with 42 amino acids ($\text{A}\beta_{42}$) without the formation of protein aggregates. We found abnormalities in cytosolic Ca^{2+} levels in both experimental models, mitochondria trafficking were altered in hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus. However, the pattern of mitochondria trafficking alterations did not correlate with cytosolic Ca^{2+} levels, accordingly with the data that was already published. We did not find alterations in mitochondria trafficking or Miro1 levels in neurons derived from iPSC. In conclusion, our finds demonstrated aberrant cytosolic Ca^{2+} levels before and during protein aggregation, which may be important for the etiology of neurodegenerative diseases. In addition, this dysfunction in mitochondria trafficking happens after changes in cytosolic Ca^{2+} levels, in physiological range, independent of Miro1 levels in primary neurons cell cultures. Therefore, new studies need to be done, aiming to elucidate the relation between mitochondria trafficking dysfunctions and the induction of neurodegeneration process.

Descriptors: 1. Nerve regeneration 2. Mitochondrias 3. rho GTP-binding proteins 4. Calcium 5. Protein transport 6. Protein aggregation, pathological 7. Alzheimer disease 8. Parkinson disease 9. Miro-1 protein, human

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Envelhecimento

Estima-se que a expectativa de vida manteve-se entre 20 a 25 anos de idade durante 99,9% do tempo evolutivo da espécie *Homo sapiens*, não havendo evidência fóssil de espécimes com idade superior a 50 anos no período pré-histórico (Hayflick, 2007).

O período de 20 a 25 anos de idade nos humanos refere-se ao período de maturidade reprodutiva, logo postula-se que durante a maior parte da história evolutiva somente 50% dos indivíduos existentes alcançavam a maturidade reprodutiva e número ínfimo destes transpassava este período.

No entanto, a elevação gradativa do índice de expectativa de vida que aconteceu nos últimos séculos, devido principalmente ao desenvolvimento científico e tecnológico alcançado, permitiu que a maioria dos indivíduos transpassassem o período relativo a maturidade reprodutiva e fossem então expostos ao período fisiológico denominado envelhecimento (Costa, 2005; Christensen, Doblhammer *et al.*, 2009; Kevin Kinsella, 2009; World Health Organization, 2015).

Consequentemente o envelhecimento como período fisiológico experienciado pela maioria dos indivíduos ocorreu tardiamente na história evolutiva dos humanos. Hayflick (2007) ilustrou esse fenômeno ao afirmar que se história evolutiva dos humanos fosse contida em um dia (24 horas) o envelhecimento somente passaria a existir a poucos minutos antes da meia-noite.

O envelhecimento pode ser definido como processo de deterioração progressiva e inevitável das funções fisiológicas dependente do tempo, que induz o aumento da vulnerabilidade a doenças e diminuição da fecundidade (Rose, 1991; Daniel e Thomas, 2011). Evans e Rosenberg (1991) recomendaram como possíveis biomarcadores, ao nível celular e tecidual, do envelhecimento as alterações listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Biomarcadores celulares e teciduais do envelhecimento

<i>Perda de força muscular</i>
<i>Redução da flexibilidade</i>
<i>Diminuição da capacidade cardiovascular</i>
<i>Aumento do percentual de gordura corporal</i>
<i>Sarcopenia</i>
<i>Redução do clearance renal</i>
<i>Redução da resposta imunológica</i>
<i>Aumento do limiar auditivo</i>
<i>Redução da sensação de vibração</i>
<i>Comprometimento visual</i>
<i>Redução da acuidade olfativa e gustativa</i>
<i>Aumento da síntese de autoanticorpos</i>
<i>Alteração dos níveis hormonais</i>

FONTE: Adaptado de Evans e Rosenberg (1991)

A nível celular e molecular López-Otín e colaboradores (2013) suplementam a lista proposta por Evans e Rosenberg (1991) indicando o aumento da instabilidade genômica, o encurtamento dos telômeros, alterações epigénéticas, alteração nos mecanismos de síntese e degradação de proteínas, dessensibilização das vias de sinalização dependente de nutriente, disfunções mitocondriais, senescência celular, declínio do potencial regenerativo celular e

desregulação dos mecanismo de comunicação intracelular como alterações características do envelhecimento.

Embora o envelhecimento esteja amplamente associado com a ocorrência de disfunções em diversos processos fisiológicos como os citados anteriormente, este não é necessariamente um processo patológico, mesmo que por definição seja relacionado ao aumento da vulnerabilidade a manifestações patológicas.

A relação direta entre o envelhecimento e o aumento da vulnerabilidade a patologias deu origem ao termo *doenças associadas ao envelhecimento*, uma ampla variedade de doenças que possuem como fator de risco o envelhecimento, como por exemplo: aterosclerose, câncer, osteoporose, osteoartrite, hipertensão arterial, diabetes e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (World Health Organization, 2011). O estudo destas doenças torna-se importante quando considera-se o crescente potencial mundial de envelhecimento populacional.

Estima-se um aumento de 141% na proporção mundial de pessoas entre 60 e 80 anos de idade até o ano de 2050 (Crews, 2007), representando 22% da população mundial total (Prince, Bryce *et al.*, 2013). Aliado ao aumento no número de pessoas idosas, estima-se que ocorra, por consequência, a elevação do número de pessoas acometidas por doenças associadas ao envelhecimento, ilustrando a importância do estudo do envelhecimento e processos patológicos associados.

Apesar da associação entre envelhecimento e as patologias descritas acima, os mecanismos celulares indutores desta, encontram-se parcialmente descritos assim como a etiologia do envelhecimento.

Teorias relacionando disfunções mitocondriais (Wallace, 1999), desregulação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (Toescu, Verkhatsky *et al.*, 2004) estresse oxidativo (Harman, 1956), inibição das vias de degradação (Carrard, Bulteau *et al.*, 2002), inflamação crônica, e desregulação gênica induzida pelo encurtamento dos telômeros (Shore, 1997) foram postuladas visando explicar o envelhecimento (Kirkwood, 2005; Gladyshev, 2012), porém foram parcialmente validadas experimentalmente (Gems e Partridge, 2013; Sergiev, Dontsova *et al.*, 2015).

Ressalta-se que algumas dessas hipóteses são empregadas com o intuito de entender as causas do envelhecimento, bem como a etiologia das doenças associadas ao envelhecimento, demonstrando que ambos processos são correlacionados.

Esforços significativos também vêm sendo dispendidos visando verificar se o processo de envelhecimento ocorreria ao acaso ou dependente de modulação ao nível gênico. Entretanto, não foram encontradas evidências experimentais suficientes para refutar uma dessas hipóteses. Porém, uma ampla gama de trabalhos tem demonstrado como a manipulação gênica e de fatores externos, podem modificar a longevidade dos mais variados organismos, incluindo primatas, por meio do retardamento do processo de envelhecimento, sugerindo a complementaridade entre ambas hipóteses (Kenyon, 2010; Sergiev, Dontsova *et al.*, 2015).

Além da complexidade relacionada à etiologia do envelhecimento, há evidências de que o envelhecimento do organismo possa ocorrer de forma temporalmente coordenada, sendo o sistema nervoso central primariamente afetado durante o envelhecimento e possível transdutor dessas alterações

globais dependentes do envelhecimento (Rando, 2006; Morrison e Baxter, 2012; Zhang, Li *et al.*, 2013; Bouchard e Villeda, 2015).

Essa hipótese tem como base a posição fisiológica privilegiada ocupada pelo sistema nervoso central, intrinsicamente associado com todos os sistemas fisiológicos corporais, explicando como o sistema nervoso central poderia ser influenciado e influenciador do processo de envelhecimento sistêmico (Zhang, Li *et al.*, 2013).

O envelhecimento cerebral culmina em alterações macroscópicas como aumento da área dos sulcos e ventrículos cerebrais (Decarli, Massaro *et al.*, 2005) e alterações microscópicas, específicas das diferentes regiões encefálicas, relacionadas com a morfologia dendrítica, plasticidade sináptica (Scheibel, Lindsay *et al.*, 1976) e desregulação da homeostase do Ca^{2+} (Toescu, Verkhratsky *et al.*, 2004). No entanto, essas alterações ocorrem aparentemente na ausência de morte neuronal significativa (Squire e Zola-Morgan, 1991; Yankner, Lu *et al.*, 2008).

No nível gênico, o envelhecimento cerebral é caracterizado por alterações nos níveis de expressão de genes relacionados com os processos de inflamação, síntese e degradação de proteínas, proteínas associadas ao homeostase do Ca^{2+} , síntese de ATP, transporte mitocondrial e resposta imune, sendo que essas modificações dependem do dimorfismo e são específica de determinadas regiões encefálicas (Berchtold, Cribbs *et al.*, 2008; Loerch, Lu *et al.*, 2008).

Alterações funcionais como: diminuição da integração entre áreas cerebrais superiores e inferiores, e assincronia na ativação de áreas complementares para realização de tarefas, induzem o declínio cognitivo durante

o envelhecimento cerebral (Roberto, Nicole D *et al.*, 2002; Andrews-Hanna, Snyder *et al.*, 2007).

Embora as disfunções citadas acima sejam características do envelhecimento cerebral, dissociá-las de processos patológicos ainda é um desafio, em outras palavras, discriminar os limites entre disfunções associadas ao envelhecimento normal e o envelhecimento associado a doenças neurodegenerativas não é trivial (Mattson e Magnus, 2006).

As disfunções relacionadas ao envelhecimento também acontecem durante as doenças neurodegenerativas, entretanto de forma mais abrupta, e são progressivamente maiores à medida que a idade avança (Hebert, Scherr *et al.*, 2003; Bermejo-Pareja, Benito-León *et al.*, 2008), embora essas doenças possam acometer também pessoas jovens.

1.2 Doenças neurodegenerativas e agregação proteica

As doenças neurodegenerativas estão entre as mais comuns e financeiramente dispendiosas para sociedade dentro do grupo das doenças cerebrais. Estima-se que estas doenças tenham acometido 35,6 milhões de pessoas no ano de 2010 e dupliquem a cada 20 anos, existindo 65,7 milhões de pessoas em 2030 e 115,4 milhões de pessoas acometidas por algum tipo de doença neurodegenerativa em 2050 sendo essa a principal causa de óbito (Aguero-Torres, Fratiglioni *et al.*, 1999; Princem, 2009).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela morte neuronal normalmente de uma subpopulação específica de neurônios localizados no sistema nervoso central ou periférico, sendo este processo induzido por

mutações doenças-específicas ou exposição a fatores ambientais variáveis, resultando em déficits cognitivos e motores.

No Brasil e em outros países em desenvolvimento o estudo da epidemiologia de doenças neurodegenerativas é bastante precário baseando-se primariamente em estudos epidemiológicos de países desenvolvidos ou realizados em populações específicas. Em um estudo epidemiológico de uma comunidade de São Paulo, a prevalência de doenças neurodegenerativas variou de 2%, entre os indivíduos com idade de 65 a 69 anos, a altíssimos 40% entre aqueles com idade superior a 84 anos (Herrera, Caramelli *et al.*, 1998).

Além disso, Barbosa e colaboradores (2006) em um estudo complementar demonstraram, na cidade de Bambuí - Minas Gerais, que 7,2% das pessoas com idade superior a 64 anos, eram acometidas por algum dos subtipos de Parkinsonismo, sendo este um dos índices mais elevados de parkinsonismo já descrito. Desta maneira, com base nos estudos detalhados acima é de suma importância que os estudos dos mecanismos que levam à neurodegeneração sejam encorajados para a melhora da expectativa e qualidade de vida da população (Mayeux, 2003).

A agregação proteica é uma característica comum nas doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson (DP) (Gibb e Lees, 1988), Alzheimer (DA) (Selkoe, 1989; Hardy e Selkoe, 2002) e Esclerose lateral amiotrófica (ELA), desenvolvendo-se pela ocorrência de interações anormais entre proteínas constitutivas, que associam-se formando moléculas insolúveis que se depositam por todo o encéfalo tanto extra como intracelularmente.

Os agregados proteicos são amplamente relatados como indutores dos processos patológicos relacionados com a neurodegeneração. No entanto, a

existência desses agregados distribuídos no encéfalo de indivíduos idosos não acometidos por doenças neurodegenerativas questiona esse papel patológico (Dayan, 1970), além de reforçar a relação entre o envelhecimento e as doenças neurodegenerativas, uma vez que esses agregados são similares aos identificados nessas patologias.

A presença de agregados proteicos neurofibrilares, que são agregados filamentosos da proteína Tau hiperfosforilada e o acúmulo de agregados proteicos, nas formas de placas ou fibrilas, do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) são características do tecido cerebral de pacientes acometidos por DA.

A proteína Tau é uma fosfoproteína específica de neurônios que possui como função primordial promover a estabilização dos microtúbulos axonais influenciando nos processos de polarização neural, crescimento e morfologia do axônio e transporte axonal. (Caceres e Kosik, 1990; Esmali-Azad, Mccarty *et al.*, 1994; Dixit, Ross *et al.*, 2008).

Tau tem sua atividade principalmente regulada pela fosforilação de seus resíduos de tirosina, treonina e serina (Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K *et al.*, 1986; Williamson, Scales *et al.*, 2002), os quais representam 15% do total de resíduos dessa proteína. Proteínas quinases como GSK3 β (Glicogênio sintase quinase 3 beta), cdk5 (Proteína quinase dependente de ciclina 5), PKA (Proteína quinase A), PKC (Proteína quinase C) e Calmodulina possuem Tau como substrato (Avila, Lucas *et al.*, 2004), porém o nível de fosforilação de Tau é também regulado pela atividade de proteínas fosfatases como PP1 (Proteína fosfatase 1), PP2A (Proteína fosfatase 2A) e Calcinerina (Yamamoto, Hasegawa *et al.*, 1995).

Em DA Tau tornar-se hiperfosforilada devido a alteração na atividade enzimática de quinases e fosfatases que a possuem como substrato ou pela inibição de vias de degradação de Tau, processo que acredita-se que ocorre independente de quinases e fosfatases (Carrettiero, Hernandez *et al.*, 2009). Tau hiperfosforilação por consequência induz sua dissociação dos microtúbulos e posterior desestabilização destes, sendo esta alteração considerada essencial na etiologia de DA. Além da desestabilização dos microtúbulos a hiperfosforilação de Tau altera sua estrutura terciária e a torna susceptível a agregação com proteínas Tau hiperfosforiladas e normais dando origem aos agregados característico de DA (Alonso, Grundke-Iqbal *et al.*, 1996; Churcher, 2006).

O A β é formado por 40 (A β 40) e 42 (A β 42) aminoácidos originados pela clivagem da proteína integral de membrana precursora amiloide (APP) realizada pelas enzimas β - e γ -secretases. A produção de A β 42 é considerada um dos fatores determinantes na patofisiologia de DA (Haass e Selkoe, 2007), e evidências sugerem que sua citotoxicidade é dependente de sua ação sobre Tau (Rapoport, Dawson *et al.*, 2002; Shipton, Leitz *et al.*, 2011).

Os agregados proteicos também podem ser constituídos pela proteína α -sinucleína, principal constituinte dos corpos de Lewy, inclusões insolúveis neuronais características de doenças neurodegenerativas como o DP e outras sinucleinopatias.

A α -sinucleína atua sobre o componente pré-sináptico da neurotransmissão onde pode diminuir diretamente a disponibilidade de transportadores de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina)

(Wersinger, Prou *et al.*, 2003; Wersinger, Jeannotte *et al.*, 2006; Wersinger, Rusnak *et al.*, 2006) modulando a neurotransmissão.

Apesar de bastante presente durante o processo de neurodegeneração, ainda é bastante controversa a real importância da agregação de proteínas durante o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas tendo em vista que indivíduos não acometidos por doenças neurodegenerativas também apresentam tais agregados (Price e Morris, 1999; Ross e Poirier, 2005).

A concepção de que os agregados proteicos seriam as formas mais tóxicas em doenças neurodegenerativas foi contestada por estudos demonstrando que os oligômeros de A β 42 e de α -sinucleína exercem maior citotoxicidade que os agregados proteicos destas proteínas (revisto por Gispert-Sanchez e Auburger (2006)).

Estudos também sugerem que formas intermediárias e não agregadas de Tau hiperfosforilada exerceriam maior atividade citóxica, pois sequestram proteínas Tau não-hiperfosforiladas fosforilando-as, a agregação destas proteínas inibe esse processo de sequestro (Alonso, Li *et al.*, 2006).

Além disso, estudos realizados em modelos experimentais das doenças de DP (Wakabayashi, Tanji *et al.*, 2007), DA (Arrasate, Mitra *et al.*, 2004) e Huntington (De Calignon, Fox *et al.*, 2010) ilustram que a morte neuronal nestes modelos ocorre de forma independente da formação dos agregados proteicos. Demonstrando que possivelmente a agregação proteica não seria um fator primário deflagrador dos processos de neurodegeneração.

1.3 Transporte mitocondrial e doenças neurodegenerativas

As mitocôndrias possuem importância fundamental na homeostase celular, por alocarem a maquinaria responsável pela síntese de ATP, bem como por controlar e regular a disponibilidade de Ca^{2+} intracelular e o processo de apoptose.

O acúmulo de mitocôndrias não funcionais é característica do processo de envelhecimento. As mitocôndrias acumuladas apresentam alterações estruturais no DNA mitocondrial e membranas, diminuição do transporte de elétrons nos complexos I e IV da cadeia respiratória e consequentemente diminuição da produção de ATP, bem como o acúmulo de produtos da oxidação de proteínas e fosfolipídios, sendo estas alterações aparentemente determinantes durante o envelhecimento cerebral (Navarro e Boveris, 2010).

O envelhecimento cerebral também é marcado pela diminuição do número de mitocôndrias (Shankar, 2010) e sua persistente despolarização (Xiong, Verkhratsky *et al.*, 2002), o que culmina na disfunção dos processos de síntese de ATP e regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , e pode levar a ativação de caspases e consequentemente à morte celular (Esiri, 2007).

As mitocôndrias são produzidas no corpo celular e transportadas para a periferia (transporte anterógrado), as quais retornam para o corpo celular (transporte retrógrado) onde são degradadas ou multiplicadas. Para tanto, a membrana da mitocôndria possui sítios de ligação a proteínas motoras e adaptadoras que possibilitam o transporte rápido, lento, anterógrado, retrógrado e ancoragem (Hollenbeck e Saxton, 2005).

Para o transporte anterógrado, as proteínas Cinesinas 1 (KIF5) e 3 (KIF1B) são associadas com a proteína adaptadora Milton as quais formam um complexo que se associa à proteína Miro localizada na membrana externa mitocondrial (Figura 1) (Nangaku, Sato-Yoshitake *et al.*, 1994). Milton e Miro são características de Drosófilas, em mamíferos encontram-se suas homólogas chamadas de GRIF-1 (OIP-106), TRAK 2 e RHOT respectivamente, porém a nomenclatura dessas proteínas em Drosófilas é constantemente utilizada para mamíferos, como será nesse estudo.

No transporte retrógrado, as mitocôndrias ligam-se à Dineína e à Dinactina (Chevalier-Larsen e Holzbaur, 2006; Boldogh e Pon, 2007). A Dinactina serve como molécula adaptadora da mitocôndria à Dineína citoplasmática que se liga aos microtúbulos para o transporte da organela em direção ao corpo celular.

As mitocôndrias possuem mecanismos específicos de ancoragem em locais onde atuam na produção de ATP e regulação da homeostase celular do Ca^{2+} , como na zona pré-sináptica, espinhos dendríticos, cone de crescimento e nodos de Ranvier.

Kang e colaboradores (2008) demonstraram que a Sintafilina participa do ancoramento das mitocôndrias aumentando sua disponibilidade pré-sináptica, além da Sintafilina, Chen e colaboradores (2009) propuseram que a proteína Dineína de cadeia leve 8 (LC8) também poderia regular o ancoramento mitocondrial.

Figura 1. Ilustração do modelo de transporte e ancoramento mitocondrial, KIF5, Miro e Milton atuam no transporte anterógrado mitocondrial. Dineína e Dinactina atuam no transporte retrógrado mitocondrial. SNPH (Sintafilina) atua no ancoramento mitocondrial. Figura extraída e modificada de Cai e Sheng (2009).

Wang e colaboradores (2009) e Macaskill e colaboradores (2009) demonstraram independentemente que o aumento de concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} inibe o transporte mitocondrial retrógrado e anterógrado e que Miro possui um papel crucial nesta inibição.

As proteínas Miro possuem 2 domínios GTPásicos em suas porções N- e C-terminal e um par de domínios denominados motivos EF *hands* que possuem sítios de ligação para o Ca^{2+} (Fransson, Ruusala *et al.*, 2003; Frederick, Mccaffery *et al.*, 2004). Dois mecanismos de inibição do tráfego mitocondrial dependente da ligação do Ca^{2+} aos domínios EF *hand* da proteína Miro foram descritos.

Macaskill e colaboradores (2009) demonstraram que o aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} estimulada pela repetida indução de potenciais de ação, leva a inibição do transporte mitocondrial através da ligação

do Ca^{2+} aos domínios EF *hands* da proteína Miro e consequentemente dissociação desta do complexo motor Milton e KIF5 (Figura 2A).

Wang e colaboradores (2009) sugerem que a inibição do transporte mitocondrial ocorre pela mudança conformacional da Miro, a qual se liga ao domínio motor da KIF5 impedindo sua interação com os microtúbulos, ancorando a organela em locais de altas concentrações de Ca^{2+} (Figura 2B). Essa interação entre o Ca^{2+} e a proteína Miro possui ainda um papel citoprotetor durante a excitotoxicidade glutamatérgica (Wang e Schwarz, 2009) provavelmente devido à regulação dos níveis de Ca^{2+} intracelular promovida pelas mitocôndrias.

Figura 2. Ilustração dos mecanismos de inibição do transporte de mitocôndria por meio da ligação do Ca^{2+} aos domínios EF *hands* da proteína Miro, propostos respectivamente por Macaskill e colaboradores (2009) e Wang e colaboradores (2009), modificado de Cai e colaboradores (2009).

Aliado aos mecanismos propostos por Macaskill e colaboradores (2009) e Wang e colaboradores (2009), Chang e colaboradores (2011) elegantemente demonstraram que as concentrações intramitocondriais de Ca^{2+} também modulam o transporte de mitocôndrias, no entanto de forma independente da proteína Miro.

Wang e colaboradores (2011) propuseram uma nova via de inibição do tráfego mitocondrial, aparentemente independente da modulação exercida pelo Ca^{2+} , por meio da degradação via proteossomo da proteína Miro, dependente de

sua interação com as proteínas PINK1 e Parkina, já descritas como mutadas em pacientes acometidos pela DP.

Embora as vias de regulação do transporte mitocondrial dependente de elevações nas concentrações de Ca^{2+} intracelulares via Miro estejam bem descritas sua possível influência em processos neurodegenerativos encontra-se obscura.

Há evidências de que alterações do tráfego intracelular antecedem a formação de agregados proteicos (Cataldo, Peterhoff *et al.*, 2000) o que seria o primeiro fator importante para a degeneração celular.

Soane e colaboradores (2007) demonstraram evidências que relacionam disfunções mitocondriais, inclusive de seu tráfego, ao início das doenças neurodegenerativas, o que pode indicar um possível papel dessas organelas nos processos desencadeadores de neurodegeneração, anteriormente inclusive à agregação de proteínas.

Em concordância com Soane e colaboradores (2007) trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que antes e durante a formação de agregados proteicos ocorrem alterações na expressão de proteínas motoras relacionadas com o tráfego de mitocôndrias (Melo, D'unhao A *et al.*, 2012; Chaves, Melo *et al.*, 2013).

1.4 Alterações das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} e doenças neurodegenerativas

Ca^{2+} é uma molécula sinalizadora essencial para realização e controle de uma ampla gama funções celulares vitais como produção de ATP, proliferação celular, regulação gênica, morte celular e transmissão sináptica (revisado por

Gleichmann e Mattson, 2010). O retículo endoplasmático (RE) é a principal organela responsável pela regulação dos níveis Ca^{2+} , no entanto as mitocôndrias também participam da regulação dos níveis desse íon, e possuem mecanismos intrínsecos influenciados pelas concentrações Ca^{2+} em seu interior.

O decréscimo da eficiência mitocondrial durante o envelhecimento e o aumento do stress oxidativo em neurônios estão intimamente relacionados com alterações na homeostase do Ca^{2+} . Além disso, diversos trabalhos sugerem que alterações nas concentrações de Ca^{2+} intracelular possam mediar ou colaborar para a neurodegeneração (Celsi, Pizzo *et al.*, 2009; Smaili, Hirata *et al.*, 2009).

Mattson e colaboradores (1992) demonstraram que culturas de neurônios corticais humanos expostas a $\text{A}\beta 42$ apresentavam elevações nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} conferindo aumento da vulnerabilidade desses neurônios à excitotoxicidade.

O aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} em neurônios expostos a $\text{A}\beta 42$ pode ocorrer através da formação de poros na membrana plasmática permeáveis ao Ca^{2+} (Zhu, Y. J., Lin, H. *et al.*, 2000), que podem ser resultantes da peroxidação dos fosfolípidios da membrana plasmática decorrente do acúmulo de agregados proteicos, contendo $\text{A}\beta 42$ na superfície celular (Hensley, Carney *et al.*, 1994).

Danzer e colaboradores (2007) demonstraram que oligômeros de α -sinucleína gerados em culturas de neurônios também promovem o aumento do influxo de Ca^{2+} e conseqüentemente a ativação de caspases, possivelmente através da formação de poros permeáveis ao Ca^{2+} na membrana plasmática, similar ao mecanismo descrito para $\text{A}\beta$ (Kourie e Shorthouse, 2000; Furukawa, Matsuzaki-Kobayashi *et al.*, 2006). Desta maneira diversas evidências

relacionam a disfunção na homeostase do Ca^{2+} com o processo de neurodegeneração.

Portanto, conhecer a relação entre disfunções na homeostase celular do Ca^{2+} , o sistema de transporte intracelular e a formação de agregados proteicos é um passo importante para o melhor entendimento dos mecanismos da neurodegeneração, sua possível terapia reversiva e até mesmo para a prevenção da morte neuronal existente nessas patologias.

Então considerando a hipótese de a formação dos agregados ser secundária à disfunção celular, que trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram modificações na expressão de proteínas relacionadas a este, antes e durante a formação dos agregados proteicos e aliado ao fato da agregação proteica estar relacionada a alterações nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} o presente estudo foi concebido.

A proposta do presente estudo é de avaliar o tráfego mitocondrial associado à homeostase do Ca^{2+} e agregação proteica em três etapas e utilizando-se de dois modelos experimentais:

Primeiramente utilizaremos a exposição a rotenona como modelo de neurodegeneração associada a formação de agregados proteicos para analisar se há modificação no tráfego de mitocôndrias durante e antes da formação dos agregados concomitantemente a alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos. E então avaliar se a modulação provida pela proteína Miro sobre o tráfego mitocondrial seria um fator importante nesse cenário, sendo estas análises realizadas na Universidade de São Paulo (USP) – sobre orientação da Professora Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e co-orientação do Professor Dr. Daniel Carneiro Carrettiero, da Universidade Federal do ABC.

No segundo momento serão utilizados neurônios humanos derivados de células com pluripotência induzida (iPSC) isogênicas com a mutação que leva à deleção de éxon 9 ($\Delta E9$) no gene da Presenilina 1, como modelo da doença de Alzheimer, para verificar a hipótese inicial através da análise dos parâmetros citados acima, sendo estas análises realizadas na Universidade da Califórnia San Diego (UCSD) – sob orientação do Professor Dr. Larry S.B Goldstein.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os níveis de Ca^{2+} citoplasmático e sua influência na mobilidade mitocondrial possivelmente mediada pelas proteínas Miro, antes e durante a agregação de proteínas envolvidas em neurodegeneração.

2.2 Objetivos específicos

1- Analisar a mobilidade e ancoramento mitocondrial em culturas de células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração.

2- Analisar os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos.

3- Analisar a relação entre o tráfego mitocondrial e o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial Ca^{2+} dependente promovido por Miro em culturas de células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados.

4- Avaliar os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em neurônios humanos isogênicos derivados de células tronco de pluripotência induzida (iPSC) contendo uma série alélica de mutações ΔE9 no gene de PS1.

5- Analisar a mobilidade e ancoramento mitocondrial em neurônios humanos isogênicos derivados de células tronco de pluripotência induzida (iPSC) contendo uma série alélica de mutações ΔE9 no gene de PS1.

6- Avaliar o envolvimento do mecanismo Miro dependente de inibição de do transporte mitocondrial nos índices de mobilidade mitocondrial em neurônios humanos isogênicos derivados de células tronco de pluripotência induzida (iPSC) contendo uma série alélica de mutações $\Delta E9$ no gene de PS1.

CAPÍTULO II – MODELO DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADO

A AGREGAÇÃO PROTEICA EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS DE RATOS

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo utilizou-se da exposição à rotenona para a indução de agregados proteicos. Esse modelo de indução da formação de agregados proteicos é frequentemente utilizado em trabalhos *in vivo* (Sherer, Kim *et al.*, 2003; Hoglinger, Lannuzel *et al.*, 2005; Feng, Liang *et al.*, 2006) e nosso grupo demonstrou sua aplicação *in vitro* (Chaves, Melo *et al.*, 2010).

A rotenona é um praguicida natural e um inibidor específico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, que induz estresse oxidativo, concentração dependente, mimetizando o que ocorre durante o processo de envelhecimento. O efeito da rotenona mais bem caracterizado é sobre o complexo I, porém efeitos como a inibição do proteassomo e disfunção da enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) já foram relatados (Sherer, T. B., Betarbet, R. *et al.*, 2003; Dukes, Korwek *et al.*, 2005; Huang, Hao *et al.*, 2009; Chou, Li *et al.*, 2010).

Em Chaves e colaboradores (2010) nosso grupo demonstrou a formação de agregados proteicos contendo A β 42, α -sinucleína e Tau hiperfosforilada em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostas a 0,5nM e 1nM de rotenona por 48 horas. Além disso, nosso grupo sugeriu que a capacidade da exposição à rotenona induzir a formação de agregados proteicos seria dose-dependente, de forma que a agregação proteica seria intermediária nas células expostas a 0,5nM de rotenona e completa nas expostas a 1nM de rotenona (Figura 3). Esse estudo também demonstrou que a formação

dos agregados proteicos ocorre independente de morte celular nas culturas de células analisadas (Figura 4).

Logo, com base nos resultados anteriores do nosso grupo, a exposição à rotenona na concentração de 0,5nM permitiria a análise de parâmetros da fisiologia celular durante a formação dos agregados proteicos envolvidos em DA e DP. Esses dados também sugerem que a exposição à concentrações menores que 0,5nM possivelmente permitiriam a análise de parâmetros antes da formação dos agregados proteicos.

Desta forma o presente estudo tem como objetivo verificar primeiramente se a exposição a 0,3nM de rotenona pode ser empregada como modelo de análise de parâmetros da fisiologia neuronal antes da formação dos agregados proteicos, realizando experimentos para avaliar os níveis e agregação de Tau hiperfosforilada, atividade proteossomal, fluxo autofágico e homeostase Redox.

No segundo momento, tendo verificado a possível existência de alterações no transporte mitocondrial e nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} antes e durante a formação dos agregados proteicos, será avaliada a possibilidade do mecanismo de inibição da mobilidade mitocondrial Ca^{2+} dependente promovida por Miro estar envolvida neste cenário.

Figura 3. 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 (Tau p), α -sinucleína e $A\beta$. Setas ilustram marcações imunopositivas para agregados proteicos. Modificado de Chaves e colaboradores (2010).

Figura 4. 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 Tripan para identificação de morte celular (setas). Modificado de Chaves e colaboradores (2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas e criados no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Esta linhagem foi escolhida por ser suscetível à agregação de proteínas constitutivas após exposição à rotenona (Sherer, Kim *et al.*, 2003; Hoglinger, Lannuzel *et al.*, 2005; Feng, Liang *et al.*, 2006; Chaves, Melo *et al.*, 2010) .

Os experimentos propostos estão em conformidade com todos os aspectos éticos de experimentação animal recomendados pelo CONCEA, bem como de acordo com a lei federal No. 11.794, e foram aprovados pelos comitês de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina (Protocolo 154/11) e do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo 121/2011).

2.2 Cultura de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte

A metodologia utilizada para a cultura de células foi uma modificação da metodologia descrita por Kivell e colaboradores (2001). Para cada experimento foram utilizados 10 ratos com no máximo 1 dia de vida pós-natal que após serem decapitados, tiveram o encéfalo removido e colocado em placa de Petri estéril contendo solução fisiológica gelada e estéril preparada no momento da realização do experimento constituída de 120mM NaCl, 5mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄·7H₂O, 25mM NaHCO₃, 13mM glicose e água Milli Q, pH 7,2 ajustado com HCl.

Utilizando um estilete estéril o tronco encefálico foi separado do cérebro, e então a porção dorsomedial de uma fatia de aproximadamente 2 mm da ponte contendo o locus coeruleus foi removida. Em seguida os hemisférios cerebrais foram separados e a face interna dos hemisférios foi exposta possibilitando a extração bilateral do hipocampo e da porção ventrolateral de uma fatia de aproximadamente 2 mm do mesencéfalo contendo a substância negra.

A figura 5 ilustra as regiões dissecadas para a cultura de células. A maioria das células sanguíneas e epiteliais das regiões de interesse foram removidas e o tecido permaneceu em solução fisiológica gelada até o final da retirada dos encéfalos de todos os animais.

As células foram dissociadas mecânica e quimicamente utilizando uma tesoura estéril e tripsina 0,05% (Gibco), respectivamente, a incubação da tripsina ocorreu à 37°C durante 40 minutos em banho mantido sob agitação. Após a incubação com tripsina foi adicionado inibidor de tripsina 0,006% (Gibco) à solução contendo as células sendo em seguida novamente dissociadas utilizando uma pipeta Pasteur.

A solução contendo as células completamente dissociadas foi centrifugada a 300g por 5 minutos, com o objetivo de precipitar as células. As células foram então ressuspensas em meio de cultura Neurobasal A (Gibco) suplementado com 0,25mM Glutamax (Gibco), 2% B27 (Gibco), 0,25mM L-Glutamina (Sigma) e 40mg/L Gentamicina (Gibco) e então contadas utilizando câmara de Neubauer e corante Azul de tripan (Gibco), a fim de se plaquear 1800 células por milímetro quadrado.

A quantidade de células necessárias por poço foi calculada e em seguida plaqueada em placas de culturas com fundo de vidro, apropriadas para

microscopia confocal (MatTek) ou de 12 poços (Nunc) ambas tratadas no dia anterior com poli-D-lisina 10µg/ml (Sigma).

As células plaqueadas foram cultivadas em estufa contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37° C durante nove dias tendo o meio de cultura trocado três horas depois do plaqueamento das células e a cada três dias de cultivo.

2.3 Caracterização das culturas de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte

As culturas de células empregadas nesse estudo foram caracterizadas através de ensaios imunocitoquímicos utilizando-se os anticorpos anti- Proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) e anti-Tirosina hidroxilase (TH). Após nove dias em cultura as células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra foram lavadas com PBS gelado e fixadas em solução composta por 4% de paraformaldeído (Sigma) diluído em PBS durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Após a fixação, as células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,2% de triton durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram bloqueadas com PBS contendo 2% de NGS (soro de cabra, Vector laboratories), 0,2% de triton e 4% de BSA (albumina de soro bovino, Sigma) durante 30 minutos em temperatura ambiente com o intuito de evitar ligações não específicas dos anticorpos.

Os anticorpos primários anti-MAP2 (M4403, Sigma) e anti-TH (MAB318, Millipore) foram então diluídos na concentração de 1/1000 em PBS contendo 1% NGS, BSA 2% e 0,2% triton e incubados, independentemente, durante 24 horas a 4°C. A realização deste ensaio permite verificar se as culturas cultivadas

mimetizam, mesmo que parcialmente, a identidade bioquímica e a constituição celular encontrada nessas áreas *in vivo*.

Terminado o período de incubação as células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos cada e posteriormente incubadas com anticorpo secundário, conjugado a molécula fluorescente FITC, anti-camundongo (Jackson) na concentração de 1/120 diluído em PBS contendo 1% NGS, BSA 2% e 0,2% triton durante 1 hora em temperatura ambiente e protegido da luz.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos cada em ambiente escuro e montadas adicionando 2 gotas do meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector laboratories). Após a aplicação do DAPI as células foram analisadas em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Zeiss) equipado com câmera Axio Cam MRm utilizando-se da objetiva de 20x e dos filtros apropriados.

A quantificação da percentagem de células expressando MAP2 ou TH foi feita realizada capturando-se fotomicrografias digitais de 3 campos randomicamente escolhidos em cada placa de cultura analisada, totalizando 3 placas. O cálculo da percentagem de células imunopositivas aos anticorpos anti-MAP2 e anti-TH foi realizado em relação ao número de células totais, gerado pela marcação com DAPI.

Figura 5. Imagens representativas de secções do encéfalo de rato contendo as regiões dissecadas para a cultura de células (quadro azul). (A) hipocampo, (B) região ventrolateral do mesencéfalo contendo a substância negra (SN), (C) região dorsomedial da ponte contendo o locus coeruleus (LC). Modificado de (Paxinos e Watson, 2007).

2.4 Exposição das células em cultura à rotenona

Após os nove dias de cultivo as células das diferentes regiões foram expostas à rotenona em diferentes concentrações baseando-se em um dos nossos estudos anteriores (Chaves, Melo *et al.*, 2010).

Visando avaliar a hipótese que exposição à rotenona em concentrações menores que 0,5nM permitiriam a análise de parâmetros fisiológicos antes da formação dos agregados proteicos, culturas de células do hipocampo foram expostas a 0,3nM de rotenona (Sigma, EUA) ou DMSO (Sigma, EUA), solvente da rotenona, durante 48 e 72 horas. Sendo avaliadas quanto a citotoxicidade exercida pela exposição à rotenona, presença de agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada, níveis de Tau hiperfosforilada, níveis de proteínas carboniladas, níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade proteolítica proteossomal e fluxo autofágico.

Para realização das análises da mobilidade mitocondrial e alteração dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ foram empregados experimentos para verificação da curva dose-resposta, que permitem a comparação dos parâmetros da fisiologia celular selecionados nesse projeto antes e durante a agregação proteica, e temporal dos efeitos induzidos pela exposição à rotenona, que também permite a análise dos parâmetros selecionados antes e durante a agregação proteica inserido em uma contextualização temporal.

A curva dose-resposta foi verificada por incubação das culturas por 48 horas com 0,3, e 0,5nM de rotenona. Para o experimento de curva temporal, as células foram incubadas com 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas.

A rotenona foi diluída inicialmente em DMSO e posteriormente diluída em meio de cultura e então utilizada para exposição. As culturas controle foram

expostas a meio de cultura contendo DMSO em concentração semelhante à usada na exposição à rotenona, sendo sempre menor que 0,002%. Após o tempo destinado, as células foram lavadas e submetidas à análise da mobilidade mitocondrial e níveis de Ca^{2+} citoplasmático.

2.5 Avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros antes da formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração em cultura de células do hipocampo

2.5.1 Análise do percentual de morte celular após exposição a baixas concentrações de rotenona

2.5.1.1 Corante Azul de tripan

Após a exposição à rotenona, adicionou-se no meio de cultura das células do hipocampo 10 μ L de solução de azul de tripan (Gibco), que cora em azul o citoplasma das células com a membrana danificada, já que as células intactas não são permeáveis ao azul de tripan.

Portanto, as células coradas indicam que sofreram algum dano em sua membrana plasmática e estão mortas ou em processo de morte. Imediatamente após a adição do azul de tripan, as células foram analisadas em microscópio (Nikon Eclipse TS100 com câmera acoplada) e imagens de três campos, escolhidos randomicamente, foram capturadas utilizando a objetiva de 20x para análise qualitativa do processo de morte celular.

2.5.1.2 Redução do MTT

O ensaio colorimétrico de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é baseado na análise do processo de redução enzimática de MTT originando o metabólito formazana o qual somente ocorre em células viáveis. A reação de redução do MTT pode ser monitorada através da análise da absorbância no comprimento de onda de 570nm, sendo que a absorbância correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis permitindo então a análise quantitativa desse parâmetro (Mosmann, 1983).

O ensaio foi conduzido utilizando células plaqueadas em placas de 96 poços expostas à rotenona, sendo posteriormente incubadas com 20µL de MTT (5mg/ml, Sigma) por poço durante 1 hora em incubadora de CO₂ (Ganot, Meker *et al.*, 2013). Após a incubação, o meio de cultura contendo MTT foi descartado, as células solubilizadas com 200µl de DMSO por poço e submetidas a análise dos níveis de absorbância (570nm) utilizando-se de leitor de placas (Epoch, Biotek).

2.5.2 Análise da influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Tau hiperfosforilada e sua agregação

2.5.2.1 Análise dos níveis de Tau total e Tau hiperfosforilada

Após a exposição à rotenona as células do hipocampo foram lavadas com PBS e em seguida lisadas e homogeneizadas, utilizando-se de solução composta de Tris 50mM, EGTA 1mM, MgCl₂ 1mM, Np-40 0,5% e Glicerol 10%, de maneira que cada amostra é um *pool* de 3 poços de uma cultura realizada.

Após a homogeneização, as células foram centrifugadas durante 20 minutos a 14000 rpm, e o sobrenadante foi quantificado pelo Nanodrop (Thermo Scientific).

As proteínas extraídas foram utilizadas imediatamente para a análise da atividade proteossomal e avaliação dos níveis de peróxido de hidrogênio. Uma parte dessas proteínas foi armazenada a -70°C após adição de coquetel inibidor de proteases (Sigma) para posterior análise dos níveis de Tau hiperfosforilada e de proteínas carboniladas.

As amostras obtidas (15µg) foram desnaturadas à 100°C durante 3 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12% para fracionamento. Em uma das canaletas foi aplicado o marcador de peso molecular (Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com 250mM Trizma (Sigma), 960mM Glicina e 1% SDS, as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, usando tampão contendo 25mM Trizma (Sigma), 190mM Glicina e 10% Metanol durante 1 hora através de aplicação de 100 volts, posteriormente bloqueada com leite 5% em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente e então incubação com anticorpo primário anti-Tau fosforilada Ser 199/202 (T6819, Sigma) ou anti-total-Tau (T9450, Sigma) ambos na concentração de 1/1000 em solução de leite 3% em TBS-T durante 24 horas a 4°C.

Então o anticorpo secundário anti-coelho (1/10000) para anti-Tau fosforilada Ser 199/202 ou anti-camundongo (1/6000) para anti-total-Tau, ambos conjugados a uma peroxidase (HRP) (Amersham), foi incubado em solução de leite 3% em TBS-T à temperatura ambiente durante 1 hora. As membranas foram então lavadas e a marcação revelada através de incubação com reagente

quimioluminescente (Millipore) durante 5 minutos e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) os quais foram revelados conforme as instruções do fabricante.

Em seguida, as membranas foram submetidas a nova marcação com anticorpo contra β -Actina (1:1000, C4, Santa Cruz), para normalização, seguida de incubação com o anticorpo secundário (anti-camundongo, 1:6000, conjugado a HRP (Amersham), reação e revelação como já descrito.

Os filmes foram quantificados por densitometria óptica usando o programa ImageJ e os resultados foram avaliados. A análise dos níveis de proteína Tau hiperfosforilada em relação aos níveis de total-Tau, foram acessados através da utilização dos valores absolutos obtidos de cada marcação após a normalização com a respectiva marcação com β -Actina. Os dados são demonstrados como unidades arbitrárias para a análise dos níveis de Tau hiperfosforilada e percentagem do controle (DMSO) para análise da relação entre Tau hiperfosforilada e Tau total.

2.5.2.2 Análise da agregação de Tau hiperfosforilada por imunofluorescência

Após exposição à rotenona as células do hipocampo foram lavadas em PBS gelado e fixadas em solução 50% metanol e 50% acetona durante 10 minutos à -20°C. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,2% de triton durante 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente submetidas à remoção da peroxidase interna com solução contendo 50% metanol e 0,1% H₂O₂ em PBS por 15 minutos.

Em seguida as células foram bloqueadas com PBS contendo 2% de NGS (soro de cabra) (Vector laboratories), 0,2% de triton e 4% de BSA (albumina de soro bovino) (Sigma) durante 30 minutos em temperatura ambiente com o intuito de evitar ligações não específicas dos anticorpos. Os anticorpos primários anti-Tau fosforilada Ser 199/202 (T6819, Sigma) e anti-MAP2 (M4403, Sigma) foram então diluídos na concentração de 1/1000 em PBS contendo 1% NGS, BSA 2% e 0,2% triton e incubado durante 24 horas a 4°C.

Terminado o período de incubação as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a molécula fluorescente FITC (Jackson) (anti-camundongo) para anti-MAP2 e Texas-red (Jackson) (anti-coelho) para anti-Tau fosforilada Ser 199/202, ambos na concentração de 1/100 e diluídos em PBS contendo 1% NGS, BSA 2% e 0,2% triton durante 1 hora em temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos cada em ambiente escuro e montadas adicionando 2 gotas do meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector laboratories). Após a aplicação do DAPI as células foram analisadas em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Zeiss) equipado com câmera Axio Cam MRm utilizando-se da objetiva de 20x e dos filtros apropriados.

2.5.2.3 Análise da agregação de Tau total por Western Blot

Para análise da formação dos agregados proteicos contendo Tau, aferiram-se os níveis de Tau total existente na fração proteica insolúvel resistente a exposição ao detergente Triton 100x (Sigma), dos extratos proteicos obtidos das culturas de células após exposição à rotenona.

Para obtenção das frações insolúveis as células cultivadas foram lisadas e as proteínas extraídas em tampão RIPA contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 0,25% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 0,5% Triton X-100, 1 mM 4-(2-aminoetil) benzeno-sulfonil fluoreto hidrocloreto, 1 µg/ml inibidor de protease (Sigma), 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ e incubadas durante 30 minutos à 4°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 20.000g durante 30 minutos à 4°C, o sobrenadante obtido foi coletado referindo-se à fração solúvel a Triton 100X, o precipitado foi ressuspenso em tampão de extração e novamente centrifugado, sendo esse processo repetido por duas vezes, originando então a fração insolúvel a Triton 100X (Santa-Maria, Hernandez *et al.*, 2007).

A análise dos níveis de Tau na fração insolúvel foi realizada ou utilizando os procedimentos já citados para realização da técnica de Western Blot. O anticorpo anti-total-Tau (T9450, Sigma) foi utilizado para detecção de Tau na fração triton 100X insolúvel sendo esta marcação normalizada pela marcação com β -Actina (Santa Cruz) na fração solúvel dessas amostras. A quantificações das marcações obtidas foi realizada conforme protocolo descrito nas sessões anteriores. Os dados são demonstrados como percentagem do controle (DMSO).

2.5.3. Análise da atividade proteolítica proteassomal

A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan – SP em colaboração com a professora Marilene Demasi, através da reação de 30µg de proteína de cada amostra com Suc-LLVY-AMC (Calbiochem),

amplamente utilizado para avaliação da atividade quimiotripsínica da subunidade proteossomal 20S, diluído em tampão Tris 20mM na concentração de 125µM e posterior análise fluorimétrica da conversão do Suc-LLVY-AMC ao composto fluorescente AMC utilizando-se de fluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

A fluorescência foi captada através da emissão no comprimento de onda de 440nm e excitação com o comprimento de onda de 365nm, durante 45 minutos com intervalos de 3 minutos para cada leitura. Os dados obtidos (Vmax - unidades por segundo) foram então processados através da normalização com os controles negativos (tampão + Suc-LLVY-AMC), sendo os dados demonstrados como percentagem do controle (DMSO).

2.5.4. Análise do fluxo autofágico

O fluxo autofágico foi monitorado utilizando-se o vetor fluorescente LC3-EGFP-mCherry, LC3 (proteína associadas aos microtúbulos de cadeia leve 3) é uma proteína amplamente utilizada na análise do processo autofágico devido a sua capacidade de ligar-se a membrana interna e externa de autofagossomos, atuando como detector da formação dessas vesículas (Kabeya, Mizushima *et al.*, 2000).

A expressão de LC3-EGFP-mCherry permite a análise do número e tamanho dos autofagossomos, devido a ligação da LC3 à sua membrana. A expressão de LC3-EGFP-mCherry também permite a análise do fluxo autofágico devido às características químicas das moléculas fluorescentes fusionadas a LC3 (Kimura, Noda *et al.*, 2007).

EGFP é uma molécula que apresenta fluorescência dependente do pH, sendo sua fluorescência quase totalmente inibida em ambientes ácidos. A molécula mCherry é menos dependente do pH e emite fluorescência mesmo em ambientes ácidos. Devido a essas características, a expressão de LC3-EGFP-mCherry promove a marcação de EGFP restrita aos autofagossomos, pois a fusão dos autofagossomos com os lisossomos induz a redução do pH intravesicular inibindo a fluorescência emitida por EGFP. Enquanto que as marcações com mCherry mantêm-se em ambos compartimentos, autofagossomos e autofagolisossomos.

O fluxo autofágico pode então ser obtido através da razão entre o número de vesículas apresentando co-localização entre a fluorescência emitida por EGFP e mCherry pelo número de vesículas apresentando somente a fluorescência emitida por mCherry (Kimura, Noda *et al.*, 2007; Nyfeler, Bergman *et al.*, 2011; Castillo, Nassif *et al.*, 2013).

Para análise do fluxo autofágico células no oitavo dia *in vitro* foram transfectadas com 1750ng de LC3-EGFP-mCherry através da utilização do reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante, e após 24 horas expostas à rotenona (0,3nM ou 0,5nM durante 48 horas) conforme protocolo descrito, porém utilizando-se de meio de cultura Neurobasal A Phenol Free.

Terminado o período de exposição à rotenona o fluxo autofágico foi analisado. Em cada placa de cultura transfectada 3 células foram escolhidas randomicamente para captura de imagem, após excitação a 488nm para GFP e 535nm para mCherry e coleta da emissão individual a 520nm e 620nm, respectivamente. Estes ensaios foram realizados utilizando microscópio confocal

Zeiss LSM 780 Multifóton, invertido e motorizado, em câmara de aquecimento à 37°C acoplada a plataforma, com atmosfera constituída de 5% CO₂ e utilizando objetiva de 100x, equipamento disponível no centro de facilidade para pesquisa (CEFAP).

O número de pontos apresentando marcações de EGFP e mCherry individuais ou co-localização foi acessado utilizando-se do programa ImageJ (NIH) em conjunto com o *plug-in Green and Red puncta colocalization* de acordo com o protocolo descrito por Pampliega e colaboradores (2013). O fluxo autofágico foi então calculado pela razão entre o número de vesículas demonstrando co-localização entre EGFP e mCherry pelo número de vesículas positivas exclusivamente ao mCherry, conforme metodologia descrita por Castillo e colaboradores (2013).

2.5.5. Análise da influência da exposição à rotenona sobre a homeostase Redox

2.5.5.1 Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram monitorados utilizando o probe fluorescente CM-H₂DCFDA (Invitrogen), que apresentada sensibilidade para detecção de diversas ROS como peróxidos, radicais hidroxila, peroxinitritos e radicais peroxil. A ligação de ROS ao probe induz o aumento da fluorescência emitida por este, permitindo avaliação quantitativa dos níveis dessas moléculas após a exposição à rotenona (Da-Silva, Gómez-Puyou *et al.*, 2004).

Células exposta à rotenona foram incubadas com 2 μ M de CM-H₂DCFDA diluído em meio de cultura durante 40 minutos em incubadora de CO₂ e posteriormente lavadas e analisadas em meio de cultura Neurobasal A Fenol Free (Invitrogen).

Os níveis de ROS foram aferidos através da análise da intensidade da fluorescência emitida pelo probe, em cada placa, 3 campos foram escolhidos randomicamente para captura de imagem, após excitação a 488nm e coleta da emissão a 520nm utilizando microscópio confocal Zeiss LSM 780 Multifóton, invertido e motorizado, em câmara de aquecimento à 37°C acoplada a plataforma, com atmosfera constituída de 5% CO₂ e utilizando objetiva de 20x, equipamento disponível no centro de facilidade para pesquisa (CEFAP).

A quantificação foi realizada utilizando o programa ImageJ (NIH), regiões de interesse tool (ROI) foram demarcadas no corpo celular de 7 neurônios e 3 locais sem células marcadas (*background*), ambos escolhidos randomicamente em cada imagem, os valores de intensidade foram então obtidos e o *background* foi subtraído permitindo que os níveis de ROS fossem acessado conforme Figueiredo e colaboradores (2013). Os dados são apresentados como percentagem do controle (DMSO) e cores artificiais foram utilizadas nas imagens digitais com o intuito de facilitar a análise visual das diferenças entre os grupos experimentais.

2.5.5.2 Análise dos níveis totais de proteínas carboniladas

A carbonilação de proteínas é um processo irreversível que leva a modificação da estrutura química da proteína alvo através da adição de grupamentos carbonil (Stadtman e Berlett, 1998). Shacter e colegas (1994)

demonstraram que o número de grupos carbonil adicionados a uma proteína correlacionam-se com a extensão do dano oxidativo causado, sendo este induzido pelo aumento de ROS, permitindo então relacionar o aumento dos níveis de proteínas carboniladas com aumento de ROS (Dalle-Donne, Giustarini *et al.*, 2003).

Análise dos níveis totais de proteínas carboniladas foi realizada no Laboratório do Professor Luis E. S. Netto e auxiliado pelo especialista técnico Thiago Alegria. Para a análise dos níveis totais de proteínas carboniladas em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona amostras obtidas (15µg) foram desnaturadas, separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose conforme os procedimentos já citados anteriormente para Western blot.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram posteriormente processadas conforme instruções, soluções e anticorpos do kit OxiSelect™ Protein Carbonyl Immunoblot Kit (Cell Biolabs).

Resumidamente, as membranas de nitrocelulose foram equilibradas com metanol 20% diluído em TBS durante 5 minutos, lavada duas vezes com HCl 2N durante 5 minutos cada, posteriormente incubada com DNPH para reação de derivatização por 5 minutos, a reação foi interrompida através de duas lavagens com HCl 2N, durante 5 minutos cada.

Em seguida as membranas foram bloqueadas com leite 5% em TBS-T durante 1 hora em temperatura ambiente, incubada com anticorpo primário anti-DNPH na concentração de 1/1000 em leite 5% em TBS-T durante 1 hora em temperatura ambiente e anticorpo secundário anti-rabbit conjugado HRP na concentração de 1/1000 leite 5% em TBS-T durante 1 hora à temperatura.

As membranas foram então lavadas e a marcação revelada através de incubação com reagente quimioluminescente (Millipore) durante 5 minutos e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) que foram revelados conforme as instruções do fabricante.

Em seguida, as membranas foram submetidas a nova marcação com anticorpo contra β -Actina (1/1000, Santa Cruz), para normalização, seguida de incubação com anticorpo secundário (anti-camundongo, 1:6000, conjugado a HRP, Amersham), reação e revelação como já descrito.

A densidade ótica das marcações foi aferida usando o programa ImageJ (NIH). Devido à natureza do ensaio, a marcação revela-se como um arrasto, referente à marcação de proteínas em todas as faixas de peso molecular (kDa), este arrasto foi quantificado e normalizado pela marcação com β -Actina. Os resultados são demonstrados como percentagem do controle (DMSO).

2.5.5.3 Análise dos níveis de peróxido de hidrogênio

Esta análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan – SP em colaboração com a professora Marilene Demasi. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram analisados com base na metodologia descrita por Zhou e colaboradores (1997). Resumidamente, a análise foi realizada pela reação de 30 μ g de proteínas de cada amostra com 50 μ M do reagente fluorogênico Amplex Red (Molecular probes) e 1U/ml de HRP diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,0.

Posteriormente realizou-se a análise fluorimétrica da reação do Amplex Red com as moléculas de peróxido de hidrogênio utilizando-se de fluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A fluorescência foi captada através

da emissão no comprimento de onda de 587nm e excitação com o comprimento de onda de 563nm, durante 10 minutos com intervalos de 20 segundos para cada leitura.

Os dados obtidos (V_{max} - unidades por segundo) foram então processados através da normalização com os controles negativos (tampão + Amplex Red), sendo os dados demonstrados como percentagem do controle (DMSO).

2.6 Análise da mobilidade mitocondrial em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados

2.6.1 Análise da mobilidade mitocondrial

Após exposição à rotenona, as culturas de células tiveram suas mitocôndrias marcadas com o sonda fluorescente MitoTracker® Green FM (Invitrogen), que marca mitocôndrias ao se ligar covalentemente a grupos sulfidrílicos livres na membrana mitocondrial (Buckman, Hernández *et al.*, 2001), para visualização em microscopia confocal. Para tanto, a solução de mitotracker foi preparada dissolvendo o corante liofilizado em DMSO a fim de obter o estoque a 1mM, segundo recomendação do fabricante. Esta solução foi mantida em ambiente protegido da luz e a -20°C.

A incubação das células e lavagens foram realizadas utilizando-se de meio de cultura Neurobasal A Fenol Free (Invitrogen) suplementado conforme descrito anteriormente, visando diminuir o *background* das marcações. A marcação com mitotracker foi realizada utilizando-se 30nM de mitotracker e

incubação durante 30 minutos em incubadora de CO₂. Após o período de incubação as células foram lavadas três vezes em meio de cultura e então imediatamente visualizadas em microscópio confocal para análise da mobilidade mitocondrial.

A mobilidade mitocondrial foi analisada em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta/UV com microscópio Axiovert100 M, invertido e motorizado, equipamento multiusuário do Instituto de Biociências, em câmara de aquecimento (Zeiss, Tempcontrol 37-2 digital) à 37°C acoplada a plataforma, utilizando objetiva de 63x imersão em água. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e visualização das marcações foram de 490nm e 516nm, respectivamente.

Cada mitocôndria foi identificada por sua morfologia (tamanho e forma), posição, intensidade da marcação e seu padrão de movimentação para a análise de sua mobilidade após exposição à rotenona. Os parâmetros selecionados para avaliação do transporte mitocondrial foram a percentagem de mitocôndrias móveis em relação à percentagem de mitocôndrias estáticas.

Para análise dos parâmetros selecionados em cada placa de cultura foram selecionados aleatoriamente três campos, dos quais foram capturadas imagens confocais seriadas com intervalos fixos de 1,79 segundos durante o período de 1,5 minutos totalizando 50 imagens confocais por campo.

As imagens seriadas confocais foram analisadas e quantificadas utilizando-se do protocolo descrito por Andrews e colaboradores (2010) e do programa ImageJ (NIH) associado ao *plug-in Difference Tracker* (Babraham Institute, Cambridge, UK).

Resumidamente, a ferramenta *Difference Filter* existente no *plug-in Difference Tracker* foi utilizada com a função de extrair unicamente as partículas móveis nas imagens seriadas e quantificar a razão entre as partículas móveis e estáticas em 1000 pixels (px). Utilizando-se dos dados obtidos o total de mitocôndrias e a percentagem de mitocôndrias móveis e estáticas foram acessados. Cada experimento foi feito em triplicata independente sendo repetido por no mínimo 2 vezes.

2.6.2 Validação do método de análise da mobilidade mitocondrial

Utilizando-se de culturas de células do hipocampo não expostas à rotenona, realizou-se a incubação com mitotracker conforme já descrito. Posteriormente à incubação com mitotracker e lavagem adicionou-se 0,7nM de ionomicina, ionóforo que induz aumento da concentração Ca^{2+} citoplasmáticos (Morgan e Jacob, 1994), imediatamente antes da visualização em microscópio confocal.

A exposição 0,7nM de ionomicina teve como objetivo induzir um leve aumento dos níveis de Ca^{2+} visando estimular o movimento mitocondrial, procedimento que justifica-se com base no mecanismo já descrito de modulação do transporte mitocondrial induzido por alterações no níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos.

Prosseguiu-se escolhendo aleatoriamente um campo desta placa, o qual foi analisado conforme protocolo descrito acima visando validar o método escolhido para análise da mobilidade mitocondrial.

2.7 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos

2.7.1 Incubação das culturas de células com Fura-2AM e análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}

Após a realização dos protocolos experimentais para verificação das curvas dose-resposta e temporal do efeito da rotenona sobre os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos, as culturas de células foram incubadas com a sonda fluorescente Fura-2AM (Sigma) sensível ao cálcio em meio de cultura Neurobasal A Fenol Free (Invitrogen) suplementado conforme descrito para análise do níveis citoplasmático de Ca^{2+} .

Resumindo, as células foram incubadas com Fura-2 diluído em meio de cultura na concentração de $1\mu\text{M}$ durante 30 minutos em incubadora de CO_2 . Após o período de incubação as células foram lavadas três vezes em meio de cultura e então imediatamente visualizadas em microscópio confocal para análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} .

Fura-2 é uma sonda fluorescente ratiométrica a qual é excitada nos comprimentos de onda de 340nm e 380nm e tem emissão de 516nm. No estado acoplado ao Ca^{2+} a sonda emite maior fluorescência com a excitação no comprimento de onda de 340nm, no estado não acoplado ao Ca^{2+} o inverso ocorre, de maneira que a razão entre o estado acoplado e não acoplado ao Ca^{2+} ilustraria os nível citoplasmáticos de Ca^{2+} (Paredes, Etzler *et al.*, 2008).

Os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} foram analisados em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta/UV com microscópio Axiovert100 M, invertido e motorizado, equipamento multiusuário do Instituto de Biociências, em câmara de

aquecimento (Zeiss, Tempcontrol 37-2 digital) à 37°C acoplada a plataforma, utilizando objetiva de 40x imersão em óleo.

Os comprimentos de ondas utilizados para excitação da sonda Fura-2 foram de 351nm, 364nm e emissão de 516nm, sendo o comprimento de onda 351nm utilizado para avaliar o estado da sonda acoplada ao Ca^{2+} (as células excitadas com esse comprimento são demonstradas em verde em todos os experimentos) e 364nm o estado não acoplado ao Ca^{2+} (as células excitadas com esse comprimento são demonstradas em vermelho em todos os experimentos).

O método empregado para análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} nas culturas expostas à rotenona durante 24, 48 e 72 horas foi uma modificação da metodologia descrita por Chang e Dolmetsch (2009). Em cada placa de cultura foram selecionados aleatoriamente três campos os quais imagem confocais seriadas com intervalos fixos de 9,35 segundos foram capturadas durante o período de 20 segundos totalizando 3 imagens confocais por campo.

As imagens seriadas confocais foram analisadas e quantificadas utilizando-se do programa LSM 510 Meta 3.2 (Carl Zeiss GmbH), utilizando-se da ferramenta *ROI mean (Relative object intensity)* a intensidade da fluorescência de 12 corpos celulares e 3 campos sem células marcadas (*background*) foram quantificados nos diferentes comprimentos de ondas de excitação da sonda.

Utilizando-se dos dados obtidos para cada comprimento de excitação o *background* de cada corpo celular foi extraído e os valores de ROI obtidos. Os valores foram então empregados para obtenção da razão entre os valores de ROI-(351nm) e ROI-(364nm), o qual indica o nível de cálcio citoplasmático de

cada corpo celular. Cada experimento foi realizado em triplicata independente sendo repetido por no mínimo 3 vezes.

2.7.2 Validação do método de análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}

Utilizando-se culturas de células do hipocampo não expostas à rotenona, realizou-se a incubação com Fura-2 conforme já descrito. Durante a visualização das células em cultura um campo foi escolhido ao acaso. Imagens confocais seriadas desse campo foram capturadas com intervalos fixos de 6,65 segundos durante o período de 113 segundos totalizando 18 imagens digitais.

Durante a captura das imagens aos 46 segundos (durante a captura da 8ª imagem) foi adicionado à placa 129mM de KCl, 0,1µM de thapsigargina, 80nM de PMA e 0,7nM de ionomicina diluídos em meio de cultura visando estimular o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e validar o método de análise desenvolvido para analisar os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} .

2.7.3 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após exposição momentânea à rotenona

Com o objetivo de observar se a rotenona exerce efeitos diretos e independentes da exposição crônica sobre os níveis citoplasmático de Ca^{2+} , culturas de células do hipocampo realizadas conforme protocolo já descrito foram empregadas visando analisar-se a exposição à rotenona nas concentrações de 1nM e 1µM que possivelmente induzem a morte celular, alterariam instantaneamente os níveis intracelulares de Ca^{2+} .

Os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} foram avaliados utilizando-se da marcação com a sonda fluorescente Fluo4 (Invitrogen) (emissão 530nm e excitação 488nm) que aumenta a intensidade de sua fluorescência emitida quando ligada ao Ca^{2+} . A marcação foi realizada incubando as células do hipocampo com 5 μM de fluo4 diluído em meio de cultura durante 1 hora em incubadora de CO_2 , após a incubação as células foram lavadas três vezes com meio de cultura sem a sonda e visualizadas em microscópio confocal.

Para realização das análises, imagens confocais seriadas foram capturadas com intervalos fixos de 1,79 segundos durante o período de 260 segundos totalizando 150 imagens e no 34º segundo (20ª imagem) as células foram expostas à rotenona diluída em meio de cultura nas concentrações descritas anteriormente.

As imagens seriadas confocais foram analisadas e quantificadas conforme já descrito considerando-se a intensidade da fluorescência emitida pela sonda. No entanto, a análise estatística foi realizada comparando somente os valores de ROI referentes aos primeiros 15 segundos posteriores à adição da rotenona.

2.7.4 Análise da possibilidade da exposição à rotenona potencializar o influxo induzido de Ca^{2+}

Culturas de células do locus coeruleus, hipocampo e substância negra foram empregadas visando analisar a possibilidade da exposição à rotenona, nas concentrações que induzem ou não a formação dos agregados proteicos, potencializar o influxo de cálcio após a depolarização neuronal induzida.

A exposição à rotenona e análise dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos foram realizados conforme protocolo já descrito, no entanto as imagens confocais seriadas foram capturadas com intervalos fixos de 4,64 segundos durante o período de 110 segundos totalizando 25 imagens e no 23º segundo (6ª imagem) as células foram expostas a solução contendo 129mM de KCl (Amresco), 0,1µM de thapsigargina (Sigma), 80nM de PMA (Sigma) e 0,7nM de ionomicina (Sigma), todos diluídos em meio de cultura, visando induzir a despolarização das células e consequentemente o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos.

As imagens confocais seriadas foram analisadas e quantificadas conforme já descrito, no entanto a análise estatística foi realizada comparando somente os valores de ROI referentes aos primeiros 10 segundos posteriores à adição da rotenona.

2.8 Análise da relação entre a proteína Miro e alterações do tráfego mitocondrial

2.8.1 Construção da proteína Miro mutante

Visando compreender-se a modulação promovida pela Miro via os domínios EF *hands*, influenciaria o tráfego e ancoramento mitocondrial em cultura de células exposta à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos os domínios EF *hands* da proteína Miro foram inativados.

Os sítios de mutação que extinguem a capacidade do Ca^{2+} ligar-se aos domínios EF *hands* da proteína Miro1 de ratos foram localizados utilizando-se das sequências nucleotídicas da proteína Miro1 de ratos depositadas na base

de dados GenBank™ *NM_001107026.2*, associado às análises genômicas e funcionais da proteína Miro1 humana descrita por Fransson *et al.* (2003; 2006).

A figura 6 ilustra o procedimento de alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios EF *hands* da proteína Miro1 de humanos com as proteínas Miro de ratos que permitiu a localização dos sítios a serem mutados nessa proteína com o intuito de inativar os domínios EF *hands*.

As mutações *missenses* selecionadas foram: E221K e E341K, o cDNA de ambas proteínas foi sintetizado (GeneArt®, Invitrogen) já contendo as alterações específicas para produção das proteínas mutantes.

2.8.2 Preparação dos clones e transfecção

Os cDNAs da proteína Miro1 foram clonados em vetor fluorescente pEGFP-C1. Foram desenhados primers com sequências específicas para a cDNA da proteína Miro1 (Sense GG GAATTC A ATG AGG GCC GGC AGA GTG / Anti-sense GG GGATCC TCA TCT CTG CTT CAG CAG AGC CC) contendo sítios de restrição e sítios de parada de leitura.

A técnica de PCR foi aplicada para fazer a amplificação das respectivas sequências, posteriormente aplicadas em gel agarose 0,8%, separadas e purificadas. Depois de purificadas, as sequências de cDNA foram inseridas no vetor pEGFP-C1 (Clontech), utilizando-se da complementariedade dos sítios de restrição apresentados nos sítios de clonagem múltiplas (SCM) dos vetores e das extremidades das sequências descritas a seguir.

Os plasmídios circulares e as sequências de cDNA a serem clonadas foram digeridos com duas enzimas de restrição, Eco-R1 e Bam-H1 (New England biolabs), e purificadas utilizando o kit de purificação (GE Life Science).

Posteriormente, as soluções foram misturadas com adição de ligase T4 (New England Biolabs) para ligar as sequências de cDNA aos vetores.

Os vetores foram então adicionados a uma solução contendo bactérias competentes (Oneshot MAX efficiency DH5 α TM, Invitrogen), transformadas por eletroporação e incubadas em meio LB durante 1 hora. A solução foi então plaqueada em placa de Petri contendo agar suplementado com 30 μ g/ml de Kanamicina (Invitrogen).

Após 24 horas de incubação, 5 colônias foram escolhidas e separadas em tubo estéril contendo 2ml de meio SOC e antibiótico e novamente incubadas por 24 horas à 37°C.

As bactérias foram então lisadas e o DNA dos vetores purificado (Kit QIAGEN). A verificação do sucesso da clonagem foi realizada via PCR e digestão enzimática com as enzimas previamente utilizadas, as colônias selecionadas foram transferidas para 1L de meio de crescimento 2XYT (10% Triptona, 5% de extrato de levedura em pó e 10% NaCl e incubadas por 24 horas sob agitação. O DNA plasmidial foi então extraído e purificado e quantificado, para ser transfectado nas culturas de células neuronais do hipocampo, locus coeruleus e substância negra.

A transfecção foi realizada utilizando-se dos vetores contendo as sequências para a proteína Miro 1, selvagem ou mutante, utilizando-se do reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) segundo o protocolo do fabricante.

2.8.3 Ensaio de co-localização das proteínas Miro 1 clonadas com mitocôndrias

As culturas de células do hipocampo após 9 dias de cultura foram transfectadas com 2000ng de DNA plasmidial contendo as sequências das proteína Miro1, selvagem ou mutante, junto a 1200ng de DNA do vetor DsRed Mito (Clontech) que sintetiza o fluorocromo DsRed fusionado à sequência sinal de importação mitocondrial, utilizado para detecção de mitocôndrias. Os DNAs foram diluídos em meio OPTI-MEN (Invitrogen) e posteriormente suplementados com Lipofectamina 2000 (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

Após 48 horas as células foram observadas em microscópio confocal visando observar se as proteínas Miro sintetizadas colocalizavam-se com as mitocôndrias existentes nas células cultivadas. A análise foi realizada após excitação a 488nm para GFP e 535nm para DsRed e coleta da emissão

individual a 520nm e 600nm, respectivamente. Utilizando microscópio confocal Zeiss LSM 780 Multifóton, invertido e motorizado, em câmara de aquecimento à 37°C acoplada a plataforma, com atmosfera constituída de 5% CO₂ e utilizando objetiva de 63x, equipamento disponível no centro de facilidade para pesquisa (CEFAP).

2.8.4 Análise da influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Miro

Os níveis de Miro foram analisados conforme o protocolo de Western Blot descrito anteriormente, utilizando proteínas extraídas de células expostas à rotenona nas concentrações de 0,3 e 0,5nM durante 48 horas.

As membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Miro 1 (HPA010687, Sigma) na concentração de 1/1000 durante 24 horas à 4°C, seguido pela incubação com o anticorpo secundário anti-coelho 1/10000 conjugado a HRP durante 1 hora em temperatura ambiente, foi utilizado para detecção de Miro. A marcação foi normalizada pela marcação com anti- β -Actina, conforme protocolo descrito.

2.9 Análise dos resultados

Os resultados referentes a avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo de estudo de parâmetros celulares antes da agregação proteica foram avaliados por análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey ou teste T de *Student*.

Os dados dos experimentos de análise do efeito dose-dependente e tempo-dependente da exposição à rotenona também foram avaliados pela

análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey, exceto os dados referentes ao efeito tempo-dependente da exposição à rotenona sobre o número de mitocôndrias, sendo estes avaliados pelo Teste t de *Student*.

O teste de correlação de Pearson foi empregado para a análise da correlação entre os dados referentes aos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e percentual de mitocôndrias móveis após a exposição à rotenona.

Todos os testes estatísticos utilizados foram acessados utilizando o programa *GraphPad Prism* para Windows (versão 5.0, *GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos por no mínimo duas vezes. Foi considerado o nível máximo de erro de 5% ($p < 0,05$) para considerar como significativa as diferenças dos resultados entre os grupos.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das culturas de células

Análise das culturas de células do hipocampo, locus coeruleus e substância negra demonstraram que 60%, 54% e 59% das células cultivadas são imunopositivas a MAP2, respectivamente, em relação ao percentual total de células, sendo estas consideradas neurônios (Tabela 2 e Figura 7A).

Em conjunto com esses dados, a identidade bioquímica das células do locus coeruleus e substância negra foi caracterizada pela expressão da enzima TH, essencial para síntese de catecolaminas. Essas culturas apresentaram 23% e 42% de células imunopositivas à TH, respectivamente, em relação ao percentual total de células (Tabela 2 e Figura 7B).

Tabela 2 - Caracterização das culturas de células do locus coeruleus, substância negra e hipocampo.

	<i>DAPI</i>	<i>% Células MAP2 positivas</i>	<i>% Células TH positivas</i>
Locus coeruleus	337	54	23
Substância negra	394	59	42
Hipocampo	222	60	-

Figura 7. Fotomicrografias ilustrando a imunoreatividade a MAP2 (A) em células do hipocampo (Hp), locus coeruleus (Lc) e substância negra (Sn) e Tirosina hidroxilase (TH) (B) em células do locus coeruleus e substância negra. Imagens capturadas na objetiva de 20X, escala 50 μ m. N =3 (placas para cada grupo) sendo as marcações repetidas no mínimo 2 vezes.

3.2 Exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros celulares que antecedem a formação dos agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração em cultura de células do hipocampo

3.2.1 Análise do percentual de morte celular após exposição a baixas concentrações de rotenona

Exposição a 0,3nM de rotenona por 48 horas não interfere na viabilidade celular demonstrada pela análise qualitativa utilizando o corante azul de tripan e quantitativa utilizando o percentual de redução de MTT, já que não houve diferença significativa em relação às células expostas ao DMSO (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografias ilustrando culturas de células do hipocampo exposta à DMSO ou 0,3nM de rotenona durante 48 horas e posteriormente coradas com azul de tripan (A), as setas ilustram células permeáveis ao azul de tripan. Imagens capturadas

na objetiva de 10X, Escala 1000 μ m. N=3 (placas para cada grupo) sendo as marcações repetidas no mínimo 2 vezes. Quantificação do percentual de redução do MTT em culturas de células do hipocampo exposta à rotenona em diferentes concentrações e tempos de exposição (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D, N=3 sendo que cada grupo possui 6 independentes análises. Utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos.

3.2.2 Influência da exposição à rotenona sobre os níveis de Tau

hiperfosforilada e sua agregação

A exposição à 0,3 ou 0,5nM de rotenona induziu a elevação dos níveis de Tau hiperfosforilada de maneira similar, aproximadamente 40%, em relação a exposição ao DMSO (Figura 9A). No entanto, quando avaliados os níveis de Tau hiperfosforilada em relação aos níveis de Tau total observa-se que a exposição a 0,3nM de rotenona induziu o aumento de 60% nos níveis de Tau hiperfosforilada, enquanto a exposição à 0,5nM de rotenona induziu o aumento de 20%, ambos em relação ao DMSO (Figura 9B).

Com base nos resultados obtidos referente ao aumento dos níveis de Tau após a exposição à 0,3nM de rotenona durante 48 horas, a formação de agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada foi avaliada através de ensaio imunocitoquímico. Esta análise demonstrou primeiramente que a exposição à rotenona em todas as concentrações analisadas induziu o aumento da imunorreatividade a proteína Tau hiperfosforilada (Figura 10), corroborando os resultados analisando os níveis de Tau hiperfosforilada por western blot.

Figura 9. Níveis de Tau hiperfosforilada (A) e de Tau hiperfosforilada em relação a Tau total (B) em culturas de células do hipocampo exposta a DMSO, 0,3 e 0,5nM de rotenona durante 48 horas. Os dados representam a junção de experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (A) e percentagem do controle (DMSO) (B) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em relação as células expostas ao DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

A exposição à rotenona também induziu o aumento das marcações de Tau hiperfosforilada nos corpos celulares neuronais, conforme o aumento observado na co-localização das marcações de Tau e MAP2, e induziu o aparecimento de agregados citoplasmáticos em neurônios e células gliais. No entanto, estas alterações só foram observadas em células expostas à rotenona nas concentrações de 0,5 e 1nM (Figura 10).

Logo, a exposição a 0,3nM de rotenona foi efetiva em induzir o aumento dos níveis de Tau hiperfosforilada, independente da formação de agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada (Figura 10). Nós estendermos esses resultados ao avaliarmos os níveis de Tau total na fração proteica insolúvel, devido ao fato de que Tau quando agregada torna-se insolúvel, em culturas expostas à rotenona.

Após a exposição à rotenona não foram observadas alterações significativas nos níveis de Tau total na fração proteica insolúvel das células expostas à 0,3nM de rotenona, porém houve o aumento de 40% nos níveis de Tau em relação ao DMSO, nas culturas expostas à 0,5nM de rotenona durante 48 horas, corroborando os resultados obtidos nas análises anteriores (Figura 11).

Figura 10. Fotomicrografias representativas ilustrando células do hipocampo expostas à 0,3, 0,5 e 1nM de rotenona ou DMSO durante 48 horas marcadas com anticorpos anti-Tau hiperfosforilada (Tau-p) anti-MAP2 e DAPI. Ao lado das sobreposições das marcações obtidas são demonstradas ampliações das áreas demarcadas. Setas ilustram marcação imunopositiva para Tau hiperfosforilada no corpo celular de neurônios e cabeças de setas para marcações imunopositiva para Tau hiperfosforilada em células gliais. Imagens capturadas na objetiva de 20X, Escala 50µm. N=3 (placas para cada grupo) sendo as marcações repetidas no mínimo 2 vezes.

Figura 11. Níveis de Tau total na fração proteica insolúvel em culturas de células do hipocampo exposta à rotenona em diferentes concentrações e tempos de exposição. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como porcentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ em relação as células expostas a DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Os resultados obtidos potencializam a possibilidade da exposição à 0,3nM de rotenona ser utilizada para realização de análises celulares anteriores à formação dos agregados proteicos. No entanto, faz-se necessário avaliar se agregação proteica seria induzida após o aumento do tempo de exposição à rotenona, justificando o uso desse protocolo experimental.

Então, para avaliar esta questão, as células foram expostas à 0,3nM de rotenona durante 72 horas. As análises anteriores demonstraram que este protocolo de exposição não induz morte celular significativa em relação ao controle (Figura 8B). Em relação aos níveis de Tau hiperfosforilada a exposição à 0,3nM durante 72 horas induziu aumento de 50% nos níveis de Tau normalizado pela marcação com β -Actina, e 10% nos níveis de Tau hiperfosforilada quando normalizados por Tau total (Figura 12).

Figura 12. Níveis de Tau hiperfosforilada (A) e de Tau hiperfosforilada em relação a Tau total (B) em culturas de células do hipocampo exposta a DMSO e 0,3nM de rotenona durante 72 horas. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (A) e percentagem do controle (DMSO) (B) $\pm$ S.D. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação as células expostas a DMSO, de acordo com o teste T de *Student*. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

A análise por imunocitoquímica das células exposta à 0,3nM de rotenona durante 72 horas, demonstrou que a exposição à rotenona induziu o aumento da imunorreatividade à Tau hiperfosforilada e a formação de agregados proteicos citoplasmáticos em neurônios e células gliais (Figura 13), mimetizando as alterações induzidas pela exposição à 0,5nM de rotenona por 48 horas.

Desta maneira os resultados obtidos nessa sessão demonstram que a exposição à 0,3nM de rotenona por 48 horas induz o aumento da hiperfosforilação de Tau, a primeira disfunção relacionada com a formação de agregados proteicos. Porém a exposição durante 48 horas não induz a formação de agregados, sendo necessário 72 horas de exposição para que agregação ocorra.

Figura 13. Fotomicrografias representativas ilustrando células do hipocampo expostas à 0,3nM de rotenona ou DMSO durante 72 horas marcadas com anticorpos anti-Tau hiperfosforilada (Tau-p) anti-MAP2 e DAPI. Ao lado da sobreposição das marcações obtidas são demonstradas ampliações das áreas demarcadas. Setas ilustram marcação imunopositiva para Tau hiperfosforilada no corpo celular de neurônios e cabeças de setas para marcações imunopositiva para Tau hiperfosforilada em células gliais. Imagens capturadas na objetiva de 20X, Escala 50µm. N=3 (placas para cada grupo) sendo as marcações repetidas no mínimo 2 vezes.

3.2.3 Atividade proteolítica proteassomal encontra-se diminuída antes e durante a agregação proteica

A disfunção do sistema ubiquitina proteossoma é relatada em diversas doenças neurodegenerativas (Lim e Tan, 2007) e sugere-se sua relação com a patofisiologia das doenças neurodegenerativas uma vez que os agregados proteicos apresentam extensa ubiquitinação (Mcnaught, Perl *et al.*, 2004) ilustrando a sinalização para degradação destes.

A análise da atividade quimiotripsínica proteassomal demonstrou que exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas induziu a redução da atividade proteossomal em 20% e 30%, respectivamente (Figura 14). Resultado que

potencializa a utilização da exposição à 0,3nM de rotenona por 48 horas, demonstrando redução da atividade proteossomal antes e durante a agregação proteica.

Figura 14. Análise da atividade quimi tripsínica proteossomal em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ e em relação as células expostas a DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas

3.2.4. O fluxo autofágico diminui nos momentos que antecedem a agregação proteica

Disfunções no processo de autofagia são citadas em diversas doenças neurodegenerativas (Menzies, Fleming *et al.*, 2015), e a modulação da autofagia é sugerida como possível terapia celular (Polajnar e Žerovnik, 2014).

A análise do processo de autofagia utilizando-se da expressão de LC3-EGFP-mCherry nas células expostas à rotenona demonstrou inicialmente que à exposição à 0,3nM de rotenona por 48 horas eleva em 140% o número de autofagolisossomos por célula (Figura 15A), em relação ao controle. A exposição à 0,5nM de rotenona não induziu alterações no número de autofagolisossomos (Figura 15A). O aumento do número de autofagolisossomos sugere a redução do processo de autofagia uma vez que os autofagolisossomos são os compartimentos de efetiva degradação no processo de autofagia.

Para a análise do dinamismo associado ao processo de autofagia, analisou-se o fluxo autofágico nas células expostas à rotenona. A exposição a 0,3nM de rotenona diminuiu o fluxo autofágico em 30% (Figura 15B), corroborando o aumento do número de autofagolisossomos encontrado na análise anterior. Em relação as culturas expostas à 0,5nM de rotenona, o fluxo autofágico aumentou em cerca de 60% (Figura 15B), em relação ao controle, sugerindo a indução do processo de autofagia durante a formação dos agregados proteicos, e não antes da presença das inclusões proteicas.

3.2.5. A homeostase Redox está prejudicada antes da formação de agregados proteicos

O sistema Redox é essencial para manutenção da homeostase celular, e atua mantendo o balanço entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS).

Figura 15. Análise do fluxo autofágico utilizando LC3-EGFP-mCherry em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas. Quantificação do número de vesículas expressando mCherry (A). Quantificação do fluxo autofágico (B). Fotomicrografias representativas de células expressando LC3-EGFP-mCherry (C). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação as células expostas à DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 10 μ m.

A disfunção no sistema Redox já foi descrita em diversas doenças neurodegenerativas, evidenciando a importância desses processos na neurodegeneração (Kovacic e Somanathan, 2012). As análises dos níveis de ROS, proteína carboniladas e H₂O₂ foram realizadas com o intuito de verificar a influência da exposição à rotenona sobre a homeostase Redox na presença e ausência dos agregados proteicos.

Os níveis de ROS, medidos utilizando CM-H₂DCFDA, elevaram-se em 35% após exposição à 0,3nM de rotenona, em relação ao controle. No entanto,

não houve diferença nos níveis de ROS nas células expostas à 0,5nM de rotenona, quando já há presença de agregados proteicos (Figura 16).

Figura 16. Análise dos níveis de ROS utilizando CM-H₂DCFDA em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3 ou 0,5nM de rotenona ou DMSO por 48 horas. Fotomicrografias das culturas expostas à rotenona e marcadas com CM-H₂DCFDA (A) Quantificação da intensidade de fluorescência de CM-H₂DCFDA (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$ em relação as células expostas à DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 50 μ m.

Esses dados foram suplementados com a análise dos níveis de proteínas carboniladas, os quais apresentaram-se aumentados em 35% após a exposição à 0,3nM de rotenona, em relação ao controle. Novamente não foi observada alteração em células expostas à 0,5nM de rotenona (Figura 17). As alterações obtidas são similares às encontradas utilizando CM-H₂DCFDA, sugerindo um

cenário onde alterações na homeostase redox ocorrem somente antes da formação dos agregados proteicos.

Figura 17. Níveis de proteínas carboniladas em culturas de células do hipocampo expostas à 0,3, 0,5nM de rotenona e DMSO durante 48h. Quantificação dos níveis de proteínas carboniladas totais. A área delimitada em vermelho ilustra a faixa de peso molecular (kDa) considerada para quantificação em cada poço. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ em relação as células expostas a DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Com o intuito de verificar se as disfunções na homeostase redox estariam realmente confinadas somente ao período anterior à formação dos agregados proteicos, dois experimentos foram realizados: no primeiro, analisou-se os níveis de H_2O_2 após exposição a rotenona nas diferentes concentrações por 48 horas, e no segundo foi realizado novo experimento utilizando CM- H_2 DCFDA para verificar os níveis de ROS antes e durante agregação proteica, utilizando a exposição à 0,3nM de rotenona durante 48 e 72 horas.

A exposição à 0,3nM de rotenona induziu o a acréscimo de 30% nos níveis H_2O_2 , em relação ao controle, novamente não foram observadas alterações significativas nas culturas de células expostas à 0,5nM de rotenona (Figura 18). Novamente a análise de ROS empregando CM- H_2 DCFDA demonstrou a capacidade da exposição à 0,3nM de rotenona por 48 horas elevar os níveis de ROS em 30%, em relação ao seu controle (Figura 19). No entanto, após 72 horas à exposição à 0,3nM de rotenona houve redução de 30% nos níveis de ROS em relação ao controle (Figura 19).

Figura 18. Níveis de peróxido de hidrogênio em culturas de células hipocampo exposta à 0,3, 0,5nM de rotenona e DMSO durante 48h. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. ** $p < 0,01$ em relação as células expostas ao DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Figura 19. Fotomicrografias das culturas de células do hipocampo expostas a 0,3nM de rotenona ou DMSO por 48 e 72 horas e marcadas com CM-H₂DCFDA (A) Quantificação da intensidade de fluorescência de CM-H₂DCFDA (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$ em relação as células expostas à DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 50 μ m.

Logo, reforça-se a hipótese de disfunção na homeostase Redox antes da formação dos agregados proteicos induzido pela exposição à rotenona, além de sugerir que após a formação dos agregados proteicos ocorre a normalização dos níveis de ROS. A figura 20 sumariza as disfunções identificadas após a exposição à rotenona nas concentrações de 0,3nM ou 0,5nM durante 48 horas.

Figura 20. Resumo das alterações nos níveis de Tau hiperfosforilada, H_2O_2 , carbonilação de proteínas, atividade proteassomal e do fluxo autofágico, observadas em culturas de células do hipocampo após a exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas. As setas em vermelho ilustram parâmetros que foram modificados após a exposição à rotenona, em relação ao controle. As cruzes em preto ilustram parâmetros celulares que não sofreram alterações após a exposição à rotenona.

3.3 Validação dos métodos de análise da mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+}

A metodologia utilizada foi validada ao demonstrar que é possível visualização e distinção das mitocôndrias distribuídas nos corpos celulares e prolongamentos das células em cultura (Figura 21A), e que as mitocôndrias marcadas movimentam-se ao longo dos prolongamentos celulares permitindo a visualização da dinâmica de transporte mitocondrial, incluído o trajeto e direção do transporte (Figura 21B e 21C). Logo, a metodologia utilizada permite a obtenção dos parâmetros necessários para quantificação da percentagem de mitocôndrias móveis e estáticas nos neurônios cultivados (Figura 21D).

No segundo momento, a metodologia descrita para análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} foi validada ao demonstrar que o *probe* permite a visualização dos corpos celulares e prolongamentos das células em cultura, bem como apresenta aumento da fluorescência emitida quando o influxo de Ca^{2+} é estimulado (Figura 22). A capacidade da rotenona induzir o influxo de Ca^{2+} foi também analisada, para isso as células foram expostas a 1nM e 1 μ M de rotenona durante análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . A exposição à rotenona em nenhuma das concentrações utilizadas induziu o influxo de Ca^{2+} imediatamente após aplicação (Figura 23).

Figura 21. Fotomicrografias ilustrando culturas de células do hipocampo marcadas com mitotracker (A), a seta ilustra aglomerados de corpos celulares de neurônios onde possivelmente origina-se o processo demarcado. Em (B) tem-se imagens seriadas do campo em destaque na figura (A), as setas identificam a posição da mesma mitocôndria durante o intervalo de captura das imagens. Em (C) tem-se a representação o tráfego mitocondrial, por quimógrafo, das imagens seriadas ilustradas na figura 1B, a seta ilustra a mesma mitocôndria selecionada (B), variações no plano horizontal das linhas ilustram movimentação mitocondrial. A quantificação das imagens seriadas foi feita através do plugin Difference tracker (D). Imagens capturadas na objetiva de 63X, escala 10µm.

Figura 22. Fotomicrografias seriadas ilustrando a sobreposição das imagens obtidas pela marcação com Fura 2 em culturas de células do hipocampo, a emissão da sonda acoplada ao cálcio está em verde e a sonda não acoplada ao cálcio é vermelha, ao longo do tempo. Em torno dos 46 segundos de análise as células foram expostas ao agente despolarizador composto por: 129mM de KCl, 0,1 μ M de Thapsigargina, 80nM de PMA e 0,7nM de Ionomicina (+Sol.). Imagens capturadas na objetiva de 40X, escala 50 μ m.

Figura 23. Monitoramento da intensidade da fluorescência emitida por Fluo 4 em células de células do hipocampo controles exposta a 1nM e 1µM de rotenona aos 20 segundos (linha tracejada no gráfico). A análise estatística foi realizada comparando-se a intensidade emitida pelas células analisadas referentes aos primeiros 15 segundos posteriores à adição da rotenona. Os dados são demonstrados como percentagem do controle (Meio) $\pm$ S.D. n.s= sem diferença significativa.

3.4 Análise da mobilidade mitocondrial em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados

3.4.1 Culturas de células do hipocampo

A análise qualitativa da distribuição das mitocôndrias nas células expostas à rotenona ou DMSO por 48 horas, não demonstrou acúmulos anormais das mitocôndrias no corpo celular ou prolongamentos dos neurônios (Figura 24A), o que poderia sugerir o déficit no transporte mitocondrial. O número relativo de mitocôndrias também não se mostrou ser influenciado pela a exposição à rotenona (Figura 24).

A percentagem de mitocôndrias móveis e estáticas não se alterou após a exposição a 0,3 e 0,5nM de rotenona durante 48 horas (Figura 24C e D). No entanto, a exposição a ambas concentrações de rotenona promoveu aumento significativo em 60% e 30%, nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em células expostas a 0,3 e 0,5nM de rotenona, respectivamente (Figura 24E e 24F).

Visando obter evidências sobre a possível influência do mecanismo de inibição do transporte mitocondrial via Miro, sobre o transporte mitocondrial antes

e durante a formação dos agregados proteicos, a análise de correlação entre as alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos e os percentual de mitocôndrias móveis foi verificada. Como sugerido pelos resultados obtidos não observamos correlações significativas entre os dados referentes à mobilidade mitocondrial e níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos antes e durante a formação dos agregados proteicos (Tabela 3).

A análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} foi realizada após a despolarização induzida a fim de observar se além de promover a disfunção dos níveis de Ca^{2+} , a exposição à rotenona também influenciaria o influxo de Ca^{2+} após a despolarização. Os resultados demonstraram que a exposição à 0,3nM de rotenona não altera o influxo de Ca^{2+} , porém a exposição à 0,5nM induz o aumento de 44% nos níveis de Ca^{2+} nas células após a despolarização, em relação ao controle (Figura 24G).

Utilizando então a exposição à 0,3nM de rotenona em diferentes intervalos, 24, 48 e 72 horas, que também permite a análise de parâmetro antes e durante a formação dos agregados proteicos conforme os resultados obtidos anteriormente, foram realizadas novamente as análises de mobilidade mitocondrial e quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos, porém contextualizando a influência temporal da formação dos agregados proteicos sobre estes parâmetros. Como nos testes anteriores, a exposição à rotenona não alterou a distribuição mitocondrial ou o número de mitocôndrias, em relação aos controles (Figura 25).

Figura 24. Fotomicrografias de células do hipocampo expostas a DMSO ou rotenona e marcadas com mitotracker, (A). Quantificação do número total de mitocôndrias per 1000px (B), percentual de mitocôndrias móveis (C) e estáticas (D) após a exposição à rotenona. Fotomicrografias de células do hipocampo marcadas com fura-2, demonstrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho), após a exposição à rotenona ou DMSO (E). Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após exposição à rotenona ou DMSO por 48 horas (F). Monitoramento da intensidade da fluorescência Fura-2 340/380 nas células exposta a DMSO ou rotenona durante 48 horas e posteriormente despolarizadas (+ Sol.) após o 24º segundo de análise (linha tracejada no gráfico) (G). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, C e D) e percentagem do controle (DMSO) (F e G) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO. ### $p < 0,001$ em relação às células expostas a 0,3nM de rotenona de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20µm (A) e 50µm (E). N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Tabela 3 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>	<i>0,5nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,5nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		0,1134603	* 0,3470857	0,3553928	-0,09729332	0,1460954
DMSO – Móveis	0,1134603		-0,09334373	0,5224059	0,05811989	** 0,8283891
0,3nM - Ca^{2+}	* 0,3470857	-0,09334373		-0,142671	-0,191653	0,0450082
0,3nM - Móveis	0,3553928	0,5224059	-0,142671		0,01632398	0,5209564
0,5nM - Ca^{2+}	-0,09729332	0,05811989	-0,191653	0,01632398		0,1263868
0,5nM - Móveis	0,1460954	** 0,8283891	0,0450082	0,5209564	0,1263868	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ de acordo com o teste de correlação de Pearson.

A contextualização da influência temporal da exposição da rotenona antes e durante a formação dos agregados proteicos, demonstrou que inicialmente a exposição à rotenona induz a diminuição de 25% no percentual de mitocôndrias móveis (24 horas), sendo que posteriormente o transporte mitocondrial normaliza-se (48 horas) durante a formação dos agregados proteicos e após a formação dos agregados aumenta em 30% (72 horas) (Figura 25E e F).

Referente aos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após 24 horas de exposição à rotenona ocorre a diminuição em 20% dos níveis de Ca^{2+} , os quais posteriormente elevam-se 60% e 20%, em relação ao controle, respectivamente antes e durante a formação dos agregados proteicos (Figura 25I). No entanto, os dados obtidos referente à mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após a exposição à rotenona durante 24 e 72 horas não demonstraram correlação significativa (Tabela 4 e 5, respectivamente).

Figura 25. Fotomicrografias de células do hipocampo expostas à 0,3nM de rotenona ou DMSO por 24 horas e marcadas com mitotracker (A) e quantificação do número total de mitocôndrias per 1000px nessas culturas (B). Células expostas à 0,3nM de rotenona por 72 horas à rotenona (C) e quantificação do número total de mitocôndrias (D). Percentual

de mitocôndrias móveis (E) e estáticas (F) nas culturas de células expostas à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas. Fotomicrografias de células do hipocampo marcadas com fura-2 ilustrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho) após exposição à rotenona ou DMSO durante 24 (G) ou 72 horas (H). Quantificação dos níveis de cálcio citoplasmático após a exposição à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas (I). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, D, E e F) e percentagem do controle (DMSO) (I) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20 μ m (A e C) e 50 μ m (G e H).

Tabela 4 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		-0,09423369	-0,3179706	-0,3008434
DMSO - Móveis	-0,09423369		0,5615054	0,1540784
0,3nM - Ca^{2+}	-0,3179706	0,5615054		0,07675577
0,3nM - Móveis	-0,3008434	0,1540784	0,07675577	

Não foram obtidos valores significativos de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Tabela 5 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do hipocampo expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		0,02261927	0,04074669	0,03822395
DMSO - Móveis	0,02261927		-0,7339198	0,5759587
0,3nM - Ca^{2+}	0,04074669	-0,7339198		-0,3170276
0,3nM - Móveis	0,03822395	0,5759587	-0,3170276	

Não foram obtidos valores significativos de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Logo, com base nos resultados obtidos nessa sessão, resumidos na figura 26, observa-se que a mobilidade mitocondrial diminuiu antes mesmo do período denominado pelas nossas análises como antes da agregação proteica, normalizando-se antes da formação dos agregados e aumenta após a formação dos agregados proteicos. Os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} parecem não se correlacionar ao tráfego mitocondrial, já que as elevações observadas não induziram o decréscimo do transporte mitocondrial.

3.4.2 Culturas de células do locus coeruleus

A exposição à 0,3 ou 0,5nM de rotenona por 48 horas não modificou a distribuição das mitocôndrias (Figura 27A) ou o número total destas em relação ao controle (Figura 27B). A mobilidade mitocondrial após a exposição à 0,3 ou 0,5nM de rotenona por 48 horas também não foi alterada (Figura 27D e E). Em relação aos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , somente a exposição à 0,5nM de rotenona durante 48 horas, alterou os níveis Ca^{2+} , aumentando-os em 20% (Figura 27F). No entanto, novamente os dados referentes à mobilidade mitocondrial e níveis de Ca^{2+} antes e durante a formação dos agregados proteicos não apresentaram correlação estatística significativa, sugerindo independência de ambos os processos (Tabela 6).

Análise do influxo Ca^{2+} após a exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas não demonstrou alterações significativas nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos induzidos pela despolarização (Figura 27G).

A

B

Figura 26. Resumo dos resultados obtidos em culturas de células do hipocampo antes e durante a agregação proteica (A). Ilustrações demonstrando como alterações na mobilidade mitocondrial e nos níveis de Ca²⁺ ocorrem durante a formação dos agregados proteicos com base nos resultados obtidos pela exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas (B).

Figura 27. Fotomicrografias representativas de células do locus coeruleus expostas a DMSO ou rotenona e marcadas com mitotracker, (A). Quantificação do número total de mitocôndrias *per* 1000px (B), percentual de mitocôndrias móveis (C) e estáticas (D) após a exposição à rotenona. Fotomicrografias de células do locus coeruleus marcadas com fura-2, demonstrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho), após exposição à rotenona ou DMSO (E). Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após a exposição à rotenona ou DMSO por 48 horas (F). Monitoramento da intensidade da fluorescência Fura-2 340/380 nas células exposta a DMSO ou rotenona durante 48 horas e posteriormente despolarizadas (+ Sol.) após o 24º segundo de análise (linha tracejada no gráfico) (G). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, C e D) e percentagem do controle (DMSO) (F e G) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20 μm (A) e 50 μm (E). N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Tabela 6 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>	<i>0,5nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,5nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		-0,1712228	-0,1589378	-0,008355218	*-0,36584	-0,3738197
DMSO - Móveis	-0,1712228		0,3430883	-0,08065622	0,402294	0,5294446
0,3nM - Ca^{2+}	-0,1589378	0,3430883		-0,09329244	** -0,383802	0,4802313
0,3nM - Móveis	-0,008355218	-0,08065622	-0,09329244		0,3927282	-0,03007569
0,5nM - Ca^{2+}	*-0,36584	0,402294	** -0,383802	0,3927282		-0,1408229
0,5nM - Móveis	-0,3738197	0,5294446	0,4802313	-0,03007569	-0,1408229	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ de acordo com o teste de correlação de Pearson.

A exposição à 0,3nM de rotenona durante 24 horas não alterou a distribuição das mitocôndria no corpo celular e prolongamentos das células analisadas (Figura 28A), no entanto induziu diminuição, significativa, de 20% do número relativo de mitocôndrias em comparação as células exposta ao DMSO (Figura 28B). Da mesma forma, exposição à rotenona por 72 horas, não influenciou a distribuição mitocondrial nos neurônios analisados (Figura 28C), porém induziu alteração significativa no número relativo de mitocôndrias (Figura 28D).

A análise da mobilidade mitocondrial associada à cinética da formação dos agregados sugere que, tanto antes quanto durante a formação dos agregados proteicos, não ocorrem alterações na mobilidade mitocondrial em culturas de células do locus coeruleus, embora nos momentos iniciais (24 horas) ocorra o aumento de 10% na mobilidade mitocondrial a qual posteriormente

normaliza-se (48 e 72 horas) (Figura 28E e F). Em relação aos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} inicialmente observa-se aumento de 36% o qual normaliza-se antes da formação, mas após a formação dos agregados proteicos há um decréscimo em 16% (Figura 28I). Não foram encontradas correlações significativas entre mobilidade mitocondrial e concentração de cálcio, após a exposição durante 24 (Tabela 7) ou 72 horas (Tabela 8).

Com base nos resultados obtidos nessa sessão, resumidos na figura 29, tem-se que a mobilidade mitocondrial aumenta no período anterior ao denominado antes da formação dos agregados proteicos. No entanto, antes e durante a formação dos agregados proteicos não ocorrem alterações na mobilidade mitocondrial. Os níveis de Ca^{2+} aparentam estar elevados em ambos os cenários, porém não induzem o decréscimo do transporte mitocondrial.

3.4.3 Culturas de células da substância negra

A exposição à 0,3 ou 0,5nM de rotenona durante 48 horas não induziu a agregação ou redistribuição das mitocôndrias nas células analisadas (Figura 30A), bem como não induziu modificações significativas sobre o número relativo de mitocôndrias (Figura 30B). Referente à mobilidade mitocondrial a exposição à rotenona, induziu o aumento significativo de 3% e diminuição significativa de 5% do percentual de mitocôndrias móveis em relação ao controle, nas culturas expostas respectivamente à 0,3 ou 0,5nM durante 48 horas (Figura 30C).

A análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após a exposição à rotenona durante 48 horas, diferente da análise da mobilidade mitocondrial, demonstrou que somente a exposição à 0,3nM de rotenona altera os níveis Ca^{2+} , induzindo decréscimo de 13% (Figura 30F). Porém, não foi encontrada correlação

significativa entre mobilidade mitocondrial e as alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos (Tabela 9).

O monitoramento dos níveis de Ca^{2+} , após a despolarização induzida, nas células expostas à rotenona nas concentrações de 0,3 e 0,5nM durante 48 horas demonstrou que o influxo Ca^{2+} aumentou significativamente em 12% e 28%, respectivamente (Figura 30G).

Os dados referentes a curva temporal, demonstraram que após a exposição à 0,3nM de rotenona durante 24 horas ocorre aumento de 20% destas organelas (Figura 31A e 31B). No entanto, após 72 horas de exposição à 0,3nM de rotenona não foram observadas modificações (Figura 31C e 31D).

Em conjunto aos dados obtidos através da exposição à rotenona durante 48 horas pode-se observar o padrão temporal da agregação proteica sobre o percentual de mitocôndrias móveis. Inicialmente ocorre diminuição de 4% da mobilidade mitocondrial, seguida pelo aumento da mobilidade no período antes da formação dos agregados proteicos (3%) e durante a formação dos agregados a mobilidade mitocondrial diminui novamente em 10%. Os níveis de Ca^{2+} , inicialmente aumentam (9%) porém antes e durante a formação dos agregados proteicos descresem em gradativamente em 3% e 10%, respectivamente (Figura 31).

Figura 28. Fotomicrografias de células do locus coeruleus expostas à 0,3nM de rotenona ou DMSO por 24 horas e marcadas com mitotracker (A) e quantificação do número total de mitocôndrias per 1000px nessas culturas (B). Células expostas à 0,3nM de rotenona por 72 horas à rotenona (C) e quantificação do número total de mitocôndrias (D). Percentual de mitocôndrias móveis (E) e estáticas (F) nas culturas de células expostas à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas. Fotomicrografias de células do locus coeruleus marcadas com fura-2 ilustrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho) após exposição à rotenona ou DMSO durante 24 (G) ou 72 horas (H). Quantificação dos níveis de cálcio citoplasmático

após a exposição à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas (I). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, D, E e F) e percentagem do controle (DMSO) (I) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA). N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20 μ m (A e C) e 50 μ m (G e H).

Tabela 7 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		* 0,9659102	0,2107225	0,2869816
DMSO - Móveis	* 0,9659102		-0,1529332	-0,07768241
0.3nM - Ca^{2+}	0,2107225	-0,1529332		0,13517
0.3nM - Móveis	0,2869816	-0,07768241	0,13517	

* $p < 0,05$ de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Tabela 8 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células do locus coeruleus expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		-0,4693924	0,2728663	-0,7581827
DMSO - Móveis	-0,4693924		* -0,9480839	0,4288098
0.3nM - Ca^{2+}	0,2728663	* -0,9480839		-0,7034959
0.3nM - Movéis	-0,7581827	0,4288098	-0,7034959	

* $p < 0,05$ de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Figura 29. Resumo dos resultados obtidos em culturas de células do locus coeruleus antes e durante a agregação proteica (A). Ilustrações demonstrando como alterações na mobilidade mitocondrial e nos níveis de Ca^{2+} ocorrem durante a formação dos agregados proteicos com base nos resultados obtidos pela exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas (B).

Figura 30. Fotomicrografias de células da substância negra expostas a DMSO ou rotenona e marcadas com mitotracker, (A). Quantificação do número total de mitocôndrias per 1000px (B), percentual de mitocôndrias móveis (C) e estáticas (D) após a exposição à rotenona. Fotomicrografias de células da substância negra marcadas com fura-2, demonstrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho), após exposição à rotenona ou DMSO (E). Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após exposição à rotenona ou DMSO por 48 horas (F). Monitoramento da intensidade da fluorescência Fura-2 340/380 nas células exposta a DMSO ou rotenona durante 48 horas e posteriormente despolarizadas (+ Sol.) após o 24º segundo de análise (linha tracejada no gráfico) (G). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, C e D) e percentagem do controle (DMSO) (F e G) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20µm (A) e 50µm (E). N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Tabela 9 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da Substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 48 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>	<i>0,5nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,5nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		0,152125	0,2426538	0,03697047	** 0,57658	-0,2337871
DMSO - Móveis	0,152125		* 0,9780214	-0,6537185	0,4749001	-0,7612695
0,3nM - Ca^{2+}	0,2426538	* 0,9780214		-0,2663654	-0,03496489	0,2253056
0,3nM - Móveis	0,03697047	-0,6537185	-0,2663654		-0,5899072	-0,2090692
0,5nM - Ca^{2+}	** 0,57658	0,4749001	-0,03496489	-0,5899072		-0,5053328
0,5nM - Móveis	-0,2337871	-0,7612695	0,2253056	-0,2090692	-0,5053328	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Embora a rotenona tenha influenciado de maneira contrária os níveis de Ca^{2+} em relação ao percentual de mitocôndrias móveis em alguns dos nossos grupos experimentais, os dados obtidos não apresentaram correlação estatística significativa (Tabela 10 e 11).

Os resultados obtidos nessa sessão, resumidos na figura 32, ilustram que a mobilidade mitocondrial está alterada antes e durante a formação dos agregados proteicos. Sendo que antes da formação dos agregados proteicos, os níveis de Ca^{2+} diminuem concomitantemente com o aumento da mobilidade mitocondrial, após a formação dos agregados ocorre a diminuição do transporte mitocondrial, porém não foram encontradas modificações nos níveis de Ca^{2+} .

Figura 31. Fotomicrografias de células substância negra expostas à 0,3nM de rotenona ou DMSO por 24 horas e marcadas com mitotracker (A) e quantificação do número total de mitocôndrias per 1000px nessas culturas (B). Células expostas à 0,3nM de rotenona por 72 horas à rotenona (C) e quantificação do número total de mitocôndrias (D). Percentual de mitocôndrias móveis (E) e estáticas (F) nas culturas de células expostas à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas. Fotomicrografias de células da substância negra marcadas com fura-2 ilustrando a sobreposição das imagens obtidas com a excitação de 351nm (verde) e 364nm (vermelho) após exposição à rotenona ou

DMSO durante 24 (G) ou 72 horas (H). Quantificação dos níveis de cálcio citoplasmático após a exposição à 0,3nM de rotenona durante 24, 48 e 72 horas (I). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como unidades arbitrárias (B, D, E e F) e percentagem do controle (DMSO) (I) $\pm$ S.D. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação às células expostas ao DMSO de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes. Escala = 20 μ m (A e C) e 50 μ m (G e H).

Tabela 10 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da Substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 24 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		0,05727173	-0,028486	-0,009699644
DMSO - Móveis	0,05727173		0,8922285	-0,5510538
0.3nM - Ca^{2+}	-0,028486	0,8922285		-0,4669183
0.3nM - Móveis	-0,009699644	-0,5510538	-0,4669183	

Não foram obtidos valores significativos de acordo com o teste de correlação de Pearson.

Tabela 11 – Matriz de correlação entre os dados brutos do percentual de mitocôndrias móveis e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em culturas de células da Substância negra expostas à rotenona ou DMSO durante 72 horas.

	<i>DMSO - Ca^{2+}</i>	<i>DMSO - Móveis</i>	<i>0,3nM - Ca^{2+}</i>	<i>0,3nM - Móveis</i>
DMSO - Ca^{2+}		0,4252912	0,2701701	0,04411766
DMSO - Móveis	0,4252912		-0,1456974	-0,6681479
0,3nM - Ca^{2+}	0,2701701	-0,1456974		-0,7076836
0,3nM - Móveis	0,04411766	-0,6681479	-0,7076836	

Não foram obtidos valores significativos de acordo com o teste de correlação de Pearson.

A

B

Figura 32. Resumo dos resultados obtidos em culturas de células da substância negra na mobilidade mitocondrial e nos níveis de Ca^{2+} ocorrem durante a formação dos agregados proteicos com base nos resultados obtidos pela exposição à 0,3 e 0,5nM de rotenona por 48 horas (B).

3.5 Análise da relação entre a proteína Miro e alterações do tráfego mitocondrial

3.5.1 Ensaio de co-localização das proteínas Miro 1 clonadas com mitocôndrias em culturas de células do hipocampo

A transfecção dos vetores expressando as sequências das proteínas Miro1, selvagem e mutante, e DsRed Mito, demonstraram que as Miro sintetizadas têm distribuição normal no corpo celular e prolongamentos neuronais encontrando-se co-localizada com as mitocôndrias marcadas com DsRed Mito tanto móveis como estáticas (Figura 33). No entanto, ainda se faz necessário verificar se mutações desenvolvidas extinguem a capacidade das proteínas Miro em modular o transporte mitocondrial durante o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} .

3.5.2 Diminuição dos níveis de Miro antes e durante a agregação proteica

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que a rotenona pode alterar os níveis de proteínas envolvidas no transporte mitocondrial (Chaves, Melo *et al.*, 2013). Então avaliou-se a influência da exposição a rotenona sobre os níveis de Miro. Exposição à 0,3 ou 0,5nM de rotenona induziu a diminuição dos níveis de Miro de maneira similar em ambas concentrações, aproximadamente 32%, em relação a exposição ao DMSO (Figura 34).

Figura 33. Fotomicrografias de neurônios do hipocampo co-transfectadas com Miro 1 selvagem (A) mutante (B) e DsRed2-Mito. Abaixo das fotomicrografias são demonstrados quimógrafos das regiões destacadas, ilustrando a co-localização durante o movimento mitocondrial. Imagens capturadas na objetiva de 63X. Escala = 20 μ m.

Figura 34. Níveis de Miro em culturas de células do hipocampo exposta a DMSO, 0,3 e 0,5nM de rotenona durante 48 horas. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como percentagem do controle (DMSO) $\pm$ S.D. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação as células expostas ao DMSO, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=3 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

4. DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros celulares anteriores à formação dos agregados proteicos

Em Chaves, et al. (2010) nosso grupo demonstrou que a exposição à 0,5nM de rotenona durante 48 horas promove a hiperfosforilação e agregação de Tau e A β em culturas de células do hipocampo, sem induzir morte celular, mimetizando as disfunções relatadas em doenças neurodegenerativas.

No presente estudo a exposição à 0,3nM de rotenona por 48 horas não induziu a formação de agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada ou morte celular, no entanto, elevou os níveis de Tau hiperfosforilada e induziu o decréscimo da atividade proteossomal associada ao aumento de ROS nestas células. Além disso, verificou-se que o prolongamento do período de exposição à rotenona na concentração de 0,3nM induz a formação de agregados proteicos, sugerindo que as disfunções observadas inicialmente são suficientes para induzir ou estimular formação dos agregados, validando o uso dessa metodologia experimental para análise de parâmetros antes da formação dos agregados.

Assim, os resultados obtidos ilustram a ocorrência de disfunções na homeostase celular antes mesmo da formação dos agregados proteicos. A função dos agregados proteicos na etiologia das doenças neurodegenerativas encontra-se obscura e controversa (Congdon e Duff, 2008), no entanto, a hiperfosforilação de Tau é relatada como um dos processos iniciadores da agregação de Tau e dos processos patológicos em DA (Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. et al., 1986; Alonso, Grundke-Iqbal et al., 1996; Augustinack, Schneider et al.,

2002). Evidências também sugerem o envolvimento da hiperfosforilação de Tau em DP (Muntané, Dalfó *et al.*, 2008).

Desta maneira o aumento dos níveis de Tau hiperfosforilada, sem a formação dos agregados proteicos, induzidos pela exposição à 0,3nM de rotenona parece mimetizar os momentos iniciais da disfunção da proteína Tau relacionados com a formação dos agregados e a neurodegeneração em DA.

Os níveis de fosforilação de Tau são regulados pela atividade de proteínas quinases e fosfatases, as quais tem sua atividade influenciada por fatores como níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos (Pierrot, Santos *et al.*, 2006), absorção de glicose (Liu, Liu *et al.*, 2007), hipotermia (Planel, Miyasaka *et al.*, 2004), colesterol (Fan, Yu *et al.*, 2001) e níveis de A β . A disfunção do balanço entre a atividade de proteínas quinases como glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β) e fosfatases como a proteína fosfatase 2A (PPA2) são comumente relacionadas com a hiperfosforilação de Tau em DA (Martin, Latypova *et al.*, 2013).

Estudos ilustram evidências do aumento da atividade e expressão da GSK3 β em lisados de cérebros (Pei, Tanaka *et al.*, 1997; Leroy, Yilmaz *et al.*, 2007) e plaquetas (Forlenza, Torres *et al.*, 2011) de pacientes com DA, apontando para sua possível importância no processo de hiperfosforilação de Tau nessa doença, além disso, essas proteínas também encontram-se co-localizadas com agregados proteicos contendo proteína Tau maximizando esta correlação (Leroy, Yilmaz *et al.*, 2007).

A ativação de GSK-3 β e a hiperfosforilação de Tau foram observadas em culturas de células SH-SY5Y expostas a 1 μ M de rotenona, sendo estas disfunções dependentes do aumento de ROS (Hongo, Kihara *et al.*, 2012). A exposição ao MPTP, que quando convertido a MPP $^{+}$ também inibe o complexo

I da cadeia respiratória mitocondrial, e ao H₂O₂ também induzem aumento da atividade da GSK3 β , (Nair e Olanow, 2008; Duka, Duka *et al.*, 2009), corroborando com o possível mecanismo de hiperfosforilação de Tau via GSK3 β ser dependente de ROS.

Os resultados apresentados corroboram indiretamente essa hipótese ao ser observado que a exposição à 0,5nM de rotenona, durante 48 horas, induz o aumento dos níveis de Tau hiperfosforilada independente da indução do aumento de ROS, porém em menor magnitude que a exposição à 0,3nM de rotenona que apresenta o aumento dos níveis de Tau associado ao aumento de ROS.

Além do aumento na atividade da GSK3 β a disfunção na atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A) também pode estar envolvida no processo de hiperfosforilação de Tau, uma vez que sua atividade é modulada pela disfunção mitocondrial (Prigione e Cortopassi, 2007). Porém, nossos resultados anteriores mostraram ausência de disfunções mitocondriais associadas a exposição à baixas concentrações de rotenona, antes da formação dos agregados proteicos (Melo, D'unhao A *et al.*, 2012).

Disfunções nas vias de degradação podem induzir e/ou exacerbar a agregação proteica durante a neurodegeneração (Ciechanover e Brundin, 2003), e especificamente a disfunção do sistema ubiquitina proteossoma (UPS) já foi descrita em pacientes com DA (Keller, Hanni *et al.*, 2000) e evidências sugerem sua disfunção também em DP (Lim e Tan, 2007).

É bem documentado que a formação dos agregados proteicos pode induzir a redução da atividade UPS. No entanto, nossos presentes resultados

demonstram que a redução da atividade proteassomal antecede a formação dos agregados proteicos.

ROS é comumente associado à inibição da atividade proteassomal (Reinheckel, Sitte *et al.*, 1998; Ding e Keller, 2001) e diversos mecanismos de regulação da atividade proteassomal dependente de ROS e oxidação de proteínas foram descritos (Aiken, Kaake *et al.*, 2011). Silva e colaboradores demonstraram como alterações na homeostase redox podem alterar estruturalmente os proteassomos facilitando a degradação proteica independente de ATP (Silva, Netto *et al.*, 2012).

Chou e colaboradores (2010) demonstraram a capacidade da exposição à rotenona de inibir a atividade proteassomal, em células expostas à 100nM de rotenona, possivelmente por meio de alterações na dinâmica dos microtúbulos e da elevação dos índices de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Logo, o aumento de ROS poderia ser o indutor da inibição da atividade proteassomal na inexistência de agregação proteica. No entanto, nossos resultados corroboram parcialmente essa hipótese uma vez que a inibição do proteassomo é observada no nosso sistema em células expostas à 0,5nM de rotenona mesmo sem alterações nos níveis de ROS.

Tau é um dos substratos do proteassomo (David, Layfield *et al.*, 2002), quando hiperfosforilada Tau inibe sua própria degradação via UPS (Poppek, Keck *et al.*, 2006) e reduz a atividade proteassomal global (Ren, Liao *et al.*, 2007). Logo o aumento dos níveis de Tau hiperfosforilada poderia ser o indutor da inibição da atividade proteassomal uma vez que os níveis de Tau hiperfosforilada estão aumentados após a exposição à rotenona em ambas concentrações.

O processo de autofagia também faz parte da maquinaria celular de degradação e sua disfunção é citada em doenças neurodegenerativas. Em modelos de DA a disfunção no UPS induz o aumento do processo de autofagia nas fases iniciais da neurodegeneração (Cecarini, Bonfili *et al.*, 2012), sendo esse mecanismo citado como um mecanismo de proteção celular.

No nosso modelo a autofagia é inibida após a exposição à 0,3nM de rotenona e estimulada após exposição à 0,5nM. ROS são relatadas como moduladoras do processo de autofagia (Kiffin, Bandyopadhyay *et al.*, 2006) e evidência sugerem que ROS podem induzir a inibição do processo de autofagia (Luo, Li *et al.*, 2013), o que poderia explicar a diminuição do fluxo autofágico nas células expostas à 0,3nM de rotenona porém não explica a elevação do fluxo autofágico em células exposta à 0,5nM de rotenona.

Tanto a hiperfosforilação da proteína Tau, bem como a inibição do UPS e do fluxo autofágico observados, após a exposição à 0,3nM de rotenona, convergem apontando a elevação dos índices de ROS como o possível indutor destas alterações.

A elevação de ROS é relatada em fibroblastos (Del Hoyo, Garcia-Redondo *et al.*, 2010), no líquido cefalorraquidiano e plaquetas (Ilic, Jovanovic *et al.*, 1999) de pacientes com DP, bem como em plaquetas e eritrócitos (Kawamoto, Munhoz *et al.*, 2005; Torres, Quaglio *et al.*, 2011) e fibroblasto (Ramamoorthy, Sykora *et al.*, 2012) de paciente com DA, apontando o aumento de ROS como uma disfunção comum e associada aos processos básicos que regem a neurodegeneração.

Com base na ampla associação da disfunção nos níveis de ROS com os processos patogênicos relacionados às doenças neurodegenerativas os níveis

de ROS, foram acessados através de 3 metodologia diferentes. Nossas análises tanto indiretas, como as empregando CM-H₂DCFDA para detecção de peróxidos, radicais hidroxila, peroxinitritos e radicais peroxil ou AmplexRed para detecção H₂O₂, ou diretas analisando os níveis de proteínas carboniladas, ilustram o aumento de ROS somente antes da agregação proteica (exposição à 0,3nM de rotenona).

Nossos dados corroboram com a possibilidade de ROS ser o fator primários indutor das disfunções observada após a exposição à 0,3nm de rotenona, induzindo a hiperfosforilação de Tau, inibição da atividade proteassomal e do fluxo autofágico. Porém esta hipótese falha em explicar as disfunções exibidas após a exposição à 0,5nM de rotenona, possivelmente por que a formação dos agregados proteicos exerce atividade neuroprotetora. A figura 34 sumariza as disfunções identificadas após a exposição à rotenona nas concentrações de 0,3nM ou 0,5nM.

O objetivo principal da realização das análises temporais utilizando a concentração de 0,3nM, era validar o uso da exposição à essa concentração de rotenona para análise de parâmetros celulares anteriores à agregação proteica, porém ao realizarmos essas padronizações obtivemos dados que permitem o estudo dos mecanismos envolvidos com a formação dos agregados proteicos.

Nossos dados demonstram que antes da formação dos agregados proteicos os níveis de Tau encontram-se elevados bem como de ROS, sendo ambas disfunções associadas com a redução da atividade proteolítica proteossomal e fluxo autofágico.

No entanto, durante a formação dos agregados proteicos os níveis de Tau hiperfosforilada descessem em relação aos níveis antes da formação dos

agregados proteicos, possivelmente via a inibição do recrutamento de Tau normal por Tau hiperfosforilada, processo que facilita a hiperfosforilação de Tau normal e sua agregação (Alonso Adel, Li *et al.*, 2006).

Durante a formação dos agregados proteicos a atividade proteolítica proteassomal não sofre alteração, mantendo-se inibida, possivelmente devido ao fato que a formação dos agregado proteicos inibe a atividade proteolítica proteassomal (Hyun, Lee *et al.*, 2003), restringindo a quantidade de ubiquitina disponível para ligação em novos substratos (Hipp, Patel *et al.*, 2012) para degradação uma vez que os agregados são extensivamente ubiquitinados, e induzindo o aumento do tamanho dos substratos a serem degradados, tornando os incompatíveis com a degradação via proteassomo (Verhoef, Lindsten *et al.*, 2002).

A inibição da atividade proteolítica proteassomal via utilização de inibidores induz à ativação do sistema de autofagia em diferentes modelos (Zhu, Dunner *et al.*, 2009; Tang, Cai *et al.*, 2014), acredita-se que a ativação da autofagia durante redução da atividade proteolítica proteassomal teria um papel citoprotetor ao estimular a degradação dos substratos acumulados decorrentes da inibição da atividade proteassomal. Durante a formação dos agregados proteicos nossas análises ilustram o aumento do fluxo autofágico, o qual antes da formação dos agregados proteicos encontrava-se inibido, sugerindo que a formação dos agregados proteicos induz a ativação da autofagia.

A formação dos agregados também induziu a normalização dos níveis de ROS em relação aos níveis anteriores à formação dos agregados proteicos, essa foi a alteração mais notável associada a formação dos agregados proteicos, sendo reproduzida utilizando 3 diferentes análises. Além disso, encontramos a

diminuição dos níveis de ROS utilizando a exposição à rotenona durante 72h, que induz formação dos agregados em comparação a exposição à rotenona durante 48 horas.

Logo, nossos resultados sugerem que a formação dos agregados proteicos exerceria atividade citoprotetora capaz de normalizar a elevação nos níveis de ROS anterior a formação dos agregados e induzir o aumento do fluxo autofágico (Figura 35). Sendo essas alterações benéficas, uma vez que protocolos experimentais que induzem essas respostas em modelos de neurodegeneração, aliviam, mesmo que parcialmente e brevemente a neurodegeneração nestes modelos (Aliev, Obrenovich *et al.*, 2008; Schaeffer, Lavenir *et al.*, 2012). No entanto, novos experimentos modulando a agregação proteicas são necessários para elucidar se realmente a agregação proteica seria o fator primário indutor das alterações citoprotetoras observadas.

4.2 Análise da mobilidade mitocondrial e dos níveis de Ca^{2+} em culturas de células expostas à rotenona, antes e durante a formação dos agregados proteicos

Disfunções no transporte axonal recentemente emergiram como mecanismo básico de neurodegeneração associado a diversas patologias como DA, DP e ELA (Millecamps, S. e Julien, J.-P., 2013). Tanto em modelos experimentais bem como em tecidos *post-mortem* de pacientes, inchamentos axonais ou acúmulos de vesículas e organelas, como as mitocôndrias, são observados sugerindo déficit no transporte axonal durante a neurodegeneração.

O transporte mitocondrial é essencial na homeostase da própria organela bem como para o neurônio, no presente estudo, demonstramos disfunções no transporte mitocondrial e nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} antes e durante a formação de agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração, no entanto não obtivemos evidências que sugiram a influência do mecanismo de regulação promovido pela proteína miro sob o transporte mitocondrial durante esses períodos. Este trabalho utilizou-se de dois protocolos experimentais distintos para análise destes parâmetros celulares antes e durante a formação dos agregados proteicos sendo a maioria das alterações confirmadas experimentalmente por ambas análises.

Em nossos trabalhos anteriores demonstramos a capacidade da exposição à rotenona ser utilizada como modelo de agregação de proteínas relacionadas com as doenças neurodegenerativas, instituindo-se então um modelo que permitia a análise de parâmetros da homeostase celular durante e após a formação destes agregados proteicos (Chaves, Melo *et al.*, 2010).

Utilizando esse modelo demonstramos que os níveis de expressão de proteínas relacionada com o transporte mitocondrial, encontravam-se alterados durante a formação de agregados proteicos envolvidos em neurodegeneração, sugerindo a ocorrência de alteração no transporte mitocondrial (Chaves, Melo *et al.*, 2010; Melo, D'unhao A *et al.*, 2012; Chaves, Melo *et al.*, 2013).

A disfunção no transporte axonal independente da formação dos agregados proteicos é descrita em diversos modelos de DA (Zhang, Higuchi *et al.*, 2004; Salehi, Delcroix *et al.*, 2006; Lazarov, Morfini *et al.*, 2007), sendo considerada como processo associado a etiologia da DA, embora as vias envolvidas neste processo não estejam totalmente elucidadas.

Como citado anteriormente inchaços axonais são observados em modelos de DA sugerindo disfunção do transporte axonal, Stokin e colaboradores (2005) identificaram a co-localização de agregados de KIF5 com esses inchaços axonais. KIF5 é uma proteína motora que além de realizar o transporte mitocondrial, transporta também vesículas contendo a APP.

Stokin e colaboradores (2005) também demonstraram que a redução da expressão de KIF5, promove o aumento destes inchaços, bem como a formação de agregados proteicos contendo A β 42, sugerindo que a inibição do transporte axonal não só acontece inicialmente na DA mas também induz a formação de agregados proteicos. Devido seu papel no transporte de APP, redução da expressão de KIF5 é apontada como um possível mecanismo indutor de alterações no transporte axonal relatadas em DA.

A disfunção no transporte de APP potencializa a formação de A β 42, que mesmo não agregado, inibe o transporte mitocondrial via ativação da GSK3 β (Rui, Tiwari *et al.*, 2006), a qual induz a hiperfosforilação da proteína Tau e

fosforilação da KIF5 (Morfini, Szebenyi *et al.*, 2002) modulando o transporte mitocondrial e de vesículas contendo APP promovendo o aumento da síntese de A β 42 (Weaver, Leidel *et al.*, 2013). Além disso, a hiperfosforilação da proteína Tau pode induzir a disfunção do transporte através da desestabilização dos microtúbulos, independente da formação de A β 42 e de sua agregação (Alonso, Li *et al.*, 2006).

Então, com base nos mecanismos descritos desenvolvemos nossa hipótese de alteração do transporte mitocondrial em um modelo que mimetiza a agregação de proteína relacionadas com DA e DP.

Melo e colaboradores (2012) já haviam demonstrados que durante a formação dos agregados proteicos o transporte mitocondrial bem como a expressão de KIF5 não sofriam alteração em culturas do locus coeruleus e hipocampo, e sugeriram que a inibição do transporte mitocondrial seria possivelmente um evento tardio ocorrendo somente após a formação dos agregados proteicos. Nós estendemos esses dados demonstrando que a alteração ocorre em diferentes períodos de exposição à rotenona antes da formação agregados proteicos.

Logo, nossos dados ilustram que: (i) as alterações na expressão de proteínas relacionadas a transporte mitocondrial, encontrada nos nossos estudos anteriores não regem alterações diretas no transporte mitocondrial, nessas regiões, antes e durante formação dos agregados, porém podem ser importantes após a formação dos agregados proteicos (Melo, D'unhao A *et al.*, 2012; Chaves, Melo *et al.*, 2013). (ii) a alteração do transporte mitocondrial pode ocorrer antes e durante a formação dos agregados proteicos em nosso modelo. (iii) durante formação dos agregados proteicos as respostas neuroprotetoras

(demonstradas nesse estudo) podem atuar inibindo a ocorrência da disfunção no transporte mitocondrial.

A disfunção do transporte axonal também é relatada precocemente em modelos de DP, que como em DA demonstram inchaços axonais e alteração na expressão de proteínas motoras envolvidas no transporte de mitocôndrias e vesículas (Chung, Koprach *et al.*, 2009), sendo estas modificações também relatadas em tecido cerebral de pacientes de DP em estágios iniciais (Chu, Morfini *et al.*, 2012).

Assim como em AD a diminuição dos níveis de expressão da KIF5 ocorre nos estágios iniciais de DP e é potencializada nos estágios tardios da doença, os níveis de expressão da Dineína também são reduzidos, porém somente nos estágios tardios de DP (Chu, Morfini *et al.*, 2012). Novamente a disfunção da expressão da proteína motora KIF5 aparece como moduladora do transporte axonal em estágios precoces de DA e DP, demonstrando a possível existência de mecanismos básicos de inibição do transporte axonal antes da neurodegeneração relacionada com DA e DP.

A análise da mobilidade mitocondrial nos neurônios da substância negra, região associada a DP (note que locus coeruleus, já discutido junto sessão de DA, também é associado com DP), demonstrou alteração da mobilidade mitocondrial tanto antes como durante a formação dos agregados proteicos, induzidos pela exposição à rotenona. Antes da formação dos agregados proteicos ocorre o aumento da mobilidade mitocondrial que é seguido por diminuição após formação dos agregados proteicos.

O aumento do transporte mitocondrial nas culturas de células da substância negra ocorre simultaneamente com a diminuição da expressão das

proteínas KIF1B e KIF5 (Melo, D'unhao A *et al.*, 2012), entretanto os níveis destas proteínas também se alterou no hipocampo e locus coeruleus, o que sugere participação indireta destas proteínas no tráfego de mitocôndrias. Trabalhos anteriores identificaram diminuição dos níveis de proteínas motoras durante os momentos que antecedem a agregação proteica em outros modelos, porém não analisaram o real efeito dessas alterações no transporte axonal (Chung, Koprach *et al.*, 2009; Chu, Morfini *et al.*, 2012).

O aumento do transporte mitocondrial também poderia ser um evento de compensação da diminuição destas proteínas motoras antes da formação dos agregados proteicos, uma vez que essa diminuição já foi correlacionada com a os estágios iniciais de DA e DP (Stokin, Lillo *et al.*, 2005; Chung, Koprach *et al.*, 2009), sendo que a fadiga nesse processo poderia induzir a diminuição do transporte mitocondrial durante a formação dos agregados proteicos.

Além da diminuição da expressão das proteínas relacionadas com o transporte mitocondrial, a própria agregação de α -sinucleína pode induzir diminuição do transporte de mitocôndrias através do bloqueio físico exercido por esses agregados nos axônios e da desestabilização da rede de microtúbulos (Lee, Khoshaghideh *et al.*, 2006). A inibição do transporte também pode ocorrer através dos efeitos promovidos diretamente pela rotenona como a desestabilização dos microtúbulos (Diaz-Corrales, Asanuma *et al.*, 2005; Choi, Palmiter *et al.*, 2011) e inibição da síntese de ATP (Sherer, Todd B., Betarbet, Ranjita *et al.*, 2003), ambos regulados de forma dose dependente.

Logo, nossos resultados ilustram que antes da formação dos agregados proteicos ocorre aumento da mobilidade mitocondrial possivelmente como um mecanismo de proteção, que falha durante a formação dos agregados proteicos,

pois identificamos a diminuição da mobilidade mitocondrial. Visando então avaliar-se alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático estariam possivelmente envolvidas nessa modulação do transporte mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteicos, via o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial promovido por Miro, analisamos os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos.

Alterações na homeostase do Ca^{2+} são descritas em diversas doenças neurodegenerativas como DA (Bezprozvanny e Mattson, 2008), DP (Surmeier, 2007) e ELA (Lewinski e Keller, 2005), como possíveis disfunções secundárias na etiologia dessas patologias, mas que exercem atividade potencializadora das disfunções primárias relacionadas com a neurodegeneração.

Nossos resultados mostram aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} antes da formação dos agregados, nas culturas de células do hipocampo e diminuição nas culturas da substância negra, as células do locus coeruleus não apresentaram alterações. Após a formação dos agregados proteicos os níveis de Ca^{2+} citoplasmático foram elevados nas culturas de células do hipocampo e locus coeruleus, as células da substância negra não apresentaram alterações.

Evidências demonstram a diminuição da efetividade dos processos regem a homeostase do Ca^{2+} durante o envelhecimento cerebral, o que poderia dessensibilizar os mecanismo protetores ativados durante a alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático (Buchholz, Behringer *et al.*, 2007).

A correlação entre disfunção nos níveis de Ca^{2+} com a etiologia das doenças neurodegenerativas é amplamente estudada. Alterações nos níveis de Ca^{2+} podem acelerar a agregação proteica de $\text{A}\beta_{42}$ (Querfurth e Selkoe, 1994; Isaacs, Senn *et al.*, 2006) e a hiperfosforilação de Tau (Mattson, Lovell *et al.*, 1993; Pierrot, Santos *et al.*, 2006), além disso Riascos e colaboradores (2011)

demonstraram que neurônios do núcleo basal de Meynert, precocemente afetados em DA, apresentam essa vulnerabilidade por causa da diminuição, idade dependente, da síntese de calbindina D, que ocorre também na substância negra em DP (Iacopino e Christakos, 1990).

Após agregação proteica diversos mecanismos podem induzir à elevação dos níveis de Ca^{2+} . Em DA a formação dos agregados de A β 42 pode aumentar os níveis de Ca^{2+} através da formação de poros permeáveis ao Ca^{2+} na membrana plasmática (Zhu, Y. J., Lin, H. *et al.*, 2000) e possivelmente inibindo a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias através do aumento de ROS e da internalização pelas mitocôndrias. Além disso, os oligômeros de A β 42 podem aumentar a atividade dos receptores de glutamato do tipo NMDA, consequentemente aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular (Shankar, Bloodgood *et al.*, 2007).

A formação dos agregados de Tau hiperfosforilada aparenta não influenciar diretamente nenhum mecanismo relacionado com a homeostase do Ca^{2+} , apesar dos níveis de Ca^{2+} reconhecidamente influenciar os níveis de hiperfosforilação de Tau. Além disso, a aplicação de oligômeros de Tau hiperfosforilada diretamente em culturas de células induzem o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelulares por um breve período.

Em DP a formação dos agregados de α -sinucleína pode elevar os níveis de Ca^{2+} através da formação de poros permeáveis ao Ca^{2+} na membrana plasmática (Kourie e Shorthouse, 2000; Furukawa, Matsuzaki-Kobayashi *et al.*, 2006). Além dos processos relacionados com a formação dos agregados proteicos, a rotenona pode induzir diretamente o aumento dos níveis de Ca^{2+} através da modulação dos canais de potássio receptores de potencial

dependentes M2 (TRMP2) (Freestone, Chung *et al.*, 2009) e receptores de glutamato NMDA (Munhall, Wu *et al.*, 2012).

Nossos presentes resultados demonstram a alteração nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático antes e durante a agregação proteica, dependente da região, via mecanismos ainda não explorados no nosso modelo, porém que devem influenciar na indução dos agregados proteicos bem como na neurodegeneração com base nas evidências citadas acima.

Nas culturas de células da substância negra, a única que apresentou alteração do transporte mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteicos, observa-se que a diminuição dos níveis de Ca^{2+} ocorre simultaneamente ao aumento do índice de mobilidade mitocondrial antes da agregação proteica e que posteriormente, durante a formação dos agregados proteicos, ocorre a normalização dos níveis de Ca^{2+} acompanhado pela diminuição da mobilidade mitocondrial.

O aumento dos níveis citoplasmático de Ca^{2+} podem modular a mobilidade mitocondrial via os diversos mecanismos citados nas sessões anteriores, no entanto, a diminuição dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático parece não induz o aumento da motilidade mitocondrial basal (Chang, Niescier *et al.*, 2011; Nguyen, Oh *et al.*, 2014), sugerindo que os níveis de Ca^{2+} citoplasmático somente atuam influenciando a mobilidade mitocondrial quando elevados. Logo, o aumento do índice de mobilidade mitocondrial não sugere a participação de Miro ou Ca^{2+} .

Durante a formação dos agregados proteicos, a inibição da mobilidade mitocondrial também não se correlaciona com o mecanismo de inibição da mobilidade mitocondrial via Miro, conforme previamente descrito na literatura, pois os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} não sofreram alteração. Desta maneira,

como os resultados não demonstraram evidências diretas da participação de Miro na disfunção do transporte mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteicos, a análise da influência das proteínas Miro mutantes, insensíveis ao Ca^{2+} produzidas nesse estudo, ficará para etapas posteriores.

A falta de correlação entre a mobilidade mitocondrial e os níveis de Ca^{2+} citoplasmático pode ter ocorrido devido dois a fatores: (i) as alterações de Ca^{2+} identificadas no nosso modelo não serem capazes de transpor o limiar de ativação de Miro induzindo o mecanismo de inibição da mobilidade mitocondrial. (ii) A exposição à rotenona poderia modular os níveis de Miro, impedindo que o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial dependente de Ca^{2+} , via Miro ocorra.

O mecanismo de inibição do transporte mitocondrial tanto via Miro ou através do sequestro de Ca^{2+} pelas mitocôndrias foi descrito utilizando-se de ionóforos, compostos que induzem aumento de 5 à 10X nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} (de 50-100nM para 500-1000nM de Ca^{2+}) (Wang e Schwarz, 2009; Chang, Niescier et al., 2011) ou estimulando a despolarização da membrana neuronal que também induz aumento das concentrações de Ca^{2+} citoplasmático de 50-100nM para 500-1000nM de Ca^{2+} (Berridge, Lipp et al., 2000; Macaskill, Rinholm et al., 2009; Chen e Sheng, 2013).

Logo, os mecanismos descritos acima foram observados e caracterizados durante períodos onde o nível de Ca^{2+} citoplasmático encontravam-se no mínimo 5X superiores ao nível basal, o que corrobora como nossa hipótese de limiar de ativação, pois os aumentos nos níveis de Ca^{2+} obtidos nesse estudo mesmo que não quantitativos sugerem aumento 50nM sobre a concentração basal de Ca^{2+} atingindo então 150nM de Ca^{2+} citoplasmático. Recentemente Nguyen e

colaboradores (2014) demonstraram que o IC₅₀ do mecanismo de inibição do transporte mitocondrial via Miro de seria 498±18nM de Ca²⁺ corroborando nossa hipótese.

Nossa segunda hipótese seria que a exposição à rotenona poderia modular os níveis de Miro, para verificarmos essa hipótese aferimos os níveis de Miro após a exposição à rotenona, observando que os níveis de Miro estavam reduzidos. No entanto, Nguyen e colaboradores (2014) demonstraram que o knockout de Miro1 não é suficiente para inibir a capacidade de elevações nos níveis de Ca²⁺ citoplasmático induzirem a inibição do transporte mitocondrial, sugerindo que somente a redução dos níveis de Miro1 não é suficiente para inibir a influência de Ca²⁺ sobre o transporte mitocondrial encontrada nos nossos resultados.

Nossos resultados então reproduzem parcialmente os achados publicados referente a capacidade de alterações nos níveis de Ca²⁺ modularem o transporte mitocondrial, ao demonstrarmos que o aumento significativo dos níveis de Ca²⁺ não possui como único efeito a diminuição significativa nos percentuais de mitocôndrias móveis ou o inverso durante a diminuição dos níveis de Ca²⁺ nas culturas de células analisadas (Macaskill, Rinholm *et al.*, 2009; Wang e Schwarz, 2009; Chang, Niescier *et al.*, 2011).

Com base em nossos presentes resultados ficam as seguintes questões a serem respondidas referentes ao mecanismo de inibição do transporte mitocondrial após o aumento das concentrações de Ca²⁺: (i) Os mecanismos de regulação do transporte mitocondrial dependente de Ca²⁺ ocorrem homeostaticamente ou somente em condições experimentais onde o aumento dos níveis de Ca²⁺ alcança concentrações muito elevadas? (ii) Existem outros

mecanismos ou fatores que regulam o transporte mitocondrial que são ativados primariamente, sendo a influência do Ca^{2+} secundária?

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, os experimentos para avaliação da exposição a baixas concentrações de rotenona como modelo para análise de parâmetros antes da formação dos agregados proteicos demonstraram que a exposição à 0,3nM de rotenona durante 48 horas mimetiza disfunções como, redução da atividade proteolítica proteosomal, inibição do fluxo autofágico, estresse oxidativo e hiperfosforilação de Tau, relacionadas com as doenças neurodegenerativas sem induzir a formação dos agregados proteicos, sendo útil para análise de parâmetros celulares anteriores à formação dos agregados proteicos.

O estresse oxidativo e autofagia são normalizados e estimulados, respectivamente, durante a formação dos agregados proteicos, sugerindo a existência de processos neuroprotetores durante a formação dos agregados proteicos.

A realização das análises de mobilidade mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} antes e durante a formação dos agregados proteicos demonstrou que ambos os parâmetros são modulados de forma dependente do tempo e da região encefálica. No entanto, as alterações observadas não correlacionaram-se com os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} .

A participação de Miro na disfunção do transporte mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteico ainda precisa ser melhor estudada.

Assim, a realização desse estudo permitiu o desenvolvimento de um modelo de estudo de parâmetros antes da agregação envolvida em doenças neurodegenerativa e demonstrou que alterações nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos e na mobilidade mitocondrial ocorrem antes e durante a formação de agregados proteicos, o que pode ser importante para a etiologia de

doenças neurodegenerativas. No entanto, novos estudos devem ser realizados utilizando outros modelos de neurodegeneração para testar, de forma mais ampla, nossas hipóteses.

**CAPÍTULO III – MUTAÇÃO $\Delta E9$ EM PRESENILINA 1 COMO
MODELO DE NEURODEGENERAÇÃO NÃO ASSOCIADO A AGREGAÇÃO
PROTEICA EM CÉLULAS HUMANAS ISOGÊNICAS**

1. INTRODUÇÃO

DA é uma doença neurodegenerativa complexa, a maioria dos casos de DA são esporádicos (sDA), ou seja, não associados a mutações e caracterizados pelo acometimento tardio, em média após os 60 anos de idade. No entanto, uma pequena fração dos casos de DA são familiares (fDA), sendo caracterizados pela ocorrência de mutações herdadas e pelo aparecimento prematuro da doença, antes dos 40 anos de idade.

Em fDA mutações nos genes das proteínas Presenilina 1 e 2 (PS1 e PS2) são responsáveis por 40% dos casos identificados (Tandon e Fraser, 2002). PS1 e PS2 são componentes essenciais do complexo multiproteico denominado γ -secretase, os quais formam o sítio catalítico responsável pela proteólise de proteínas transmembranas como APP e Notch. A clivagem de APP pela γ -secretase da origem dá A β 42, acredita-se que a desregulação deste processo está diretamente relacionada com a etiologia de DA.

A mutação indutora do fenótipo mais severo associado a PS1 é a $\Delta E9$, que induz a substituição de dois aminoácidos e a deleção *in frame* do exon 9 (PS1 $\Delta E9$)(De Strooper, 2007). Dois mecanismos foram propostos visando elucidar a neurotoxicidade associada a essa mutação. Inicialmente a superprodução de A β 42, induzida pelo aumento dos índices de clivagem da APP pela γ -secretase, que induziria a formação massiva de agregados proteicos

(Houlden, Baker *et al.*, 2000; Nelson, Supnet *et al.*, 2010). Posteriormente, o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos devido ao ganho de função induzido por esta mutação sobre a capacidade de PS1 atuar como um canal de Ca^{2+} , acoplado a membrana do RE, permitindo o extravasamento de Ca^{2+} do RE para o citoplasma (Cedazo-Mínguez, Popescu *et al.*, 2002; Tu, Nelson *et al.*, 2006).

Evidências também sugerem que PS1 Δ E9 induz a inibição do transporte axonal de vesículas contendo APP em DA (Pigino, Morfini *et al.*, 2003), ao modular o índice de fosforilação de KIF5. O transporte mitocondrial é também mediado por KIF5 sugerindo que possivelmente o transporte mitocondrial possa ser inibido por PS1- Δ E9.

As mitocôndrias possuem fundamental importância celular por regularem os processos de síntese de ATP, concentração citoplasmática de Ca^{2+} e apoptose. O transporte mitocondrial é essencial para realização dos processos listados acima e evidências sugerem a inibição do transporte mitocondrial em diferentes doenças neurodegenerativas, induzindo a formação de ROS e morte celular programada (Millecamps, S. e Julien, J. P., 2013). Aliás, dados experimentais obtidos pelo nosso grupo identificaram alterações no transporte axonal de mitocôndria precedendo a ocorrência de disfunções, como a formação de agregados proteicos, em modelos de doenças neurodegenerativas (Melo, D'unhao A *et al.*, 2012), conforme já detalhado.

O transporte mitocondrial é regulado por diversos fatores como sinalização por FGF, BDNF, ATP, Glicose e Ca^{2+} (Fransson, Ruusala *et al.*, 2003). Ca^{2+} aparenta ser o principal modulador do transporte mitocondrial, recentemente Wang e colaboradores (2009) descreveram um mecanismo de inibição do transporte mitocondrial através da ligação de Ca^{2+} a proteína de

membrana externa mitocondrial denominada Miro. Chang e colaboradores (2011) também demonstraram que as concentrações intramitocondriais de Ca^{2+} modulam o transporte da organela.

Na DA disfunções nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e armazenados no ER são amplamente relatadas (Ito, E., Oka, K. *et al.*, 1994; Hirashima, Etcheberrigaray *et al.*, 1996). Além disso, os agregados proteicos característicos da doença aparentam induzir o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} (Kourie e Shorthouse, 2000; Furukawa, Matsuzaki-Kobayashi *et al.*, 2006).

Deste modo com base na ampla gama de evidências que sugerem a disfunção da homeostase do Ca^{2+} em DA, e a capacidade dos níveis Ca^{2+} regularem o transporte mitocondrial. Desenvolvemos a hipótese que possivelmente o transporte mitocondrial estaria inibido em DA devido ao aumento dos níveis citoplasmático de Ca^{2+} , o que possivelmente seria importante para a etiologia de DA (Figura 36).

No capítulo anterior desta tese nosso grupo demonstrou que alterações no transporte mitocondrial e nos níveis de Ca^{2+} ocorrem, antes e após a formação de agregados proteicos. No entanto, falhamos em encontramos forte evidências de correlação entre os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em relação as disfunções no transporte mitocondrial, sugerindo que a modulação Ca^{2+} dependente da mobilidade mitocondrial promovida por Miro não ocorra nessas condições experimentais.

Presenilina 1 WT

Presenilina 1 $\Delta E9$

Figura 36. Modelo ilustrando os possíveis efeitos da mutação $\Delta E9$ no gene da presenilina 1 sobre os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e o transporte mitocondrial em células controles (WT) e em células expressando PS1 $\Delta E9$, demonstrado como o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} induziria a inibição do transporte mitocondrial via domínios *EF Hands* de Miro.

Então visando complementar as análises realizadas utilizando o modelo com a exposição à rotenona e estender nosso conhecimento referente a possível influência da modulação Ca^{2+} dependente de Miro nas doenças neurodegenerativas, empregaremos um modelo humano de DA baseado no uso da tecnologia de células tronco humanas com pluripotência induzida (iPSC) (Takahashi, Tanabe *et al.*, 2007) com genoma editado através da técnica de *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) (Miller, Tan *et al.*, 2011; Sander, Cade *et al.*, 2011).

Atualmente o uso iPSC vêm sendo empregado para o estudo de diversas doenças neurodegenerativas associadas ou não com mutações no genoma como DA (Yagi, Ito *et al.*, 2011; Israel, Yuan *et al.*, 2012; Kondo, Asai *et al.*, 2013; Muratore, Rice *et al.*, 2014), DP (Cooper, Seo *et al.*, 2012; Woodard, Campos *et al.*, 2014) e ELA (Burkhardt, Martinez *et al.*, 2013; Devlin, Burr *et al.*, 2015), dentre outros usos.

A capacidade de transformar células somáticas extraídas de pacientes em iPSC, as quais podem ser posteriormente diferenciadas em diversos tipos celulares, incluído neurônios, permite a análise dos mecanismos relacionadas com a etiologia das doenças sem a necessidade de manipulações experimentais adicionais como exposição a fármacos ou superexpressão de proteínas.

TALENs são uma nova classe de nucleases, que podem ser desenhadas como alta especificidade para clivar regiões específicas em um genoma, permitindo a criação ou correção de mutações em iPSC derivadas de pacientes (Ding, Lee *et al.*, 2013). A tecnologia TALEN também pode ser empregada para obtenção de linhagens celulares isogênicas, que diferem somente em relação a

mutação de interesse, evitando variáveis experimentais como polimorfismos de base únicas (SNPs), fatores de risco e mutações não patogênicas.

Nossos colaboradores, utilizando as tecnologias de iPSC e TALENs recentemente criaram linhagens celulares isogênicas contendo uma série alélica de mutações $\Delta E9$ no gene de PS1 (Woodruff, Young *et al.*, 2013). As mutações foram inseridas em iPSC derivadas do doador J Craig Venter (JCV), o qual possui seu genoma totalmente mapeado e disponível, desta forma todas as linhagens possuem o mesmo *background* genético minimizando variáveis experimentais e permitindo a análise rigorosa do efeito primário das mutações sobre a fisiologia celular.

A análise de parâmetros relacionados a DA utilizando essas linhagens celulares demonstrou que a mutação PS1 $\Delta E9$ tanto em heterozigose ou homozigose induz o aumento massivo da síntese de A β 42, aparentemente independente de alterações nos níveis de Tau hiperfosforilada, sem a indução de morte celular ou a formação de agregados proteicos (Woodruff, Young *et al.*, 2013).

A utilização dessa linhagem permite correlacionarmos os dados obtidos por este estudo como os dados obtido com a exposição à rotenona antes da formação dos agregados proteicos, devido ao fato que essas linhagens não apresentam agregados proteico. Desta forma o presente estudo tem como objetivo avaliar se a mutação PS1 $\Delta E9$ em neurônios isogênicos humanos induz alterações nos níveis citoplasmáticos de cálcio, no transporte mitocondrial e avaliar o possível envolvimento do mecanismo de regulação do transporte mitocondrial via Miro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi analisado pelo comitê de ética da Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD) (*Internal Review Board (IRB)*) e pelo Centro de estudos da doença de Alzheimer da UCSD (*UCSD Alzheimer's Disease Research Center*). As células iPSC do doador J Craig Venter (JCV) foram obtidas com consentimento do doador com aprovação para todos os usos científicos.

2.2 Cultura de células iPSC

As iPSCs foram geradas de acordo com o protocolo descrito por Gore e colaboradores (2011) ilustrado na figura 37, sendo cultivadas sobre MEFs em meio de cultura *knockout (KO) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* (Gibco) contendo 10% plasmanate (Talecris Biotherapeutics), 10% *KO Serum Replacement* (Gibco), 20 mM GlutaMax (Invitrogen), 20 mM aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 20 mM Pen/Strep (Invitrogen) e 20 ng/ml de fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF) (Millipore). As células foram passadas utilizando-se Accutase (Innovative Cell Technologies).

2.3 Geração de células iPSC isogênicas

As iPSCs isogênicas foram geradas e caracterizadas conforme descrito por Woodruff e colaboradores (2013). Em resumo, iPSC foram previamente tratadas com 10 μ M de *Rock Inhibitor* (Ascent Scientific) durante 1 hora antes de serem utilizadas no processo de nucleofecção, a qual foi realizada utilizando-se dois milhões de células e o emprego do kit de nucleofecção Amaxa Human Stem

Cell (Lonza) em conjunto com 7,5 µg de cada vetor TALEN, 2 µg do vetor pmaxGFP (Lonza) e 30 µg de ssODN (oligodeoxinucleotídeos) (Integrated DNA Technologies).

Após o processo de nucleofecção as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10 µM de *Rock Inhibitor* durante 72 horas e posteriormente selecionadas utilizando FACS *sorting* (FACS Aria; BD Biosciences) para células expressando GFP. As células selecionadas foram então plaqueadas em placas de culturas de 6 cm na densidade de 1×10^4 por placa novamente utilizando *Rock Inhibitor*, nessa etapa o meio de cultura foi trocado a cada dois dias até que colônias celulares individuais fossem observadas.

As colônias obtidas foram então isoladas e cultivadas até que atingissem a confluência compatível para extração de DNA genômico utilizando o kit *QuickExtract* (Epicenter). O DNA extraído foi amplificado utilizando *primers* desenhados (Woodruff, Young *et al.*, 2013) para detecção da mutação PS1ΔE9. Foram obtidas 2 linhagens celulares para cada um dos genótipos wt/wt, wt/ΔE9 and ΔE9/ΔE9.

Figura 37. Ilustração do protocolo experimental utilizado para obtenção de neurônios isogênicos humanos PS1ΔE9 mutantes. Modificado de Israel e colaboradores (2012).

2.4 Diferenciação, purificação e cultura de NPCs

iPSCs foram diferenciadas de acordo com o protocolo descrito por Yuan e colaboradores (2011). Para diferenciação de iPSC em células precursoras neurais (NPCs), 1×10^5 iPSCs foram plaqueadas sobre células PA6 (linhagem de células estromais) e cultivadas em meio de diferenciação PA6, *Glasgow* DMEM, 10% knockout serum replacement, 1 mM piruvato de sódio, 0,1 mM aminoácidos não essenciais e 0,1 mM β -mercaptoethanol (Invitrogen) suplementado com 500 ng/ml de Noggin (R&D Systems) e 10 μ M de SB431542 (Tocris Bioscience) durante 12 dias tendo o meio trocado a cada dois dias.

No 12º dia de cultivo as iPSC foram dissociadas e marcadas com os anticorpos anti-CD184, CD44, CD271 e CD24 (BD Biosciences), sendo as células CD184+, CD24+, CD44-, CD271-, consideradas NPCs e selecionadas utilizando FACS *sorting*. As NPCs foram cultivadas em placas tratadas com 20 μ g/ml poly-L-ornitina (Sigma) e 5 μ g/ml laminina (Sigma) em meio DMEM:F12 + Glutamax (Invitrogen), 0,5x N2 (Life Technologies), 0,5x B27 (Life Technologies), 1x penicillin/streptomycin (Life Technologies) e 20 ng/ml FGF (Millipore). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

2.5 Diferenciação, purificação e cultura de neurônios

Após 4 dias de cultivo das NPCs em placas de 10cm, o FGF foi removido do meio de cultura visando iniciar o processo de diferenciação em neurônios, nessas condições as NPCs foram cultivadas por 3 semanas, tendo o meio trocado a cada dois dias.

No 21º dia de diferenciação, os neurônios foram purificados de acordo com o protocolo descrito por Yuan e colaboradores (2011). Primeiramente as

células foram dissociadas utilizando Accutase e Accumax (Innovative Cell Technologies) e marcadas utilizando anticorpos para as moléculas CD184, CD44 e CD24 (BD Biosciences). As células CD184-, CD44-, CD24+ foram consideradas neurônios e selecionadas utilizando FACS *sorting*.

Após o *sorting* as células foram plaqueadas em placas confocais (Mattek) tratadas poly-ornitina/laminina e cultivadas em meio de crescimento de NPCs suplementado com 0,5 mM dbCAMP (Sigma), 20 ng/μl fator derivado do cérebro (BDNF) (Peprotech) e 20 ng/μl fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) (Peprotech). Os neurônios obtidos foram cultivados por cinco dias em incubadora à 37°C e 5% CO₂, sem trocas de meio de cultura e então empregados nas análises programadas.

2.6 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ em NPC e neurônios

Os níveis de Ca²⁺ citoplasmático foram analisados utilizando duas metodologias distintas, inicialmente a análise não-ratiométrica utilizando Fluo4 AM (Invitrogen), e após a análise ratiométrica utilizando Fluo4 AM/FuraRed AM (Invitrogen)(Speier, Nyqvist *et al.*, 2008) ou utilizando a proteína sensor de Ca²⁺ GCaMP6f em conjunto com a Mcherry (Chen, Wardill *et al.*, 2013).

Neurônios ou NPCs foram incubados com 1μM de Fluo4 AM ou 1μM de Fluo4 AM + 1μM de FuraRed AM diluídos em meio de cultura de NPCs, anteriormente descrito sem Phenol Red (Life Technologies), durante 30 minutos em incubadora de CO₂ na temperatura de 37°C. Após a incubação as células foram lavadas por duas vezes e re-incubadas durante 20 minutos antes de serem analisadas.

A análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} utilizando GCaMP6f/Mcherry foi realizada após a co-transfecção dos neuronios com os vetores pGP-CMV-GCaMP6f (1500ng) fornecido por Douglas Kim (Addgene plasmid # 40755) e pmR-mCherry (1500ng) (Clontech # 632542) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) conforme descrito anteriormente. Os níveis de Ca^{2+} foram aferidos 48 horas após transfecção.

As análises foram realizadas utilizando-se microscópio confocal Zeiss 510 Meta em câmara de incubação à 37°C, 5% CO_2 usando a objetiva de 20x, para análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , 3 campos por placa foram escolhidos randomicamente e 5 imagens sequenciais com intervalo de 3 segundos foram capturas em cada campo.

As análises não-ratiométricas foram realizadas utilizando a configuração previamente descrita, no caso das análises ratiométrica Fluo4 and FuraRed foram excitados simultaneamente com laser 488nm sendo a emissão coletada entre 490-600nm para Fluo4 e 600-700nm para FuraRed, de acordo com o protocolo de Speier e colaboradores (2008). A análise utilizando GCaMP6f/Mcherry foi realizada usando excitação de 488nm e emissão entre 493-556nm para GCaMP6f e excitação de 561nm e emissão entre 578-696nm para Mcherry.

As imagens foram processadas e quantificadas de acordo com o protocolo previamente descrito para Fluo4. Vinte corpos celulares foram analisados em cada campo selecionado, sendo três campos por placa. Nas medidas ratiométricas a intensidade fluorescente da marcação com Fluo4 foi normalizada pela marcação de FuraRed e GCaMP6f por mCherry. Os dados são demonstrados como variação em relação ao controle (*fold change*).

2.7 Análise dos níveis de Ca^{2+} no RE de neurônios

A análise dos níveis de Ca^{2+} estocados no RE, foi realizada indiretamente através do monitoramento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após expor os neurônios a agentes indutores da liberação de Ca^{2+} do RE, Ionomicina ($1\mu\text{M}$) e thapsigargina ($0,5\mu\text{M}$) (Sigma) (Tu, Nelson *et al.*, 2006; Wu, Yamaguchi *et al.*, 2013).

As análises foram realizadas utilizando Fluo4 conforme protocolo já descrito, após a escolha de um campo, randomicamente, 100 imagens seriadas com 3 segundos de intervalo foram capturadas sendo que na 10^o imagem Ionomicina ou Thapsigargina foram adicionadas visando induzir a liberação de Ca^{2+} estocados no RE.

A quantificação dos níveis de Ca^{2+} estocados no RE foi primariamente realizada analisando-se as mudanças de intensidades de Fluo4, normalizadas pelo *background*, durante o período de captura das imagens e secundariamente pela razão entre os pontos de máxima e mínima intensidade obtidos durante a realização dos experimentos, permitindo a comparação direta dos níveis de Ca^{2+} liberados pelo RE nas diferentes linhagens. Os dados são demonstrados como variação em relação ao controle (*fold change*).

2.8 Análise do transporte, potencial de membrana e densidade mitocondrial em neurônios

Para análise do transporte mitocondrial os neurônios foram transfectados com o vetor DsRed Mito (Clontech) conforme descrito anteriormente. Após 48 horas de transfecção o transporte mitocondrial foi avaliado usando microscópio de fluorescência Nikon acoplado a CoolSnap câmera, em câmara de incubação

á 37°C, 5% CO₂, utilizando a objetiva de 63x. A análise do transporte foi realizada através da captura de 121 imagens seriadas com intervalo de 1 segundo, exposição de 100 milissegundos, de 3 neurônios escolhidos randomicamente em cada placa analisada. As imagens seriadas foram analisadas e quantificadas utilizando-se o protocolo descrito anteriormente. Os dados referentes a percentagem de mitocôndrias móveis, seguindo na direção retrógrada ou anterógrada, e estacionárias foram acessados.

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado utilizando-se do *probe* ratiométrico JC-1 amplamente utilizado no monitoramento do potencial de membrana mitocondrial. JC-1 quando excitado (488nm) tem emissão em dois comprimentos de onda, 529nm e 590nm, a despolarização mitocondrial induz a diminuição da emissão no comprimento de onda de 590nm, devido a inibição da formação de agregados intramitocondriais de JC-1 que estimulam a emissão no comprimento de onda de 590nm.

No entanto a emissão no comprimento de onda de 529 não é dependente da agregação de JC1, logo a relação entre a emissão em 590/529 permite a análise ratiométrica do potencial de membrana mitocondrial onde a redução dessa relação ilustra despolarização mitocondrial. A análise do potencial de membrana utilizando JC-1 (Invitrogen) foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante utilizando de neurônios plaqueados em placas de 96 poços analisadas em fluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

A densidade mitocondrial no corpo celular dos neurônios cultivados foi acessada através de ensaios imunocitoquímicos avaliando a área de marcação da subunidade α do complexo Piruvato Desidrogenase (PDH) (complexo localizado no interior das mitocôndrias permitindo a marcação destas) em

relação a marcação obtida com MAP2. Resumidamente neurônios foram fixados em solução de 4% paraformaldeído 4% D-Glucose por 10 minutos em temperatura ambiente, e então processado conforme protocolo descrito anteriormente utilizando-se os anticorpos anti-PDH (msp06, Mito sciences) e anti-MAP2 (ab 5392, Abcam), seguindo pela incubação de anticorpos secundários conjugados a diferentes fluorocromos, usando o programa Imagej a marcação de PDH foi normalizada pela marcação de MAP2.

2.9 Análise dos níveis de Miro em neurônios

2.9.1 Análise dos níveis de Miro por Western blot

Os extratos proteicos das culturas foram submetidos a Western blot conforme detalhado anteriormente. O anticorpo anti-Miro 1 (HPA010687, Sigma) na concentração de 1/1000 e o anticorpo secundário anti-coelho (1/10000) conjugado a HRP foram utilizados. Após revelação as membranas foram submetidas a nova marcação com anticorpo contra a β -actina (1:1000, C4, Santa Cruz), para normalização. Os filmes foram quantificados por densitometria óptica e os dados são mostrados em unidades arbitrárias (a.u.).

2.9.2 Análise dos níveis de Miro por Imunocitoquímica

Neurônios foram fixados em solução de 4% paraformaldeído 4% D-Glucose por 10 minutos em temperatura ambiente, e então processado conforme protocolo descrito anteriormente utilizando-se os anticorpos anti-subunidade α do complexo Piruvato Desidrogenase (PDH) (msp06, Mito sciences), anti-Miro 1

(HPA010687, Sigma) e anti-MAP2 (ab 5392, Abcam), seguindo pela incubação de anticorpos secundários conjugados a diferentes fluorocromos.

As marcações foram analisadas utilizando-se do microscópio confocal Zeiss anteriormente citado. Fotomicrografias de 3 campos escolhidos randomicamente por placa foram capturadas e processadas utilizando o programa ImageJ, sendo acessados os dados referente ao tamanho das marcações e o percentual da área total ocupada pelas marcações (normalizado pela marcação com MAP2) nos corpos celulares neuronais.

2.10 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão em neurônios

As análises foram realizadas no centro de microscopia eletrônica da UCSD (UCSD Electron Microscopy Facility) conforme protocolo padronizado pelo centro. Os neurônios foram fixados em solução contendo 4% paraformaldeído e 0,1M de cacodilato sódio (Tampão SC) (Sigma) (pH 7,3) e posteriormente incubados em tampão SC suplementado com 2% Glutaraldeído durante 24 horas. Após o período de incubação as células foram lavadas 3 vezes em tampão SC e então pós-fixadas e marcadas com 1% tetróxido de ósmio (OsO₄) (Sigma) e 1,5% ferrocianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆) (Sigma) diluído no tampão SC durante 90 minutos à 4°C.

As amostras foram lavadas 3 vezes em tampão SC, uma vez em água MilliQ, aplicadas a uma bateria de desidratação em álcool e marcadas com ouro para microscopia eletrônica de varredura. As amostras utilizadas para microscopia eletrônica de transmissão após o procedimento de pós-fixação foram imersas 2 vezes em acetona e posteriormente expostas a solução 50% acetona e 50% Ducurpan (Sigma) durante 2 horas, sob agitação, seguido pela

incubação em solução 100% Ducurpan durante 3 dias, sob agitação, sendo essa solução trocada a cada 24 horas.

As mostras foram então seccionadas, montadas, marcadas com 2% acetato de uranilo $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Sigma) durante 5 minutos e com Sato (0,2g de citrato de chumbo, 0,15g de nitrato de chumbo, 0,15g de acetato de chumbo, 1g de citrato de sódio, 41ml de água e 9 ml de NaOH 1N) durante 1 minuto. As amostras foram então visualizadas utilizando JEOL 1200EX II (JEOL, Peabody, MA) para microscopia eletrônica de transmissão e FEI XL ESEM-FEG (FEI, Hillsboro, OR) para microscopia eletrônica de varredura.

2.11 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados através de análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) associado ao pós teste Tukey ou teste T de *Student*, acessados utilizando o programa *GraphPad Prism* para Windows (versão 5.0, *GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA), comparando os genótipos wt/wt, wt/ ΔE9 and $\Delta\text{E9}/\Delta\text{E9}$.

Os experimentos foram realizados com duas culturas neuronais para cada genótipo, diferenciados de diferentes iPSCs, realizados em triplicatas e repetidos por no mínimo duas vezes. O nível máximo de erro de 5% ($p < 0,05$) foi adotado para considerar como significativas as diferenças dos resultados entre os grupos. Os resultados são mostrados como média e erro padrão da média (SEM).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos neurônios

Woodruff e colaboradores (2013) caracterizaram extensivamente os neurônios diferenciados a partir dessas iPSCs isogênicas, demonstrando que a inserção da mutação nas diferentes doses não afeta a pluripotência ou o percentual de NPC e neurônios obtidos durante o processo de diferenciação.

Nós estendermos essa caracterização, inicialmente mostrando que todos os neurônios purificados (Figura 38A), independentemente de seu genótipo, expressam MAP2 e apresentam variações espontâneas e sincronizadas dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático (Figura 38B e C).

Figura 38. Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade à MAP2 nos neurônios isogênicos purificados dos diferentes genótipos (A). As imagens foram capturadas na objetiva de 40X e escala = 30µm. Fotomicrografias em cores artificiais ilustrando neurônios wt/wt marcados com Fluo4, ROI (regiões de interesse) foram desenhados nos corpos celulares de 8 neurônios (B), os quais tiveram a intensidade da fluorescência de Fluo4, ao longo do tempo de análise plotada (C). As imagens em (B) foram capturadas na objetiva de 20X, zoom de 3X e escala = 50µm.

A detecção de variações espontâneas e sincronizadas dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, sugerem a existência de atividade neural e possivelmente a formação de circuitos neuronais nos neurônios cultivados, nós avaliamos essa hipótese indiretamente realizando análises ultraestruturais, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) visando verificar a existência de contato físico entre os neurônios cultivados, bem como a extensão do prolongamento neuronais em cultura.

As fotomicrografias obtidas pela MEV demonstraram que os neurônios cultivados, independente do genótipo analisado, apresentam uma rede densa e extensa de prolongamentos, os quais estabelecem contatos físicos entre as células cultivadas (Figura 39).

Figura 39. Eletromicrografias ilustrando corpos celulares e prolongamentos de neurônios isogênicos purificados wt/wt. Escala = 20 μm .

3.2 Análise dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} em NPC e neurônios

Tu e colaboradores (2006) descreveram PS1 como um canal de extravasamento de Ca^{2+} localizado na membrana do RE e demonstraram que mutações relacionadas com fDA podem modificar os níveis de extravasamento de Ca^{2+} por este canal (Nelson, Tu *et al.*, 2007; Zhang, Sun *et al.*, 2010), sendo a mutação ΔE9 a única que induz um ganho de função relacionado a extravasamento de Ca^{2+} por este canais.

Com base nessas evidências desenvolvemos a seguinte hipótese: se ΔE9 induz o aumento extravasamento de Ca^{2+} proveniente do RE para o citoplasma, consequentemente os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos estariam elevados em células contendo essa mutação, nós então avaliamos essa hipótese inicialmente analisando os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em NPC e neurônios e posteriormente analisando os níveis de Ca^{2+} estocados no RE.

Foi observado que a mutação ΔE9 em PS1 em heterozigose e homozigose aumentava em 15% e 30%, respectivamente, os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em NPC (Figura 40). Em neurônios PS1 ΔE9 induziu novamente o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos, 10% em heterozigose e 20% em homozigose (Figura 41). A robustez das análises foi aumentada pelo emprego de técnicas ratiométricas para aferir os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em neurônios. Novamente identificamos o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos Ca^{2+} em neurônios contendo PS1 ΔE9 (Figura 42).

Figura 40. Fotomicrografias em cores artificiais ilustrando NPCs marcadas com Fluo4 (A). As imagens foram capturadas na objetiva de 20X e escala = 40μm. Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em NPCs (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como *fold change* ± SEM. *** $p < 0,001$ em relação wt/wt de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os números nas barras representam o N experimental.

A elevação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos corrobora nossa hipótese, no entanto, PS1ΔE9 pode não ser o fator primário indutor dessas alterações uma vez que a produção de Aβ42 pode elevar os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (Zhu, Yinwen Judy, Lin, Hai *et al.*, 2000; Shankar, Bloodgood *et al.*, 2007), já que Woodruff e colaboradores (2013) demonstram aumento da produção de Aβ42 associado a PS1ΔE9 nestes neurônios. Então visando excluir a possibilidade do aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos serem secundários à disfunção no extravasamento de Ca^{2+} induzido por Aβ42, quantificamos os níveis Ca^{2+} armazenados no RE.

Figura 41. Fotomicrografias em cores artificiais ilustrando neurônios marcados com Fluo4 (A). As imagens foram capturadas na objetiva de 20X e escala = 40μm. Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em neurônios (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como *fold change* ± SEM. *** p < 0,001 em relação wt/wt de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os números nas barras representam o N experimental.

Figura 42. Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos em neurônios utilizando as técnicas ratiométricas Fluo4/FuraRed (A) e GCaMP6f/mCherry (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como *fold change* ± SEM. *** p < 0,001 em relação wt/wt de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=70 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

3.3 Análise dos níveis de Ca^{2+} no RE de neurônios

A análise dos níveis de Ca^{2+} armazenados no RE foi realizado de forma indireta, via monitoramento de alterações dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} após, a indução da liberação do Ca^{2+} estocado no RE. Nossas análises demonstraram que PS1 Δ E9 tanto em heterozigose como homozigose diminui em 20% a quantidade de Ca^{2+} liberados pelo RE, após a exposição a ionomicina, em relação ao controle (Figura 43). A utilização de Thapsigargina, outra substância capaz de induzir a depleção dos níveis de Ca^{2+} armazenados no RE, também demonstrou que PS1 Δ E9 reduz a quantidade de Ca^{2+} liberado no citoplasma (Figura 44).

Interessantemente a diminuição de 20% nos níveis de Ca^{2+} parece correlacionar-se com o aumento também de 20% observado nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos nos neurônios homozigotos para PS1 Δ E9. Logo, as análises realizadas sugerem que o ganho de função relacionada ao extravasamento de Ca^{2+} do RE através de PS1 Δ E9, aparenta ser o fator primário no aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático.

3.4 Análise do transporte mitocondrial em neurônios

O aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos, encontrado associado a PS1 Δ E9 nos fornece um cenário ideal para análise da influência dos níveis de Ca^{2+} sobre a mobilidade mitocondrial e da possível participação do mecanismo de regulação via Miro sobre o transporte mitocondrial durante a neurodegeneração em DA.

Figura 43. Fotomicrografias seriadas em cores artificiais ilustrando neurônios marcados com Fluo4 em diferentes frames durante a análise dos níveis de Ca^{2+} liberados pelo RE, no 10º frame Ionomicina foi adicionada às culturas (A). As imagens foram capturadas na objetiva de 20X e escala = 40 μm . Monitoramento da intensidade da fluorescência emitida por Fluo4 durante todo o experimento de análise dos níveis de Ca^{2+} liberados pelo RE (B) Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após a depleção dos níveis de Ca^{2+} do RE (razão entre as intensidades máxima e mínima obtidas durante o experimento) (C). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como *fold change* $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ em relação wt/wt de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os números nas barras representam o N experimental.

Figura 44. Monitoramento da intensidade da fluorescência emitida por Fluo4 durante todo o experimento de análise dos níveis de Ca^{2+} liberados pelo RE, no 10º frame Thapsigargina foi adicionada as culturas (A) Quantificação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos após a depleção dos níveis de Ca^{2+} do RE (razão entre as intensidades máxima e mínima obtidas durante o experimento) (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como *fold change* $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ em relação wt/wt de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. N=45 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Recentemente disfunções mitocondriais foram descritas associadas com mutações em PS1 (Sepulveda-Falla, Barrera-Ocampo *et al.*, 2014), sugerindo a influência direta de PS1 sobre a homeostase mitocondrial. Então, com o objetivo verificar se PS1 Δ E9 induziria alterações na homeostase mitocondrial realizamos experimentos analisado indiretamente o potencial de membrana mitocondrial, densidade mitocondrial, através da marcação com PDH, e a análise ultraestrutural da morfologia mitocondrial.

Embora PS1 tenha sido relacionado com alterações na homeostase mitocondrial, nossas análises do potencial de membrana, densidade e morfologia mitocondriais, não mostraram evidências sugerindo disfunção mitocondrial em neurônios homozigotos para PS1 Δ E9 (Figura 45). Realizamos então a análise do transporte mitocondrial nessas células, nossas análises demonstram que PS1 Δ E9 independe da dose gênica, não induz alterações, no

número de mitocôndria móveis ou na direção do transporte mitocondrial (Figura 46).

Os resultados obtidos sugerem que o aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos induzidos por PS1 ΔE9 não são capazes de induzir o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial via Miro.

Figura 45. Quantificação indireta do potencial de membrana mitocondrial através da razão entre a intensidade de fluorescência de JC-1 emitida em 590nm e 529nm (A). Quantificação da área de marcação de PDH nos corpos celulares neuronais, normalizada pela área total dos corpos celulares aferida pela marcação com MAP2 (B). Eletromicrografias ilustrando mitocôndrias nos corpos celulares de neurônios. Note que características como inchamento mitocondrial ou alteração da crista mitocondrial típicas de mitocôndrias não funcionais não são observadas. Escala = 500nm (C). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias. Resultados analisados por teste T de Student (A) e

análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey (B). N=4 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Figura 46. Fotomicrografias ilustrando mitocôndria nos axônios de neurônios transfectados com DsRed-mito e kimógrafos demonstrando as mitocôndrias ilustradas nas fotomicrografias durante todo o período do experimento (A). As imagens foram capturadas na objetiva de 63X e escala = 40 μ m. Quantificação do percentual de mitocôndrias móveis (B), número de mitocôndrias movimentando se retrógradamente (C) e anterógradamente (D) por frame. Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias. Resultados analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. Os números nas barras representam o N experimental.

3.5 Análise dos níveis de Miro

Os níveis de Miro em neurônios homozigotos PS1 Δ E9 foram quantificados com o intuito de verificar se a inexistência da modulação promovida pelo Ca²⁺ sobre o transporte mitocondrial estaria relacionada com alterações nos níveis de Miro. Não foram identificadas alterações significativas nos níveis de miro tanto por meio da técnica de western blot como por imunocitoquímica (Figura 47). A figura 48 sumariza as alterações encontradas nos neurônios homozigotos para PS1 Δ E9.

Figura 47. Análise dos níveis de Miro em neurônios (A). Quantificação da área de marcação de Miro nos corpos celulares neuronais, normalizada pela área total dos corpos celulares aferida pela marcação com MAP2 (B). Os dados representam a junção dos experimentos realizados e são demonstrados como média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias. Resultados analisados por teste T de Student (A) e análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey (B). N=4 sendo as análises repetidas no mínimo 2 vezes.

Figura 48. Esquema exibindo o resumo dos resultados obtido em neurônios homozigotos para PS1 $\Delta E9$ em relação a neurônios PS1 controle (WT) disposto em menor tamanho no canto esquerdo. As caixas em amarelo resumem as respostas obtidas após a análise dos parâmetros (níveis Ca^{2+} citoplasmáticos, níveis Ca^{2+} do RE, mobilidade mitocondrial, homeostase mitocondrial e níveis de Miro).

4. DISCUSSÃO

Nesse estudo, nós demonstramos que a mutação PS1 Δ E9 expressada em níveis endógenos em neurônios isogênicos humanos, induz o aumento dos níveis de Ca²⁺ citoplasmático, provavelmente por aumento do extravasamento de Ca²⁺ armazenado no RE através de PS1, sendo esse aumento insuficiente para induzir alterações no potencial de membrana mitocondrial, número de mitocôndrias, morfologia mitocondrial ou induzir o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial dependente de Ca²⁺ via Miro.

Disfunções nos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ em modelos de AD são amplamente relatadas desde 1990 (Ito, E, Oka, K *et al.*, 1994), a maioria desses modelos estão associados a fDA em PS1 e PS2 (Hirashima, Etcheberrigaray *et al.*, 1996), já que mutações em APP, não induzem modificações nos níveis de Ca²⁺ citoplasmático (Stieren, Werchan *et al.*, 2010).

PS1 é o domínio proteolítico do complexo γ -secretase, sendo esta considerada sua principal atividade. No entanto, funções de PS1 independente da atividade de γ -secretase foram descritas são relacionadas com sua capacidade de modular componentes regulatórios da homeostase do Ca²⁺ como bomba SERCA (Green, Demuro *et al.*, 2008), os receptores de inositol trifosfato (IP3R) (Cheung, Shineman *et al.*, 2008), receptores rianodina (RyR) (Wu, Yamaguchi *et al.*, 2013) e sítios de contato entre RE e mitocôndria (Zampese, Fasolato *et al.*, 2011).

Tu e colaboradores em uma série de estudos (Tu, Nelson *et al.*, 2006; Nelson, Tu *et al.*, 2007; Zhang, Sun *et al.*, 2010) postularam que PS1 atuaria diretamente na homeostase do Ca²⁺ através de sua atividade como canal de extravasamento de Ca²⁺ localizado na membrana do RE e que mutações

relacionadas com fDA alterariam a função deste canal e consecutivamente as concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} . Estudos estruturais investigando a estrutura molecular de PS1 validaram essa hipótese ao demonstrarem que PS1 possui um poro permeável à água através da qual o Ca^{2+} poderia ser extravasado (Li, Lu *et al.*, 2014).

O aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} já foi relatado em modelos superexpressando PS1 Δ E9 em células não neuronais e animais transgênicos (Cedazo-MíNquez, Popescu *et al.*, 2002; Boyle, Hettiarachchi *et al.*, 2012; Sepulveda-Falla, Barrera-Ocampo *et al.*, 2014). Nesse estudo descrevemos que neurônios isogênicos expressando PS1 Δ E9, em níveis endógenos, apresentam aumento nos níveis citoplasmático de Ca^{2+} associado a diminuição dos níveis de Ca^{2+} armazenados no ER, o que corrobora a hipótese de Tu e colaboradores 2006.

Em nosso modelo, o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático é acompanhado pela diminuição dos níveis de Ca^{2+} estocados no RE, o que exclui a possibilidade do aumento dos níveis de Ca^{2+} ocorrerem devido ao aumento da síntese A β 42, elevada nessas células (Woodruff, Young *et al.*, 2013), tendo em vista que os mecanismos descritos referentes ao efeito de A β 42 não incluem redução dos níveis de Ca^{2+} estocados no RE (Bezprozvanny e Mattson, 2008).

Logo, nossos dados demonstram que PS1 Δ E9 induz aumento nos níveis de Ca^{2+} , o que pode ser importante para etiologia de DA, no entanto, novos experimentos necessitam ser realizado verificando a influência de PS1 Δ E9 sobre os outros componentes envolvidos na regulação da homeostase do Ca^{2+} .

Tendo obtidos esses resultados de que PS1 Δ E9 induz aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺, avaliou-se a influência desses níveis aumentados de Ca²⁺ sobre a mobilidade mitocondrial associado a Miro.

Inicialmente analisaram-se os parâmetros relacionados com a disfunção da homeostase mitocondrial, os quais não mostraram alterações que sugerissem disfunções mitocondriais nos neurônios com PS1 Δ E9 em homozigose. Então analisou-se a mobilidade mitocondrial nesses neurônios, porém novamente não foram detectadas alterações na mobilidade mitocondrial, bem como nos níveis de Miro, associada à PS1 Δ E9.

Nossos resultados corroboram os recentes dados de Sepulveda e colaboradores (2014) que sugerem que a superexpressão de PS1 Δ E9 não afeta o transporte mitocondrial e os níveis de Miro em condições basais de Ca²⁺, no entanto, é capaz de induzir modificações nesse parâmetros quando acompanhada ao aumento do níveis de Ca²⁺ citoplasmático associado a exposição a ionóforos.

Além disso, nossos resultados concordam com os dados obtidos utilizando o modelo de neurodegeneração associado a exposição à rotenona uma vez que encontramos alterações significativas nos níveis de Ca²⁺ citoplasmático, as quais não são suficientes para modular a mobilidade mitocondrial, o que sugere como discutido anteriormente que os aumentos níveis de Ca²⁺ citoplasmático induzidos tanto pela rotenona como pela PS1 Δ E9 não são capazes de atingir o limiar de ativação do mecanismo Ca²⁺ dependente de inibição do transporte mitocondrial.

Logo, os mecanismos de inibição do transporte mitocondrial via elevações de Ca²⁺ citoplasmático aparentam ter um cunho mais citoprotetor do que

regulatório, embora estes possam atuar durante a despolarização neuronal (Chen e Sheng, 2013). Desta forma, o íon regularia o transporte mitocondrial durante situações anormais como excitotoxicidade glutamatérgica ou epilepsia, os quais são quadros associados com o massivo aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (Wang e Schwarz, 2009).

Assim, os dados apresentados nesse estudo e os obtidos por Sepulveda e colaboradores (2014) sugerem que os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos só influenciariam o transporte mitocondrial quando presentes em alta magnitude como por exemplo, durante potenciais de ação ou liberação de Ca^{2+} pela mitocôndrias ou via disfunções relacionadas com agregação de proteínas como A β 42 ou Tau. Sugerindo que o aumento dos níveis de Ca^{2+} podem ser importantes para a etiologia da DA porém, só induzem disfunções quando associados a outras alterações como agregação de A β 42 ou Tau que maximizam essas alterações iniciais.

Entretanto, é importante notar que nossos resultados não descartam a importância do aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático e alterações na mobilidade mitocondrial para etiologia de DA, eles somente não comprovam a hipótese de o transporte mitocondrial estar inibido devido ao aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático induzidos por PS1 Δ E9 no nosso modelo. Além disso, é importante ressaltar que mesmo nosso modelo sendo associado à uma mutação relacionada com fDA, este não mimetiza todas as características distintas de DA como hiperfosforilação de Tau e formação de agregados proteicos. Embora novos experimentos tenham demonstrado que, com o aumento do tempo de cultivo, os neurônios PS1 Δ E9 mostram aumento dos níveis de Tau

hiperfosforilada, sugerindo a importância do envelhecimento na indução desta disfunção, que também ressalta sua importância na etiologia de DA.

Então, em conjunto nossos dados demonstram que o primeiro efeito de PS1 Δ E9 na homeostase neuronal é o aumento dos níveis de Ca²⁺ citoplasmático associado ao aumento da síntese de A β 42 (Woodruff, Young *et al.*, 2013), independente de alterações na homeostase e mobilidade mitocondrial. No entanto, nós acreditamos que novas análises precisam ser realizadas visando compreender como essas alterações seriam moduladas temporalmente induzido DA e possivelmente reavaliar a mobilidade mitocondrial tardiamente nesse modelo.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados apresentados nesse estudo demonstram que PS1 Δ E9 atua como um ganho de função que induz aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ em NPCs e neurônios, possivelmente por aumento do extravasamento de Ca²⁺ armazenado no RE através de PS1, sendo esse aumento incapaz de induzir o mecanismo de inibição do transporte mitocondrial dependente de Ca²⁺. Desta forma, o aumento do extravasamento de Ca²⁺ armazenado no RE e a alteração da atividade de γ -secretase podem estar relacionadas com os processos patofisiológicos indutores de DA, sendo esse mecanismo inicialmente independente de alteração na mobilidade mitocondrial.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES FINAIS

A exposição à rotenona induz a formação de agregados proteico de forma dose e tempo-dependente permitindo a análise de parâmetros celulares antes, durante e após a formação dos agregados proteicos envolvidos em doenças neurodegenerativas.

A formação dos agregados proteicos normaliza os níveis de ROS e estimula a autofagia, sugerindo a existência de processos neuroprotetores associados a formação dos agregados proteicos.

O transporte mitocondrial e níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} alteram-se antes da formação dos agregados proteicos.

A mobilidade mitocondrial e os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} são modulados de forma dependente do tempo e da região encefálica antes e durante a formação dos agregados proteicos.

Alterações observadas na mobilidade mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteicos não correlacionaram-se com os níveis de citoplasmáticos Ca^{2+} . Logo, a participação de Miro na disfunção do transporte mitocondrial antes e durante a formação dos agregados proteico ainda precisa ser melhor estudada.

PS1 Δ E9 atua como um ganho de função que induz aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , possivelmente por aumento do extravasamento de Ca^{2+} armazenado no RE através de PS1.

PS1 Δ E9 mesmo aumentando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} não induz alterações na mobilidade mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Aguero-Torres, H., L. Fratiglioni, *et al.* Mortality from Dementia in Advanced Age: A 5-Year Follow-Up Study of Incident Dementia Cases. Journal of Clinical Epidemiology, v.52, n.8, p.737-743. 1999.

Aiken, C. T., R. M. Kaake, *et al.* Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. Molecular & Cellular Proteomics : MCP, v.10, n.5, p.R110.006924. 2011.

Aliev, G., M. E. Obrenovich, *et al.* Antioxidant Therapy in Alzheimer's Disease: Theory and Practice. Mini reviews in medicinal chemistry, v.8, n.13, p.1395-1406. 2008.

Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, *et al.* Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. Nat Med, v.2, n.7, Jul, p.783-7. 1996.

Alonso, A. D. C., B. Li, *et al.* Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. PNAS, v.103, n.23, June 6, 2006, p.8864-8869. 2006.

Alonso Adel, C., B. Li, *et al.* Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.23, Jun 6, p.8864-9. 2006.

Andrews-Hanna, J. R., A. Z. Snyder, *et al.* Disruption of Large-Scale Brain Systems in Advanced Aging. Neuron, v.56, n.5, p.924-935. 2007.

Andrews, S., J. Gilley, *et al.* Difference Tracker: ImageJ plugins for fully automated analysis of multiple axonal transport parameters. Journal of Neuroscience Methods, v.193, n.2, p.281-287. 2010.

Arrasate, M., S. Mitra, *et al.* Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. Nature, v.431, n.7010, Oct 14, p.805-10. 2004.

Augustinack, J. C., A. Schneider, *et al.* Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, v.103, n.1, Jan, p.26-35. 2002.

Avila, J., J. J. Lucas, *et al.* Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions, v.84. 2004. 361-384 p.

Barbosa, M. T., P. Caramelli, *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). Movement Disorders, v.21, n.6, p.800-808. 2006.

Barreto-Chang, O. L. e R. E. Dolmetsch. Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. J Vis Exp, n.23, p.e1067. 2009.

Berchtold, N. C., D. H. Cribbs, *et al.* Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.105, n.40, October 7, 2008, p.15605-15610. 2008.

Bermejo-Pareja, F., J. Benito-León, *et al.* Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. Journal of the Neurological Sciences, v.264, n.12, p.63-72. 2008.

Bezprozvanny, I. e M. P. Mattson. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. Trends in Neurosciences, v.31, n.9, p.454-463. 2008.

Boldogh, I. R. e L. A. Pon. Mitochondria on the move. Trends Cell Biol, v.17, n.10, Oct, p.502-10. 2007.

Bouchard, J. e S. A. Villeda. Aging and brain rejuvenation as systemic events. Journal of Neurochemistry, v.132, n.1, p.5-19. 2015.

Boyle, J. P., N. T. Hettiarachchi, *et al.* Cellular consequences of the expression of Alzheimer's disease-causing presenilin 1 mutations in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. Brain Research, v.1443, n.0, p.75-88. 2012.

Buchholz, J. N., E. J. Behringer, *et al.* Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. Aging Cell, v.6, n.3, p.285-296. 2007.

Buckman, J. F., H. Hernández, *et al.* MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. Journal of Neuroscience Methods, v.104, n.2, p.165-176. 2001.

Burkhardt, M. F., F. J. Martinez, *et al.* A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. Molecular and Cellular Neuroscience, v.56, n.0, p.355-364. 2013.

Caceres, A. e K. S. Kosik. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature, v.343, n.6257, p.461-463. 1990.

Cai, Q. e Z.-H. Sheng. Moving or Stopping Mitochondria: Miro as a Traffic Cop by Sensing Calcium. Neuron, v.61, n.4, p.493-496. 2009.

Carrard, G., A.-L. Bulteau, *et al.* Impairment of proteasome structure and function in aging. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.34, n.11, p.1461-1474. 2002.

Carrettiero, D. C., I. Hernandez, *et al.* The Cochaperone BAG2 Sweeps Paired Helical Filament- Insoluble Tau from the Microtubule. The Journal of Neuroscience, v.29, n.7, February 18, 2009, p.2151-2161. 2009.

Castillo, K., M. Nassif, *et al.* Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. Autophagy, v.9, n.9, 2013/09/29, p.1308-1320. 2013.

Cataldo, A. M., C. M. Peterhoff, *et al.* Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. Am J Pathol, v.157, n.1, Jul, p.277-86. 2000.

Cecarini, V., L. Bonfili, *et al.* Crosstalk between the ubiquitin–proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v.1822, n.11, p.1741-1751. 2012.

Cedazo-Mínguez, A., B. O. Popescu, *et al.* The Presenilin 1AE9 Mutation Gives Enhanced Basal Phospholipase C Activity and a Resultant Increase in Intracellular Calcium Concentrations. J. Biol. Chem., v.277, n.39, September 27, 2002, p.36646-36655. 2002.

Cedazo-MíNquez, A., B. O. Popescu, *et al.* The Presenilin 1 Δ E9 Mutation Gives Enhanced Basal Phospholipase C Activity and a Resultant Increase in Intracellular Calcium Concentrations. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.39, September 27, 2002, p.36646-36655. 2002.

Celsi, F., P. Pizzo, *et al.* Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. Biochim Biophys Acta, v.1787, n.5, May, p.335-44. 2009.

Chang, K. T., R. F. Niescier, *et al.* Mitochondrial matrix Ca^{2+} as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.108, n.37, September 13, 2011, p.15456-15461. 2011.

Chaves, R. S., T. Q. Melo, *et al.* Dynein c1h1, dynactin and syntaphilin expression in brain areas related to neurodegenerative diseases following exposure to rotenone. Acta neurobiologiae experimentalis, v.73(4), p.541-56. 2013.

Chaves, R. S., T. Q. Melo, *et al.* 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, v.11, p.144. 2010.

Chen, T.-W., T. J. Wardill, *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature, v.499, n.7458, p.295-300. 2013.

Chen, Y. e Z.-H. Sheng. Kinesin-1–syntaphilin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. The Journal of Cell Biology, v.202, n.2, July 22, 2013, p.351-364. 2013.

Chen, Y. M., C. Gerwin, *et al.* Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons. J Neurosci, v.29, n.30, Jul 29, p.9429-38. 2009.

Cheung, K.-H., D. Shineman, *et al.* Mechanism of Ca^{2+} Disruption in Alzheimer's Disease by Presenilin Regulation of $\text{InsP}(3)$ Receptor Channel Gating. Neuron, v.58, n.6, p.871-883. 2008.

Chevalier-Larsen, E. e E. L. Holzbaur. Axonal transport and neurodegenerative disease. Biochim Biophys Acta, v.1762, n.11-12, Nov-Dec, p.1094-108. 2006.

Choi, W.-S., R. D. Palmiter, *et al.* Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. J Cell Biol v.192, n.5, March 7, 2011, p.873-882. 2011.

Chou, A. P., S. Li, *et al.* Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. Neurotoxicology, v.31, n.4, Aug, p.367-72. 2010.

Christensen, K., G. Doblhammer, *et al.* Ageing populations: the challenges ahead. Lancet, v.374, n.9696, p.1196-1208. 2009.

Chu, Y., G. A. Morfini, *et al.* Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. Brain, v.135, n.7, July 1, 2012, p.2058-2073. 2012.

Chung, C. Y., J. B. Koprach, *et al.* Dynamic Changes in Presynaptic and Axonal Transport Proteins Combined with Striatal Neuroinflammation Precede Dopaminergic Neuronal Loss in a Rat Model of AAV alpha-Synucleinopathy. 29: 3365-3373 p. 2009.

Churcher, I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. Curr Top Med Chem, v.6, n.6, p.579-95. 2006.

Ciechanover, A. e P. Brundin. The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases: Sometimes the Chicken, Sometimes the Egg. Neuron, v.40, n.2, p.427-446. 2003.

Congdon, E. E. e K. E. Duff. Is Tau Aggregation Toxic or Protective? Journal of Alzheimer's Disease, v.14, n.4, p.453-457. 2008.

Cooper, O., H. Seo, *et al.* Familial Parkinson's disease iPSCs show cellular deficits in mitochondrial responses that can be pharmacologically rescued. Science translational medicine, v.4, n.141, p.141ra90-141ra90. 2012.

Costa, D. L. Causes of Improving Health and Longevity at Older Ages: A Review of the Explanations. Genus, v.51, p. 21-38. 2005.

Crews, D. E. Senescence, Aging, and Disease. Journal of physiological anthropology, v.26, n.3, p.365-372. 2007.

Da-Silva, W. S., A. Gómez-Puyou, *et al.* Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense: steady state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.38, September 17, 2004, p.39846-39855. 2004.

Dalle-Donne, I., D. Giustarini, *et al.* Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med, v.9, n.4, Apr, p.169-76. 2003.

Daniel, F. e F. Thomas. The Evolution of Aging. Nature Education Knowledge v.3, n.10. 2011.

Danzer, K. M., D. Haasen, *et al.* Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. J Neurosci, v.27, n.34, Aug 22, p.9220-32. 2007.

David, D. C., R. Layfield, *et al.* Proteasomal degradation of tau protein. Journal of Neurochemistry, v.83, n.1, p.176-185. 2002.

Dayan, A. D. Quantitative histological studies on the aged human brain. I. Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients. Acta Neuropathol, v.16, n.2, p.85-94. 1970.

De Calignon, A., L. M. Fox, *et al.* Caspase activation precedes and leads to tangles. Nature, v.464, n.7292, Apr 22, p.1201-4. 2010.

De Strooper, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. EMBO Rep, v.8, n.2, Feb, p.141-6. 2007.

Decarli, C., J. Massaro, *et al.* Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal. Neurobiology of Aging, v.26, n.4, p.491-510. 2005.

Del Hoyo, P., A. Garcia-Redondo, *et al.* Oxidative stress in skin fibroblasts cultures from patients with Parkinson's disease. BMC Neurology, v.10, n.1, p.95. 2010.

Devlin, A.-C., K. Burr, *et al.* Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. Nat Commun, v.6. 2015.

Diaz-Corrales, F. J., M. Asanuma, *et al.* Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. Neuroscience, v.133, n.1, p.117-135. 2005.

Ding, Q. e J. N. Keller. Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. Journal of Neurochemistry, v.77, n.4, p.1010-1017. 2001.

Ding, Q., Y.-K. Lee, *et al.* A TALEN genome editing system to generate human stem cell-based disease models. Cell Stem Cell, v.12, n.2, p.238-251. 2013.

Dixit, R., J. L. Ross, *et al.* Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. Science, v.319, n.5866, February 22, 2008, p.1086-1089. 2008.

Duka, T., V. Duka, *et al.* a-Synuclein contributes to GSK-3B-catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. FASEB J., v.23, n.9, September 1, 2009, p.2820-2830. 2009.

Dukes, A. A., K. M. Korwek, *et al.* The effect of endogenous dopamine in rotenone-induced toxicity in PC12 cells. Antioxid Redox Signal, v.7, n.5-6, May-Jun, p.630-8. 2005.

Esiri, M. M. Ageing and the brain. J Pathol, v.211, n.2, Jan, p.181-7. 2007.

Esmaeli-Azad, B., J. H. Mccarty, *et al.* Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. Journal of Cell Science, v.107, n.4, April 1, 1994, p.869-879. 1994.

Evans, W. J. e I. H. Rosenberg. Biomarkers: The 10 Keys to Prolonging Vitality. Fireside. New York.: Touchstone. 1991

Fan, Q.-W., W. Yu, *et al.* Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. Journal of Neurochemistry, v.76, n.2, p.391-400. 2001.

Feng, Y., Z. H. Liang, *et al.* alpha-Synuclein redistributed and aggregated in rotenone-induced Parkinson's disease rats. Neurosci Bull, v.22, n.5, Sep, p.288-93. 2006.

Figueiredo, C. P., J. R. Clarke, *et al.* Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A β Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers. The Journal of Neuroscience, v.33, n.23, June 5, 2013, p.9626-9634. 2013.

Forlenza, O. V., C. A. Torres, *et al.* Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Journal of Psychiatric Research, v.45, n.2, p.220-224. 2011.

Fransson, A., A. Ruusala, *et al.* Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. J Biol Chem, v.278, n.8, Feb 21, p.6495-502. 2003.

Fransson, A., A. Ruusala, *et al.* The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.344, n.2, p.500-510. 2006.

Frederick, R. L., J. M. Mccaffery, *et al.* Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. J Cell Biol, v.167, n.1, Oct 11, p.87-98. 2004.

Freestone, P. S., K. K. H. Chung, *et al.* Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons – involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca²⁺ homeostasis. European Journal of Neuroscience, v.30, n.10, p.1849-1859. 2009.

Furukawa, K., M. Matsuzaki-Kobayashi, *et al.* Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. J Neurochem, v.97, n.4, May, p.1071-7. 2006.

Ganot, N., S. Meker, *et al.* Anticancer Metal Complexes: Synthesis and Cytotoxicity Evaluation by the MTT Assay. n.81, 2013/11/10/, p.e50767. 2013.

Gems, D. e L. Partridge. Genetics of Longevity in Model Organisms: Debates and Paradigm Shifts. Annual Review of Physiology, v.75, n.1, p.621-644. 2013.

Gibb, W. R. e A. J. Lees. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.51, n.6, Jun, p.745-52. 1988.

Gispert-Sanchez, S. e G. Auburger. The role of protein aggregates in neuronal pathology: guilty, innocent, or just trying to help? J Neural Transm Suppl, n.70, p.111-7. 2006.

Gladyshev, V. N. On the cause of aging and control of lifespan. BioEssays, v.34, n.11, p.925-929. 2012.

Gleichmann, M. e M. P. Mattson. Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation. Antioxid Redox Signal, Nov 30. 2010.

Gore, A., Z. Li, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature, v.471, n.7336, p.63-67. 2011.

Green, K. N., A. Demuro, *et al.* SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid β production. The Journal of Cell Biology, v.181, n.7, June 30, 2008, p.1107-1116. 2008.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci USA v.83, n.13, July 1, 1986, p.4913-4917. 1986.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.83, n.13, July 1, 1986, p.4913-4917. 1986.

Haass, C. e D. J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.2, Feb, p.101-12. 2007.

Hardy, J. e D. J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, v.297, n.5580, Jul 19, p.353-6. 2002.

Harman, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. Journal of Gerontology, v.11, n.3, July 1, 1956, p.298-300. 1956.

Hayflick, L. Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem. Annals of the New York Academy of Sciences, v.1100, n.1, p.1-13. 2007.

Hebert, L., P. A. Scherr, *et al.* Alzheimer disease in the us population: Prevalence estimates using the 2000 census. Archives of Neurology, v.60, n.8, p.1119-1122. 2003.

Hensley, K., J. M. Carney, *et al.* A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.8, Apr 12, p.3270-4. 1994.

Herrera, E., P. Caramelli, *et al.* Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Psiquiatr Clin, v.25, p.70-3. 1998.

Hipp, M. S., C. N. Patel, *et al.* Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. The Journal of Cell Biology, v.196, n.5, March 5, 2012, p.573-587. 2012.

Hirashima, N., R. Etcheberrigaray, *et al.* Calcium responses in human fibroblasts: A diagnostic molecular profile for Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, v.17, n.4, p.549-555. 1996.

Hoglinger, G. U., A. Lannuzel, *et al.* The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. J Neurochem, v.95, n.4, Nov, p.930-9. 2005.

Hollenbeck, P. J. e W. M. Saxton. The axonal transport of mitochondria. J Cell Sci, v.118, n.Pt 23, Dec 1, p.5411-9. 2005.

Hongo, H., T. Kihara, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.426, n.1, p.94-99. 2012.

Houlden, H., M. Baker, *et al.* Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid- β concentrations. Annals of Neurology, v.48, n.5, p.806-808. 2000.

Huang, J., L. Hao, *et al.* Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation. Brain Res, v.1279, Jul 7, p.1-8. 2009.

Hyun, D.-H., M. Lee, *et al.* Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins. Journal of Neurochemistry, v.86, n.2, p.363-373. 2003.

Iacopino, A. M. e S. Christakos. Corticosterone regulates calbindin-D28k mRNA and protein levels in rat hippocampus. J. Biol. Chem, v.265, n.18, June 25, 1990, p.10177-10180. 1990.

Ilic, T. V., M. Jovanovic, *et al.* Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. Funct Neurol, v.14, n.3, Jul-Sep, p.141-7. 1999.

Isaacs, A. M., D. B. Senn, *et al.* Acceleration of Amyloid β -Peptide Aggregation by Physiological Concentrations of Calcium. Journal of Biological Chemistry, v.281, n.38, September 22, 2006, p.27916-27923. 2006.

Israel, M. A., S. H. Yuan, *et al.* Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. Nature, v.482, n.7384, p.216-220. 2012.

Ito, E., K. Oka, *et al.* Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.91, n.2, p.534-538. 1994.

Ito, E., K. Oka, *et al.* Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.91, n.2, January 18, 1994, p.534-538. 1994.

Kabeya, Y., N. Mizushima, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, v.19. 2000. 5720-5728 p.

Kang, J. S., J. H. Tian, *et al.* Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. Cell, v.132, n.1, Jan 11, p.137-48. 2008.

Kawamoto, E. M., C. D. Munhoz, *et al.* Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, v.26, n.6, p.857-864. 2005.

Keller, J. N., K. B. Hanni, *et al.* Impaired Proteasome Function in Alzheimer's Disease. J Neurochem, v.75, n.1, p.436-439. 2000.

Kenyon, C. J. The genetics of ageing. Nature, v.464, n.7288, p.504-512. 2010.

Kevin Kinsella, H. W. International Population Reports, P95/09-1, An Aging World: 2008. U.S. Government Printing Office. 2009.

Kiffin, R., U. Bandyopadhyay, *et al.* Oxidative Stress and Autophagy. Antioxidants & Redox Signaling, v.8, n.1-2, 2006/01/01, p.152-162. 2006.

Kimura, S., T. Noda, *et al.* Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. Autophagy, v.3, n.5, 2007/09/20, p.452-460. 2007.

Kirkwood, T. B. L. Understanding the Odd Science of Aging. Cell, v.120, n.4, p.437-447. 2005.

Kivell, B. M., F. J. McDonald, *et al.* Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. Brain Res Brain Res Protoc, v.6, n.3, Feb, p.91-9. 2001.

Kondo, T., M. Asai, *et al.* Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness. Cell Stem Cell, v.12, n.4, p.487-496. 2013.

Kourie, J. I. e A. A. Shorthouse. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. Am J Physiol Cell Physiol, v.278, n.6, Jun, p.C1063-87. 2000.

Kovacic, P. e R. Somanathan. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. Curr Neuroparmacol, v.10, n.4, Dec, p.289-302. 2012.

Lazarov, O., G. A. Morfini, *et al.* Impairments in Fast Axonal Transport and Motor Neuron Deficits in Transgenic Mice Expressing Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutant Presenilin 1. J Neurosci, v.27, n.26, June 27, 2007, p.7011-7020. 2007.

Lee, H.-J., F. Khoshaghideh, *et al.* Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of α -synuclein. European Journal of Neuroscience, v.24, n.11, p.3153-3162. 2006.

Leroy, K., Z. Yilmaz, *et al.* Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. Neuropathology and Applied Neurobiology, v.33, n.1, p.43-55. 2007.

Lewinski, F. V. e B. U. Keller. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. Trends in Neurosciences, v.28, n.9, p.494-500. 2005.

Li, Y., Stephen h.-J. Lu, *et al.* Structural Interactions between Inhibitor and Substrate Docking Sites Give Insight into Mechanisms of Human PS1 Complexes. Structure(London, England:1993), v.22, n.1, p.125-135. 2014.

Lim, K.-L. e J. Tan. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. BMC Biochemistry, v.8, n.Suppl 1, p.S13. 2007.

Liu, Y., F. Liu, *et al.* Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. FEBS Letters, v.582, n.2, p.359-364. 2007.

Loerch, P. M., T. Lu, *et al.* Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. PLoS ONE, v.3, n.10, p.e3329. 2008.

López-Otín, C., M. A. Blasco, *et al.* The Hallmarks of Aging. Cell, v.153, n.6, p.1194-1217. 2013.

Luo, C., Y. Li, *et al.* Mitochondrial accumulation under oxidative stress is due to defects in autophagy. Journal of Cellular Biochemistry, v.114, n.1, p.212-219. 2013.

Macaskill, A. F., J. E. Rinholm, *et al.* Miro1 Is a Calcium Sensor for Glutamate Receptor-Dependent Localization of Mitochondria at Synapses. Neuron, v.61, n.4, p.541-555. 2009.

Martin, L., X. Latypova, *et al.* Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A. Ageing Research Reviews, v.12, n.1, p.39-49. 2013.

Mattson, M. P., B. Cheng, *et al.* beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J Neurosci, v.12, n.2, Feb, p.376-89. 1992.

Mattson, M. P., M. A. Lovell, *et al.* Comparison of the effects of elevated intracellular aluminum and calcium levels on neuronal survival and tau immunoreactivity. Brain Research, v.602, n.1, p.21-31. 1993.

Mattson, M. P. e T. Magnus. Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci, v.7, n.4, p.278-294. 2006.

Mayeux, R. Epidemiology of neurodegeneration. Annu Rev Neurosci, v.26, p.81-104. 2003.

Mcnaught, K. S., D. P. Perl, *et al.* Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. Ann Neurol, v.56, n.1, Jul, p.149-62. 2004.

Melo, T. Q., M. D'unhao A, *et al.* Rotenone-Dependent Changes of Anterograde Motor Protein Expression and Mitochondrial Mobility in Brain Areas Related to Neurodegenerative Diseases. Cell Mol Neurobiol, Dec 22. 2012.

Menzies, F. M., A. Fleming, *et al.* Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci, v.16, n.6, p.345-357. 2015.

Millecamps, S. e J.-P. Julien. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci, v.14, n.3, p.161-176. 2013.

Millecamps, S. e J. P. Julien. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci, v.14, n.3, Mar, p.161-76. 2013.

Miller, J. C., S. Tan, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotech, v.29, n.2, p.143-148. 2011.

Morfini, G., G. Szebenyi, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. Embo J, v.21, n.3, Feb 1, p.281-93. 2002.

Morgan, A. J. e R. Jacob. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. Biochem J, v.300 (Pt 3), Jun 15, p.665-72. 1994.

Morrison, J. H. e M. G. Baxter. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. Nat Rev Neurosci, v.13, n.4, p.240-250. 2012.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.65, n.1–2, p.55-63. 1983.

Munhall, A. C., Y.-N. Wu, *et al.* NMDA alters rotenone toxicity in rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental area dopamine neurons. NeuroToxicology, v.33, n.3, p.429-435. 2012.

Muntané, G., E. Dalfó, *et al.* Phosphorylation of tau and a-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related a-synucleinopathies. Neuroscience, v.152, n.4, p.913-923. 2008.

Muratore, C. R., H. C. Rice, *et al.* The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. Human Molecular Genetics, February 12, 2014. 2014.

Nair, V. D. e C. W. Olanow. Differential Modulation of Akt/Glycogen Synthase Kinase-3B Pathway Regulates Apoptotic and Cytoprotective Signaling Responses. J Biol Chem., v.283, n.22, May 30, 2008, p.15469-15478. 2008.

Nangaku, M., R. Sato-Yoshitake, *et al.* KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. Cell, v.79, n.7, Dec 30, p.1209-20. 1994.

Navarro, A. e A. Boveris. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. Front Aging Neurosci, v.2. 2010.

Nelson, O., C. Supnet, *et al.* Familial Alzheimer's Disease Mutations in Presenilins: Effects on Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Correlation with Clinical Phenotypes. Journal of Alzheimer's Disease, v.21, n.3, p.781-793. 2010.

Nelson, O., H. Tu, *et al.* Familial Alzheimer disease–linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. The Journal of Clinical Investigation, v.117, n.5, p.1230-1239. 2007.

Nguyen, T. T., S. S. Oh, *et al.* Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.111, n.35, September 2, 2014, p.E3631-E3640. 2014.

Nyfeler, B., P. Bergman, *et al.* Relieving Autophagy and 4EBP1 from Rapamycin Resistance. Molecular and Cellular Biology, v.31, n.14, July 15, 2011, p.2867-2876. 2011.

Pampliega, O., I. Orhon, *et al.* Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. Nature, v.502, n.7470, p.194-200. 2013.

Paredes, R. M., J. C. Etzler, *et al.* Chemical calcium indicators. Methods, v.46, n.3, p.143-151. 2008.

Paxinos, G. e C. Watson. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Academic Press. 2007. 456 p.

Pei, J. J., T. Tanaka, *et al.* Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. J Neuropathol Exp Neurol, v.56, n.1, Jan, p.70-8. 1997.

Pierrot, N., S. F. Santos, *et al.* Calcium-mediated Transient Phosphorylation of Tau and Amyloid Precursor Protein Followed by Intraneuronal Amyloid- β Accumulation. Journal of Biological Chemistry, v.281, n.52, December 29, 2006, p.39907-39914. 2006.

Pigino, G., G. Morfini, *et al.* Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. J Neurosci, v.23, n.11, Jun 1, p.4499-508. 2003.

Planel, E., T. Miyasaka, *et al.* Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease. The Journal of Neuroscience, v.24, n.10, March 10, 2004, p.2401-2411. 2004.

Polajnar, M. e E. Žerovnik. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine, v.18, n.9, p.1705-1711. 2014.

Poppek, D., S. Keck, *et al.* Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. Biochem J, v.400, n.3, Dec 15, p.511-20. 2006.

Price, J. L. e J. C. Morris. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. Ann Neurol, v.45, n.3, Mar, p.358-68. 1999.

Prigione, A. e G. Cortopassi. Mitochondrial DNA deletions induce the adenosine monophosphate-activated protein kinase energy stress pathway and result in decreased secretion of some proteins. Aging Cell, v.6, n.5, p.619-630. 2007.

Prince, M., R. Bryce, *et al.* The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. Alzheimer's & Dementia, v.9, n.1, p.63-75.e2. 2013.

Princem, J., Eds. World Alzheimer Report Alzheimer Disease International. 2009.

Querfurth, H. W. e D. J. Selkoe. Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. Biochemistry, v.33, n.15, Apr 19, p.4550-61. 1994.

Ramamoorthy, M., P. Sykora, *et al.* Sporadic Alzheimer disease fibroblasts display an oxidative stress phenotype. Free Radical Biology and Medicine, v.53, n.6, p.1371-1380. 2012.

Rando, T. A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. Nature, v.441, n.7097, p.1080-1086. 2006.

Rapoport, M., H. N. Dawson, *et al.* Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.99, n.9, April 30, 2002, p.6364-6369. 2002.

Reinheckel, T., N. Sitte, *et al.* Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. Biochemical Journal, v.335, n.Pt 3, p.637-642. 1998.

Ren, Q.-G., X.-M. Liao, *et al.* Effects of tau phosphorylation on proteasome activity. FEBS Letters, v.581, n.7, p.1521-1528. 2007.

Riascos, D., D. Leon, *et al.* Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica, v.122, n.5, p.565-576. 2011.

Roberto, C., A. Nicole D, *et al.* Aging Gracefully: Compensatory Brain Activity in High-Performing Older Adults. NeuroImage, v.17. 2002.

Rose, M. R. Evolutionary Biology of Aging. New York: Oxford University Press. 1991

Ross, C. A. e M. A. Poirier. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.11, Nov, p.891-8. 2005.

Rui, Y., P. Tiwari, *et al.* Acute Impairment of Mitochondrial Trafficking by beta-Amyloid Peptides in Hippocampal Neurons. The Journal of Neuroscience, v.26, n.41, October 11, 2006, p.10480-10487. 2006.

Salehi, A., J.-D. Delcroix, *et al.* Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration. Neuron, v.51, n.1, p.29-42. 2006.

Sander, J. D., L. Cade, *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. Nat Biotech, v.29, n.8, p.697-698. 2011.

Santa-Maria, I., F. Hernandez, *et al.* Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. Molecular Neurodegeneration, v.2, n.1, p.17. 2007.

Schaeffer, V., I. Lavenir, *et al.* Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. Brain, v.135, n.7, p.2169-2177. 2012.

Scheibel, M. E., R. D. Lindsay, *et al.* Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. Experimental Neurology, v.53, n.2, p.420-430. 1976.

Selkoe, D. J. The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. Ann Med, v.21, n.2, p.73-6. 1989.

Sepulveda-Falla, D., A. Barrera-Ocampo, *et al.* Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. The Journal of Clinical Investigation, v.124, n.4, p.1552-1567. 2014.

Sergieiev, P. V., O. A. Dontsova, *et al.* Theories of Aging: An Ever-Evolving Field. Acta Naturae, v.7, n.1, Jan-Mar, p.9-18. 2015.

Shacter, E., J. A. Williams, *et al.* Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. Free Radic Biol Med, v.17, n.5, Nov, p.429-37. 1994.

Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, *et al.* Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid-B Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. J Neurosci, v.27, n.11, March 14, 2007, p.2866-2875. 2007.

Shankar, S. K. Biology of aging brain. Indian J Pathol Microbiol, v.53, n.4, Oct-Dec, p.595-604. 2010.

Sherer, T. B., R. Betarbet, *et al.* Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. Neurosci Lett, v.341, n.2, May 1, p.87-90. 2003.

Sherer, T. B., R. Betarbet, *et al.* Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. J Neurosci, v.23, n.34, November 26, 2003, p.10756-10764. 2003.

Sherer, T. B., J. H. Kim, *et al.* Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. Exp Neurol, v.179, n.1, Jan, p.9-16. 2003.

Shipton, O. A., J. R. Leitz, *et al.* Tau Protein Is Required for Amyloid β -Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. The Journal of Neuroscience, v.31, n.5, February 2, 2011, p.1688-1692. 2011.

Shore, D. Telomerase and telomere-binding proteins: Controlling the endgame. Trends in Biochemical Sciences, v.22, n.7, p.233-235. 1997.

Silva, G. M., L. E. S. Netto, *et al.* Redox Control of 20S Proteasome Gating. Antioxidants & Redox Signaling, v.16, n.11, p.1183-1194. 2012.

Smaili, S., H. Hirata, *et al.* Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. An Acad Bras Cienc, v.81, n.3, Sep, p.467-75. 2009.

Soane, L., S. Kahraman, *et al.* Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. J Neurosci Res, v.85, n.15, Nov 15, p.3407-15. 2007.

Speier, S., D. Nyqvist, *et al.* Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology. Nat Med, v.14, n.5, p.574-578. 2008.

Squire, L. e S. Zola-Morgan. The medial temporal lobe memory system. Science, v.253, n.5026, September 20, 1991, p.1380-1386. 1991.

Stadtman, E. R. e B. S. Berlett. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Drug Metab Rev, v.30, n.2, May, p.225-43. 1998.

Stieren, E., W. P. Werchan, *et al.* FAD Mutations in Amyloid Precursor Protein Do Not Directly Perturb Intracellular Calcium Homeostasis. PLoS ONE, v.5, n.8, p.e11992. 2010.

Stokin, G. B., C. N. Lillo, *et al.* Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Science, v.307, n.5713, February 25, 2005, p.1282-1288. 2005.

Surmeier, D. J. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. The Lancet Neurology, v.6, n.10, p.933-938. 2007.

Takahashi, K., K. Tanabe, *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell, v.131, n.5, p.861-872. 2007.

Tandon, A. e P. Fraser. The presenilins. Genome Biology, v.3, n.11, p.reviews3014.1 - reviews3014.9. 2002.

Tang, B., J. Cai, *et al.* Proteasome Inhibitors Activate Autophagy Involving Inhibition of PI3K-Akt-mTOR Pathway as an Anti-Oxidation Defense in Human RPE Cells. PLoS ONE, v.9, n.7, p.e103364. 2014.

Toescu, E. C., A. Verkhratsky, *et al.* Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. Trends in Neurosciences, v.27, n.10, p.614-620. 2004.

Torres, L. L., N. B. Quaglio, *et al.* Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, v.26, n.1, p.59-68. 2011.

Tu, H., O. Nelson, *et al.* Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. Cell, v.126, n.5, p.981-993. 2006.

Verhoef, L. G. G. C., K. Lindsten, *et al.* Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. Human Molecular Genetics, v.11, n.22, October 15, 2002, p.2689-2700. 2002.

Wakabayashi, K., K. Tanji, *et al.* The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. Neuropathology, v.27, n.5, Oct, p.494-506. 2007.

Wallace, D. C. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. Science, v.283, n.5407, March 5, 1999, p.1482-1488. 1999.

Wang, X. e T. L. Schwarz. The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. Cell, v.136, n.1, Jan 9, p.163-74. 2009.

Wang, X., D. Winter, *et al.* PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. Cell, v.147, n.4, p.893-906. 2011.

Weaver, C., C. Leidel, *et al.* Endogenous GSK-3/Shaggy Regulates Bidirectional Axonal Transport of the Amyloid Precursor Protein. Traffic, v.14, n.3, p.295-308. 2013.

Wersinger, C., A. Jeannotte, *et al.* Attenuation of the norepinephrine transporter activity and trafficking via interactions with alpha-synuclein. Eur J Neurosci, v.24, n.11, Dec, p.3141-52. 2006.

Wersinger, C., D. Prou, *et al.* Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. Faseb J, v.17, n.14, Nov, p.2151-3. 2003.

Wersinger, C., M. Rusnak, *et al.* Modulation of the trafficking of the human serotonin transporter by human alpha-synuclein. Eur J Neurosci, v.24, n.1, Jul, p.55-64. 2006.

Williamson, R., T. Scales, *et al.* Rapid Tyrosine Phosphorylation of Neuronal Proteins Including Tau and Focal Adhesion Kinase in Response to Amyloid- β Peptide Exposure: Involvement of Src Family Protein Kinases. The Journal of Neuroscience, v.22, n.1, January 1, 2002, p.10-20. 2002.

Woodard, Chris m., Brian a. Campos, *et al.* iPSC-Derived Dopamine Neurons Reveal Differences between Monozygotic Twins Discordant for Parkinson's Disease. Cell Reports, v.9, n.4, p.1173-1182. 2014.

Woodruff, G., Jessica e. Young, *et al.* The Presenilin-1 Δ E9 Mutation Results in Reduced γ -Secretase Activity, but Not Total Loss of PS1 Function, in Isogenic Human Stem Cells. Cell Reports, v.5, n.4, p.974-985. 2013.

World Health Organization. Global Health and Aging. NIH publication no. 11-7737
2011

_____. World health statistics 2015. WHO press, p.1-161. 2015.

Wu, B., H. Yamaguchi, *et al.* Presenilins regulate calcium homeostasis and presynaptic function via ryanodine receptors in hippocampal neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.110, n.37, September 10, 2013, p.15091-15096. 2013.

Xiong, J., A. Verkhratsky, *et al.* Changes in mitochondrial status associated with altered Ca²⁺ homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices. J Neurosci, v.22, n.24, Dec 15, p.10761-71. 2002.

Yagi, T., D. Ito, *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. Human Molecular Genetics, September 7, 2011. 2011.

Yamamoto, H., M. Hasegawa, *et al.* Dephosphorylation of fetal-Tau and Paired Helical Filaments-Tau by Protein Phosphatases 1 and 2A and Calicineurin. Journal of Biochemistry, v.118, n.6, December 1, 1995, p.1224-1231. 1995.

Yankner, B. A., T. Lu, *et al.* The Aging Brain. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v.3, n.1, p.41-66. 2008.

Zampese, E., C. Fasolato, *et al.* Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)–mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.108, n.7, February 15, 2011, p.2777-2782. 2011.

Zhang, B., M. Higuchi, *et al.* Retarded Axonal Transport of R406W Mutant Tau in Transgenic Mice with a Neurodegenerative Tauopathy. J Neurosci, v.24, n.19, May 12, 2004, p.4657-4667. 2004.

Zhang, G., J. Li, *et al.* Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. Nature, v.497, n.7448, p.211-216. 2013.

Zhang, H., S. Sun, *et al.* Role of Presenilins in Neuronal Calcium Homeostasis. The Journal of Neuroscience, v.30, n.25, June 23, 2010, p.8566-8580. 2010.

Zhou, M., Z. Diwu, *et al.* A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem, v.253, n.2, Nov 15, p.162-8. 1997.

Zhu, K., K. Dunner, Jr., *et al.* Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. Oncogene, v.29, n.3, p.451-462. 2009.

Zhu, Y. J., H. Lin, *et al.* Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity. Faseb J, v.14, n.9, Jun, p.1244-54. 2000.

Zhu, Y. J., H. Lin, *et al.* Fresh and nonfibrillar amyloid β protein(1–40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for A β P-channel-mediated cellular toxicity. The FASEB Journal, v.14, n.9, June 1, 2000, p.1244-1254. 2000.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Apresentação de resumos em congressos

Apresentação do resumo intitulado “Expression of mitochondrial molecular motors in substantia nigra before neurodegeneration-related protein aggregation. A study in primary cell cultures and aged rats” com autoria de: Melo, T.Q. ; Chaves, R.S. ; D'Unhão, A. M. ; Farizatto K. L. ; Ferrari, Merari F.R.. Apresentado na forma de painel no The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, realizado entre os dias 3 a 7 de dezembro de 2011 em Denver, Colorado, Estados Unidos.

Apresentação do resumo intitulado “Hippocampal cell culture exposed to low doses of rotenone exhibited proteasomal activity inhibition and tau hyperphosphorylation in absence of protein carbonylation” com autoria de: Chaves, R.S., Demasi, M e Ferrari, Merari F.R.. Apresentado na forma de painel no 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, realizado entre os dias 25 a 28 de julho de 2012 no Rio de Janeiro, Brasil.

Apresentação do resumo intitulado; “Reduction of Mitochondrial Retrograde Molecular Motors Protein Levels and Mitochondria Total Movement in Hippocampal Cell Culture Before and During Neurodegeneration-Related Protein Aggregation” com autoria de: Chaves, R.S. e Ferrari, Merari F.R.. Apresentado na forma de painel no The American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, realizado entre os dias 15 a 19 de dezembro de 2012 em São Francisco, Califórnia, Estados Unidos.

Apresentação do resumo intitulado; “The Familial Alzheimer’s Disease (FAD) Presenilin-1 dE9 mutation increases cytosolic Ca²⁺ and decreases ER Ca²⁺ in neurons made from isogenic human IPS cells.” com autoria de: Chaves, R.S., Grace Woodruff, Sol M Reyna, Merari F.R. Ferrari e Larry S Goldstein. Apresentado na forma de painel no Gordon Research Conference on Cell Biology of the Neuron, realizado entre os dias 22 a 27 de julho de 2014 em Waterville Valley, New Hampshire, Estados Unidos.

Apresentação do resumo intitulado; “IPSC derived neurons carrying Presenilin1ΔE9 mutation have increased cytosolic Ca²⁺ and decreased ER and Lysosome Ca²⁺ levels, possibly through a gain of function regarding Presenilin ER Ca²⁺ leak channel.” com autoria de: Chaves, R.S., Grace Woodruff, Sol M Reyna, Merari F.R. Ferrari e Larry S Goldstein. Apresentado na forma de painel no Gordon Research Conference on Calcium Signalling, realizado entre os dias 07 a 12 de julho de 2015 em Sunday River, Newry, Estados Unidos.

Apresentação do resumo intitulado; “Altered mitochondrial transport and disruption in cytosolic Ca²⁺ levels in hippocampal cell cultures exposed to low doses of rotenone even before hyperphosphorylated tau aggregation.” com autoria de: Chaves, R.S. e Ferrari, Merari F.R. Apresentado na forma de painel no IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization, realizado entre os dias 7 a 11 de junho de 2015 no Rio de Janeiro, Brasil.

Artigos científicos publicados

Artigo científico intitulado; “KIF1B, KIF5 and Miro1 expression before protein aggregation in brain áreas related to neurodegenerative diseases.” Com

autoria de: Thaiany Q. Melo, Aline M. D'Unhao, Karen L.G. Farizatto, Rodrigo S. Chaves e Merari F.R. Ferrari. Cell Mol Neurobiol. v33, p.327-335. 2013.

Artigo científico intitulado; “Dynein c1h1, dynactin and syntaphilin expression in brain areas related to neurodegenerative diseases following exposure to rotenone.” Com autoria de: Rodrigo S. Chaves, Thaiany Q. Melo, Aline M. D'Unhao, Karen L.G. Farizatto e Merari F.R. Ferrari. Acta Neurobiologiae Experimentalis, v73(4), p.541-56.2013.

Artigos científicos em preparação

Artigo científico intitulado “Decreased proteasome activity and increased oxidative parameters prior to neurodegeneration-related protein aggregation.” Com autoria de Rodrigo S. Chaves, Amajad I. Kazi, Carrolliny M. Silva, Michael F. Almeida, Marilene Demasi e Merari F.R. Ferrari.

Artigo científico intitulado “PS1 Δ E9 mutation decreases transcytosis in isogenic humans neurons due to cytosolic calcium dysregulation.” Com autoria de Grace Woodruff, Sol M Reyna, Rodrigo S Chaves e Larry S Goldstein.