

**STEPHANIE ALVES MARTINS**

**ANÁLISE DA MOBILIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS VIVAS DO  
HIPOCAMPO, SUBSTÂNCIA NEGRA E LOCUS COERULEUS ANTERIOR À  
AGREGAÇÃO PROTEICA ENVOLVIDA EM NEURODEGENERAÇÃO.**

**Programa de Fisiopatologia Experimental**

**Orientadora: Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari**

**São Paulo**

**2013**

**Stephanie Alves Martins**

**ANÁLISE DA MOBILIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS VIVAS DO  
HIPOCAMPO, SUBSTÂNCIA NEGRA E LOCUS COERULEUS ANTERIOR À  
AGREGAÇÃO PROTEICA ENVOLVIDA EM NEURODEGENERAÇÃO.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências**

**Programa de Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari**

**São Paulo**

**2013**

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”. Antoine de Saint-Exupéry*

Aos meus pais: Marli Alves Martins e  
Ademir Gonçalves Martins.

Em memória de **José Barbosa Martins**, um dos responsáveis por  
minha trajetória acadêmica.

# Agradecimentos

---

Dificuldades encontradas ao longo desses dois anos de pesquisa me fizeram crescer, amadurecer e principalmente saber a enfrentar desafios. Assim como Charles Chaplin dizia: *“Chorar não resolve, falar pouco é uma virtude, aprender a se colocar em primeiro lugar não é egoísmo. Para qualquer escolha se segue alguma consequência, vontades efêmeras não valem a pena, quem faz uma vez, não faz duas necessariamente, mas quem faz dez, com certeza faz onze. Perdoar é nobre, esquecer é quase impossível. Quem te merece não te faz chorar, quem gosta cuida, o que está no passado tem motivos para não fazer parte do seu presente, não é preciso perder pra aprender a dar valor, e os amigos ainda se contam nos dedos. Aos poucos você percebe o que vale a pena, o que se deve guardar pro resto da vida, e o que nunca deveria ter entrado nela. Não tem como esconder a verdade, nem como enterrar o passado, o tempo sempre vai ser o melhor remédio, mas seus resultados nem sempre são imediatos”*.

Nesse período eu amei e odiei. Briguei, fiz as pazes e briguei de novo. Algumas vezes voltei atrás, outras não. Sofri, aprendi a lidar com pessoas totalmente diferentes de mim, e outras nem tanto. Fiquei noites mal dormidas, preocupada, noites sem dormir, e noites que dormi demais e cheguei atrasada no dia seguinte. Aprendi que café é necessário quando se passa de 3 da manhã. Bebi com gente interessante e outras nem tanto. Chorei de tristeza e de exaustão, mas a maioria das vezes de tanto dar risada. Fiz amigos de verdade, outros de mentira. Alguns vão pro resto da vida. Todos os outros vão pelo carinho. Aprendi a amar, a respeitar e a desrespeitar quando preciso, a ter mais calma e a rir de mim mesma e aprendi por fim, aprendi ciência. O melhor ainda está para vir.

Agradeço primeiramente a professora Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari por fazer parte dessa minha jornada desde a iniciação científica e pela orientação.

Manifesto aqui meu imenso agradecimento aos colegas de laboratório, professores e funcionários da Faculdade de Medicina e do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a minha família, Marli Martins, Ademir Martins e Lucas Martins por me encorajar, por me apoiar e me amar incondicionalmente, aos meus avós e a minha prima Thais, pela ajuda durante meu mestrado. Agradeço meu namorado, Tiago Adorno por estar sempre ao meu lado, por compartilhar comigo momentos felizes e tristes, e principalmente por me amar.

O presente estudo foi financiado pela FAPESP (bolsa de mestrado processo: 2011/05576-2 e auxílios regulares 2008/04480-9; 2011/06434-7) e CNPq (processos 472042/2008-4 e 471779/2010-5).

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação.

---

# Resumo

---

Martins SA. *Análise da mobilidade mitocondrial em cultura de células vivas do hipocampo, substância negra e locus coeruleus anterior à agregação proteica envolvida em neurodegeneração*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2013.

A alteração do tráfego mitocondrial em neurônios leva ao aumento do estresse oxidativo, privação de energia, deficiência da comunicação intercelular e neurodegeneração. Há evidências de que essas alterações de tráfego antecedem a morte neuronal associada à agregação proteica. Portanto, conhecer a relação entre a mobilidade mitocondrial e a formação de agregados proteicos pode ser um passo importante para o melhor entendimento dos mecanismos da neurodegeneração. Com isso, o objetivo do presente estudo é analisar a mobilidade das mitocôndrias em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostas a rotenona e MPTP, como agentes neurodegenerativos, e à rapamicina como ativador da autofagia. Um outro objetivo do estudo é avaliar o papel do cálcio (através do emprego de EGTA e ionomicina) no modelo experimental. Os resultados mostraram aumento da mobilidade mitocondrial no hipocampo e diminuição na substância negra, já no locus coeruleus houve aumento seguido de diminuição da mobilidade mitocondrial dependendo da concentração de rotenona. O emprego do EGTA e ionomicina mostra que a ação da rotenona sobre o tráfego mitocondrial envolve o cálcio, mas não se relaciona com uma possível alteração da integridade mitocondrial, já que não foi observada alteração no potencial de membrana mitocondrial. Foram também realizados experimentos a fim de avaliar a mobilidade mitocondrial em modelo utilizando rapamicina para ativar a autofagia e MPTP como indutor da neurodegeneração em culturas de células, onde foi observado aumento da mobilidade no hipocampo e no locus coeruleus quando exposto a rapamicina e aumento da mobilidade mitocondrial em cultura de células do hipocampo exposto a MPTP já no locus coeruleus houve uma diminuição significativa da mobilidade mitocondrial. Os resultados permitem concluir que o tráfego mitocondrial está alterado antes da agregação proteica podendo contribuir com a neurodegeneração.



# Abstract

---

Martins SA. *Analisis of mitochondrial mobility in living hippocampal, substantia nigra and locus coeruleus cells before protein aggregation involved in neurodegeneration*. [dissertation]. Sao Paulo. University of Sao Paulo, Medicine School, 2013.

Altered mitochondrial traffic in neurons can lead to increased oxidative stress, energy deprivation, impaired intercellular communication and neurodegeneration. There are evidences mitochondria disturbing precedes neuronal death associated with protein aggregation. Therefore, the study of mitochondrial traffic and protein aggregation can be an important step towards a better understanding of the mechanisms of neurodegeneration. Thus, the aim of this study is to analyze mitochondria mobility in cultured cells of the hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus exposed to rotenone and MPTP, as neurodegeneration-promoting agents, and rapamycin to activate autophagy. The other objective of the study was to analyze the role of calcium (through EGTA and ionomycin) in the experimental model. The results showed increased and decreased mobility mitochondrial in cells from hippocampus and substantia nigra, respectively, while the locus coeruleus cell culture has increased followed by decreased mitochondrial mobility depending upon rotenone concentration. The use of EGTA and ionomycin showed that alteration of mitochondrial traffic is associated with calcium, however it is not related with changes in mitochondrial membrane potential. Additional experiments were also conducted to assess mitochondrial mobility in a model using rapamycin to activate autophagy and MPTP to induce neurodegeneration in cell cultures. The results of these experiments showed increased mitochondrial mobility in the hippocampus and locus coeruleus when exposed to rapamycin; while MPTP also increased mitochondria mobility in hippocampal cell cultures, but decreased it in locus coeruleus. Results suggest that mitochondrial traffic is altered before protein aggregation, which may contribute to neurodegeneration.

# Índice

---

1. <i>Introdução</i>	1
1.1. Idade e Neurodegeneração	1
1.2. Agregados proteicos e Neurodegeneração	2
1.3. Tráfego mitocondrial e Neurodegeneração	8
1.3.1. Transporte, fissão e fusão mitocondrial	11
1.4. Rotenona como modelo de neurodegeneração	13
1.5. MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) e neurodegeneração.	17
1.6. Autofagia	18
2. <i>Objetivos</i>	21
3. <i>Material e Métodos</i>	22
3.1. Animais	22
3.2. Cultura de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte	22
3.3. Caracterização da cultura de células por imunocitoquímica	24
3.4. Tratamento com rotenona e MPTP das células em cultura	27
3.5. Tratamento com EGTA e ionomicina das células em cultura	27
3.6. Marcação das mitocôndrias	28
3.7. Visualização e análise da mobilidade mitocondrial	28
3.8. Análise dos resultados	29
4. <i>Resultados</i>	30
4.1. Porcentagem de neurônios existentes nas culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus	30
4.2. Mobilidade mitocondrial em cultura de células de hipocampo	30
4.3. Mobilidade mitocondrial em cultura de células da substância negra	32
4.4. Mobilidade mitocondrial em cultura de células do locus coeruleus	34
4.5. Número de mitocôndrias com potencial de membrana intacto	36
4.6. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostas ao EGTA.	38
4.7. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo expostas a ionomicina.	42
4.8. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostos a rapamicina	45
4.9. Mobilidade mitocondrial em cultura de células expostas a MPTP.	47
5. <i>Discussão</i>	50
6. <i>Conclusões</i>	60
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	61
8. <i>Anexos</i>	X
9. <i>Atividades acadêmicas</i>	XII
10. <i>Artigo Publicado</i>	XIII

# 1. Introdução

---

## 1.1. Idade e Neurodegeneração

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, com base no Censo 2010 e estimativas realizadas em 2012 (IBGE, 2012), a proporção de pessoas acima de 65 anos aumentou de 4%, em 1980, para 7% em 2010, sendo que a projeção até 2030 revela aumento para aproximadamente 17% da população acima de 65 anos.

A expectativa média de vida da população brasileira hoje é de 68,6 anos, maior do que o observado na década de 90, em que a expectativa de vida era de 66,1 anos. Esse aumento na expectativa de vida e proporção da população idosa é reflexo do avanço no campo da saúde e redução das taxas de natalidade e de fecundidade.

Esse incremento de pessoas idosas traz consequências econômicas e sociais importantes. Por exemplo, a incapacidade funcional é um problema comum entre os idosos, e afeta suas atividades de vida diária, com impacto negativo para as suas famílias e para o sistema de saúde, aumentando a necessidade de cuidados de apoio, cuidados de longa duração ou mesmo institucionalização, muitas vezes ligada à demência ou a outras doenças neurodegenerativas.

Após as doenças cardíacas, as doenças neurodegenerativas especialmente as doenças de Alzheimer e de Parkinson são as mais comuns entre os idosos. Essas patologias são caracterizadas pela cronicidade, perda progressiva e simétrica de neurônios do sistema nervoso central, muitas vezes deixando o idoso incapaz de cumprir tarefas simples.

A doença de Alzheimer é caracterizada por demência progressiva fatal que pode aparecer por volta dos 65 anos de idade, mas as formas genéticas podem ter início precoce (Hardy, 2004). As características das lesões são placas amiloides extracelulares, compostas por agregados de peptídeos beta amiloide e emaranhados

neurofibrilares intracelulares, que contêm acúmulos de formas hiperfosforiladas da proteína tau associada a neurofilamentos.

A doença de Parkinson é caracterizada pelo distúrbio progressivo do controle motor que inclui tremores persistentes, bradicinesia e rigidez com sintomas emocionais e cognitivos (Dawson e Dawson, 2003). Assim como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson também pode aparecer por volta dos 65 anos de idade, sendo que as formas genéticas podem ter início precoce. A presença de corpos de Lewy na substância negra é uma das características da doença de Parkinson. Esses corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas eosinófilicas contendo depósitos da proteína alfa sinucleína juntamente com neurofilamentos, sinfilina-1, parkina dentre outros. A doença de Parkinson familiar pode ser causada por mutações genéticas na alfa sinucleína, parkina, Dj-1, PINK1 e LRRK2, dentre outras (Sheng e Cai, 2012).

Acredita-se que cerca de 3% da população com mais de 60 anos sejam acometidas por doenças neurodegenerativas, número que pode duplicar progressivamente a cada cinco anos atingindo 40% das pessoas com idade superior a 84 anos (Herrera et al., 1998; Scazufca et al., 2002).

Considerando o potencial mundial de envelhecimento populacional com o desenvolvimento socioeconômico, é importante que os estudos dos mecanismos que levam à neurodegeneração sejam encorajados para a melhora da qualidade de vida da população (Mayeux, 2003).

## **1.2. Agregados proteicos e Neurodegeneração**

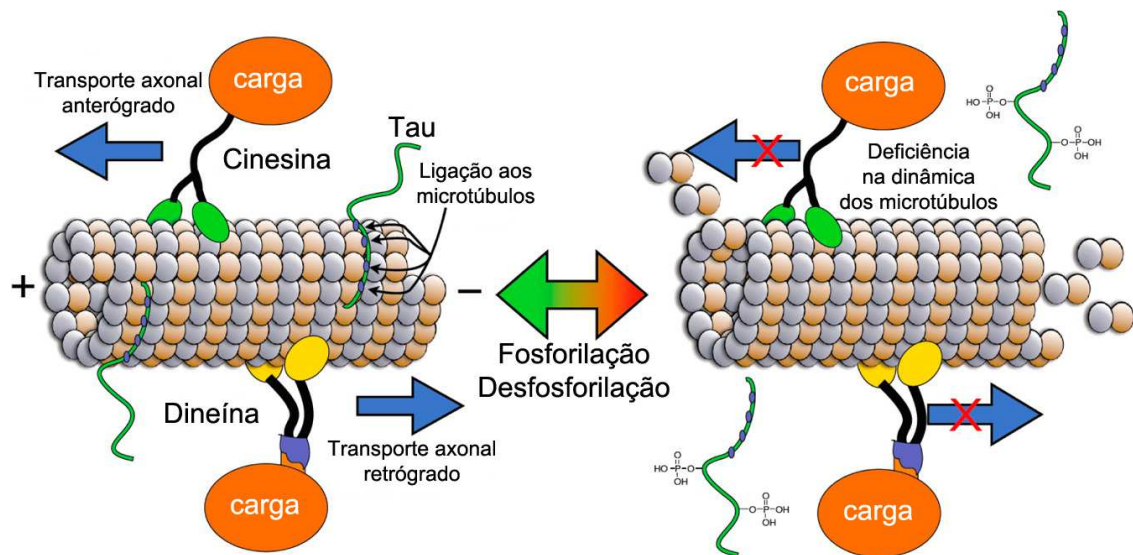
A formação de agregados proteicos ocorre naturalmente durante o envelhecimento os quais distribuem-se por todo o sistema nervoso central. Estes agregados podem estar relacionados à morte celular natural da senilidade e também a doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer, doença de Parkinson,

Esclerose Lateral Amiotrófica, doença de Huntington e outras (revisão por Gibb e Lees, 1988; Selkoe, 1989; Watanabe et al., 2001; Hardy e Selkoe, 2002; Bates, 2003).

Alterações genéticas podem causar uma elevação na quantidade de proteína normal, mas mesmo na ausência de alterações genéticas, pode haver produção acelerada ou degradação deficiente das proteínas, sendo produto também do estresse ambiental (Ross e Poirier, 2005). Esses agregados proteicos podem ser formados por proteínas constitutivas as quais possuem função celular, entretanto ao formarem inclusões passam a causar citotoxicidade (Stefani e Dobson, 2003; Vendruscolo et al., 2003). Estas proteínas associadas às doenças neurodegenerativas são muito diversificadas nas suas sequências primárias, no entanto, quando agregadas, todas partilham uma estrutura terciária semelhante, que consiste de um arranjo ordenado de folhas  $\beta$  (Sunde et al., 1997; Luhrs et al., 2005).

Os principais constituintes desses agregados são as proteínas tau hiperfosforilada e alfa-sinucleína, além do peptídeo beta-amiloide.

Emaranhados neurofibrilares e filamentos helicoidais pareados contendo neurofilamentos e proteína tau hiperfosforilada são encontrados no citoplasma de neurônios em algumas situações neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer na hipocampo e locus coeruleus. Sabe-se que a hiperfosforilação da Tau é um fator importante para a inibição do transporte das mitocôndrias e vesículas em geral (Ebner et al., 1998; Bendiske et al., 2002), já que esta proteína estabiliza os microtúbulos do axônio e também participa do processo de transporte de vesículas e organelas para o terminal sináptico como ilustrado na figura 1 (Billingsley e Kincaid, 1997; Trinczek et al., 1999; Kamal et al., 2001).



**Figura 1.** Ilustração representativa do transporte axonal, composto por microtúbulos e proteínas motoras (dineínas e cinesinas) que fazem o transporte das cargas em dois sentidos (retrógrado e anterógrado). A tau desempenha a função de estabilizar os microtúbulos, um papel importante na organização e dinâmica axonal. Em condições patológicas a hiperfosforilação da tau leva um desprendimento anormal da proteína tau do microtúbulo, o que resulta em disfunção da dinâmica dos microtúbulos e do transporte axonal. Modificado de Ballatore et al. (2012).

A superexpressão de tau em linhagem celular de neuroblastoma (N2a e NB2a/d1), neurônios corticais primários e neurônios ganglionares da retina inibe seletivamente o transporte mitocondrial anterógrado mediado por cinesinas, fazendo com que o transporte mitocondrial retrógrado mediado por dineína fosse prevalente e promovendo o acúmulo das mitocôndrias no corpo celular em vez de se localizarem também nos processos neuronais (Stamer et al., 2002; Dubey et al., 2008; Stoothoff et al., 2009).

Estudo de Trinczek e colaboradores (1999) sugere que a tau regula a interação das proteínas motoras (especialmente cinesinas) com os microtúbulos mas não a velocidade do transporte mitocondrial. Esta hipótese foi reforçada pelo mesmo grupo ao mostrarem que o aumento da ligação da tau aos microtúbulos compromete o

transporte mitocondrial em axônios e que a fosforilação da tau mediada por MARK (quinase que regula a afinidade de proteínas associadas aos microtúbulos – MAP – ao microtúbulo) poderia remover o excesso de obstáculos de tau na superfície dos microtúbulos desobstruindo o caminho para as proteínas motoras (Mandelkow et al., 2004).

Curiosamente, a diminuição da expressão de tau impede a deficiência no transporte axonal mediada por beta amiloide, indicando que a ação do peptídeo sobre o tráfego axonal depende da tau (Vossel et al., 2010). A ligação da tau aos microtúbulos pode interagir com as proteínas motoras a fim de regular a direção do tráfego axonal (Dixit et al., 2008). Assim, o distúrbio da distribuição de tau em axônios prejudicaria o transporte axonal, levando a neurodegeneração.

Dentre muitos fatores envolvidos na doença de Alzheimer, destaca-se a presença do peptídeo beta amiloide que pode interagir com proteínas e lipídeos levando à neurodegeneração (Haass e Selkoe, 2007; Mohamed et al., 2011). Na doença de Alzheimer o peptídeo beta amiloide é clivado a partir da proteína precursora amiloide (APP) na membrana neuronal pelo complexo beta-secretase (Evin e Weidemann, 2002).

Além disso, uma vez que os níveis de tau hiperfosforilada se elevem, as vesículas contendo APP são preferencialmente removidas da sinapse e passam a se acumular no corpo celular, já que o transporte anterógrado da APP é dependente de cinesina e tau. O maior tempo de residência da APP no corpo celular devido à lentidão do tráfego intracelular promovido pela deficiência da tau provoca formação tóxica de peptídeos beta-amiloides na rede trans-Golgi (Mandelkow et al., 2003).

A alfa-sinucleína, cujo papel fisiológico é facilitar a neurotransmissão, é também uma das proteínas que constitui os agregados proteicos presentes nas doenças neurodegenerativas (Clayton e George, 1999; Chandra et al., 2005; Fountaine e Wade-Martins, 2007). Sua disfunção pode estar relacionada à deficiência

da comunicação e conseqüentemente à morte celular (Cooper et al., 2006). Interessantemente, Wersinger (2006a) demonstrou que os efeitos da alfa-sinucleína sobre o desbalanço da neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica podem ser observados antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores na doença de Parkinson, pelo desenvolvimento de doenças psíquicas, como a depressão, e problemas relacionados ao sono REM (movimentos rápidos dos olhos) o que levaria ao diagnóstico precoce da neurodegeneração. Tal deficiência contribui também para a geração de radicais livres o que pode acelerar a neurodegeneração de grupos específicos de neurônios.

A alfa-sinucleína atua ainda sobre o componente pré-sináptico da neurotransmissão onde pode diminuir diretamente a disponibilidade de transportadores de monoaminas, de dopamina, serotonina e noradrenalina, além da melatonina causando a internalização destes transportadores (Dubocovich, 1984; Wersinger e Sidhu, 2003; Wersinger et al., 2006a; Wersinger et al., 2006b)

Esta proteína é a principal constituinte dos corpos de Lewy que são inclusões insolúveis neuronais características de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, mas a alfa-sinucleína também está presente nos agregados extracelulares de proteína beta-amiloide em neurônios na doença de Alzheimer, células gliais comprometidas na atrofia sistêmica múltipla (revisito por Lantos e Papp, 1994; Yoshida, 2007) e em astrócitos e células de Schwann na esclerose lateral amiotrófica. (Mezey et al., 1998).

Os corpos de Lewy encontram-se distribuídos por todo o sistema nervoso central incluindo o hipotálamo, o núcleo basal de Meynert, substância negra, locus coeruleus, núcleo dorsal da rafe, núcleo motor dorsal do vago e núcleo intermédio lateral da medula espinhal (den Hartog Jager e Bethlem, 1960; Ohama e Ikuta, 1976; Oyanagi et al., 1990; Kakita et al., 1994; Wakabayashi e Takahashi, 1997), estando altamente relacionados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.



Ressalta-se que a presença das inclusões proteicas parece não ser a causa direta da morte neuronal sugerindo que a agregação proteica possa ser uma resposta secundária, por exemplo, à deficiência do transporte intracelular (Wakabayashi et al., 2007). De fato, nosso grupo demonstrou recentemente que a expressão das proteínas motoras encontra-se alteradas em fases que antecedem a agregação proteica (Melo et al., 2012).

Um dos primeiros núcleos afetados durante o curso das doenças neurodegenerativas é o locus coeruleus, pacientes com doença de Parkinson apresentam mortalidade de neurônios da ordem de 70% e presença de corpos de Lewy (Bertrand et al., 1997). Além disso, a redução de neurônios no locus coeruleus foi observada também paciente com doença de Alzheimer (Ohm et al., 1997).

Os mecanismos subjacentes à neurodegeneração no locus coeruleus permanecem obscuros, entretanto o estresse oxidativo parece exercer um importante papel para os danos neurodegenerativos. A lesão oxidativa pode resultar de um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1984). De fato, os estudos clínicos têm encontrado peroxidação lipídica elevada, redução nos sistemas de defesa antioxidantes e oxidação de proteínas no sistema nervoso central de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas (Lyras et al., 1997).

Os neurônios dopaminérgicos da substância negra e noradrenérgicos do locus coeruleus possuem um alto índice de neuromelanina (Marsden, 1961; Zucca et al., 2006), sendo inclusive responsável pela pigmentação da substância negra (Zecca et al., 2002). A neuromelanina funciona como antioxidante e quelante de metais (Fedorow et al., 2005; Li et al., 2005; Bohic et al., 2008), podendo ter função protetora nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, os quais produzem grande quantidade de radicais livres devido à alta atividade metabólica (Double, 2012).

### 1.3. Tráfego mitocondrial e Neurodegeneração

A comunicação celular é a base para o funcionamento correto dos sistemas biológicos. Essa transmissão da informação de uma célula para outra depende de fatores intracelulares que promovem o tráfego e ancoragem de organelas e vesículas contendo os mediadores da informação. No sistema nervoso central isso é ainda mais evidente dada à característica altamente polarizada das células desse tecido.

Todas as organelas celulares são importantes para a viabilidade celular. No entanto, a função da mitocôndria para a manutenção celular é bastante estudada já que essas organelas são as fontes de energia e participam da regulação homeostática das células eucarióticas. Com isso, postula-se que a disfunção mitocondrial, incluindo seu tráfego, pode contribuir para a citotoxicidade, aumento do estresse oxidativo, privação de energia e a neurodegeneração. (revisado por Soane *et al.*, 2007).

As mitocôndrias são produzidas no corpo celular, transportadas para a periferia pelo transporte anterógrado, e retornam para o corpo celular por meio do transporte retrógrado onde ocorre a biogênese ou degradação da organela.

Em sua membrana interna, as mitocôndrias possuem quatro complexos enzimáticos, denominados complexos I, II, III e IV, os quais estão envolvidos no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Além disso, são organelas dinâmicas que constantemente se fundem umas com as outras e se dividem (sofrem fissão). A fusão é útil para misturar e unificar o compartimento mitocondrial enquanto que a fissão gera organelas funcionais e morfologicamente distintas (Cagalinec *et al.*, 2013). Para tanto, a membrana da mitocôndria possui sítios de ligação que possibilitam seu transporte rápido, lento, anterógrado, retrógrado e ancoragem (Hollenbeck e Saxton, 2005; Endo e Yamano, 2009).

Especificamente as cinesinas KIF1B alfa e KIF5 estão associadas ao transporte anterógrado de mitocôndrias em neurônios de camundongos (Nangaku *et al.*, 1994). Outra proteína específica de tráfego mitocondrial é a Milton que forma um

complexo associado à mitocôndria, através da proteína Miro e ao citoesqueleto para o movimento dessas organelas em direção ao terminal pré-sináptico (Stowers et al., 2002). Milton é característica de *Drosófilas*; entretanto, em mamíferos, são encontradas as suas ortólogas GRIF-1 e OIP-106. Foi demonstrado que a diminuição da expressão dessas proteínas promove retardo do transporte anterógrado e anormalidade de distribuição das mitocôndrias em neurônios (Stowers et al., 2002; Cai et al., 2005), promovendo possível depleção de energia na sinapse. Essa possível depleção de energia pode levar ao inchaço mitocondrial e posteriormente impedi a desacetilação dos microtúbulos (Park et al 2013)

As mitocôndrias ligam-se à dineína citoplasmática (dineína C1h1) e à dinactina quando do seu transporte retrógrado (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.

Uma característica particular das mitocôndrias é que uma vez em seu local de ação elas permanecem por um tempo maior, o que indica um possível mecanismo de ancoragem dessas organelas no sítio de ação. As mitocôndrias ancoram-se em sítios específicos como na zona pré-sináptica, espinhos dendríticos, cone de crescimento e nodos de Ranvier. A ancoragem das mitocôndrias depende de sinais específicos como a presença de fatores neurotróficos, como por exemplo o NGF, ATP e cálcio que causam acúmulo preferencial dessas organelas (Chada e Hollenbeck, 2004; Reynolds e Rintoul, 2004). No entanto, nem todas essas proteínas importantes para a ancoragem das mitocôndrias estão bem caracterizadas. Kang e seus colaboradores (2008) demonstraram que a sintafilina participa do ancoramento das mitocôndrias aumentando sua disponibilidade pré-sináptica, sendo, portanto, importante para a neurotransmissão.

Além disso, o tráfego mitocondrial depende da concentração de cálcio intracelular, sendo que a mitocôndria ancora-se em regiões em que há maiores níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e ATP. Este mecanismo é regulado em parte pelas proteínas Miro-1 e Miro-2 que se ancoram a proteínas de membrana mitocondrial (Kakita et al., 1994) e interagem com as proteínas motoras cinesina e dineína. A presença de dois cálcios ligados a motivos EF hands no domínio citosólico da miro (Fransson et al., 2003) confere a sensibilidade ao cálcio e modula a mobilidade mitocondrial (Saotome et al., 2008).

Outras proteínas da membrana mitocondrial também podem estar envolvidas diretamente com o tráfego da organela, por exemplo a PINK1 e a Parkina. É interessante notar que além da PINK1, novas proteínas foram encontradas como substrato da Parkina, como o FAF1 (fator 1 associado ao Fas) que é um modulador positivo para as doença de Parkinson (Sul et al., 2013).

Pilling e colaboradores (2006) demonstraram que a deficiência do transporte retrógrado de mitocôndrias promove o inchaço dos axônios, onde são formados sítios de autofagocitose de mitocôndrias senescentes que ficaram presas no axônio devido à falha do transporte retrógrado, um processo protetor desencadeado por sinais de morte celular e neurodegeneração. Após a formação dos agregados, o transporte intracelular é obviamente prejudicado pela barreira física a que o mecanismo de tráfego é sujeito. No entanto, a conformação intermediária dos filamentos (por ex., monômeros e dímeros) também pode ser tóxica para a célula, e não somente os agregados finais (Harrison et al., 2007), indicando a importância do estudo das fases iniciais da formação dos agregados, assim como os fatores que levam à agregação, o que ainda é pouco conhecido.

Martin (2007) demonstrou que alterações no transporte de mitocôndrias aparecem antes dos sintomas clássicos das doenças neurodegenerativas e pode anteceder a morte neuronal associada à agregação proteica (Cataldo et al., 2000) o

que seria o primeiro fator importante para a degeneração celular indicando disfunção do transporte intracelular e efetividade da sinapse antes mesmo da formação das placas senis (Coyle et al., 1983; Schliebs e Arendt, 2006). Em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (empregando camundongos transgênicos) como as doenças de Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica também parece haver deficiência no sistema de transporte de organelas e vesículas que antecede a formação de agregados insolúveis levando as células à morte (Mandelkow et al., 2003; Bronfman et al., 2007; Martin, 2007).

O prejuízo do transporte intracelular também foi demonstrado na doença de Huntington onde a proteína huntintina mutante, primeiramente prejudica o transporte de mitocôndrias antes da ocorrência de agregados e morte neuronal (Orr et al., 2008; Li et al., 2009).

Muito embora um evento causativo para a deficiência da sinapse no envelhecimento não possa ser definitivamente caracterizado devido aos múltiplos determinantes da fisiologia do envelhecimento encefálico, alguns experimentos demonstraram a importância da presença de mitocôndrias no terminal sináptico para a modulação/dinâmica da sinapse e neuroplasticidade sináptica (Bertoni-Freddari et al., 2004; Bertoni-Freddari et al., 2007).

### **1.3.1. Transporte, fissão e fusão mitocondrial**

A mobilidade mitocondrial bem como a dinâmica da maquinaria de fusão e fissão pode regular a forma, função e distribuição mitocondrial. Ambos são processos altamente críticos para a função das mitocôndrias e pode ser especialmente importante em neurônios (Chan, 2006).

Ressalta-se que a correta orquestração do ciclo fissão/fusão mitocondrial parece ser importante na regulação da morte celular e mitofagia. A fissão mitocondrial favorece a remoção das mitocôndrias danificadas via mitofagia (Gomes et al., 2011) e

pode contribuir para a apoptose em condições de estresse celular (Suen et al., 2008), sendo que falha na dinâmica de fissão e fusão mitocondrial tem sido associada a várias doenças.

Problemas relacionados à fissão mitocondrial podem afetar o tamanho da organela e prejudicar sua mobilidade. Drp1 é uma GTPase mitocondrial essencial para a fissão de membrana mitocondrial, além de necessária para o desenvolvimento embrionário do cérebro do rato e formação de sinapses entre os neurônios em cultura (Ishihara et al., 2009). Em culturas de neurônios do hipocampo, defeitos mediados por Drp1 resultam em fissão mitocondrial, acúmulo de mitocôndrias no corpo da célula e reduz a quantidade de mitocôndrias nos dendritos. A Drp1 também contribui para a distribuição das mitocôndrias perto de junções neuromusculares (Verstreken et al., 2005).

O aumento da expressão de proteínas Drp1 antagoniza os efeitos morfológicos da ausência de PINK1 em modelos de *Drosophila* (Poole et al., 2008; Yang et al., 2008). A PINK1 é uma quinase e sua disfunção está associada a defeitos funcionais e morfológicos da mitocôndria, já que também participa do equilíbrio entre fusão e fissão mitocondrial. PINK1 está relacionada especialmente à fissão mitocondrial em vez de fusão (Exner et al., 2007; Dagda et al., 2009).

Outra proteína envolvida na morfologia mitocondrial é a miro. Frederick e colaboradores (2004) demonstraram em leveduras que a supressão de GEM1 (homólogo – miro) também altera a morfologia mitocondrial, resultando no acúmulo de mitocôndrias colapsadas e globulares. Mutações que levam à perda de função da miro também diminui a mobilidade mitocondrial e provoca fragmentação da organela (Fransson et al., 2006; Saotome et al., 2008; Liu e Hajnoczky, 2009). Em contraste, a superexpressão de miro não só aumenta o movimento mitocondrial, mas também aumenta a fusão mitocondrial e o seu volume nos dendritos (Fransson et al., 2006; Saotome et al., 2008; Macaskill et al., 2009).

Além disso, o complexo motor retrógrado dineína/dinactina mostrou ter um papel na regulação da morfologia mitocondrial. O comprometimento da função da dineína aumenta a formação de estruturas mitocondriais altamente ramificadas, inclusive controlando o recrutamento de Drp1.

O transporte mitocondrial ao longo de processos neuronais é particularmente importante para os eventos de fusão. Eliminação ou mutação do gene que codifica a proteína de fusão mitofusina 2 prejudica o transporte mitocondrial tanto anterógrado como retrógrado (Varadi et al., 2004) sugerindo que há associação entre a fusão e a maquinaria de transporte. Células com deficiência de fusão mitocondrial pela disfunção das mitofusinas (Mfn1 e Mfn2), apresentam sua mobilidade reduzida (Chen et al., 2003). Os neurônios motores derivados de camundongos transgênicos com mutação Mfn2 mostraram distribuição inadequada de mitocôndrias (Detmer et al., 2008). Em camundongos *knockout* para a Mfn2, as mitocôndrias encontram-se fragmentadas e estão ausentes em neuritos longos ou ramificados, o que indica que a fusão também influencia o transporte e a distribuição mitocondrial.

A huntintina é uma proteína acessória que também participa do tráfego bidirecional axonal. Especificamente com relação ao tráfego mitocondrial, a huntintina mutante prejudica o equilíbrio fissão-fusão mitocondrial, inibindo a fusão, o que sugere que a mutação pode também induzir a fragmentação mitocondrial indiretamente (Trushina et al., 2004; Chang et al., 2006).

#### **1.4. Rotenona como modelo de neurodegeneração**

A rotenona é um composto natural extraído a partir das raízes e do caule de diversas espécies de plantas e tem sido extensivamente utilizado como praguicida (Ravanel et al., 1984; Betarbet et al., 2000).

Apesar de ter sido primeiramente relacionada ao desenvolvimento da doença de Parkinson, a rotenona é uma substância bastante interessante para o estudo dos

mecanismos que levam à agregação proteica intra- e extracelular em geral, incluindo-se aqueles envolvidos em doenças neurodegenerativas não associadas ao Parkinsonismo.

A rotenona parece promover a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, tau e  $\beta$ -amiloide constitutivas, sendo vantajoso o uso deste composto no presente estudo já que se pretende desvendar os princípios de agregação de proteínas constitutivas, e não mutantes como ocorre na maioria dos estudos clássicos de neurodegeneração.

A rotenona age primariamente sobre o complexo I mitocondrial de células em diversas áreas do sistema nervoso central, onde possui seus efeitos tóxicos, podendo inclusive levar a alterações da concentração de cálcio e de íons  $K^+$  no meio intracelular (Tai e Truong, 2002; Yang et al., 2005), ativação de astrócitos e células da microglia (Norazit et al., 2010), reação inflamatória (Hu et al., 2010; Pan-Montojo et al., 2010), excitotoxicidade do glutamato (Wu e Johnson, 2009) e na mobilidade mitocondrial, no entanto não altera a integridade do potencial de membrana mitocondrial (Melo et al., 2012).

O efeito da rotenona na cadeia de transporte de elétrons pode causar um aumento de radicais livres de oxigênio, resultando em estresse oxidativo e levando à danos neuronais graves (Kotake e Ohta, 2003).

Betarbet e colegas (2000) mostraram que a administração crônica de rotenona em ratos causou toxicidade para os neurônios dopaminérgicos do sistema nervoso central. Além disso, Bywood e Johson (2003) mostraram que 2h de incubação com rotenona na concentração de 3mM causou destruição dendrítica nos neurônios dopaminérgicos da substância negra em culturas organotípicas.

A presença de agregados contendo alfa-sinucleína em inchaços neurais induzidos por rotenona impede o movimento das organelas como mitocôndrias e lisossomos, levando ao prejuízo celular. Entretanto, Trimmer e colaboradores (2004) demonstraram em um modelo híbrido de Parkinson esporádico criado através da



introdução de genes mitocondrial de pacientes com doença de Parkinson esporádico em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) que carecem de DNA mitocondrial, leva a deposição de alfa-sinucleína, o que reforça a hipótese de que a disfunção mitocondrial poderia levar à agregação proteica nas doenças neurodegenerativas.

Borland e colaboradores (2008) demonstraram que doses baixas de rotenona eram capazes de interferir com a expressão gênica global em neurônios derivados de SH-SY5Y, desencadeando processos que os levam a morte. De fato temos observado em nossos estudos anteriores a alteração da expressão de RNAm das proteínas motoras antes da agregação proteica em cultura primária de neurônios expostas a baixas concentrações de rotenona (Melo et al., 2012).

Além do complexo I mitocondrial, a rotenona também age diretamente sobre os microtúbulos causando sua despolimerização e potencializando a morte neuronal (Choi et al., 2011). Em neurônios dopaminérgicos a deficiência do tráfego axonal leva ao acúmulo de dopamina citosólica a qual está sujeita à oxidação, o que eleva as ROS e contribui com a morte neuronal (Hastings et al., 1996).

Ainda com relação à neurotransmissão dopaminérgica, a rotenona parece também inibir e redistribuir o VMAT2 (transportador vesicular de monoaminas), bem como aumenta a dopamina citosólica em células SH-SY5Y (Watabe e Nakaki, 2008). Interessantemente, camundongos transgênicos que apresentam atividade do VMAT2 têm diminuição do número vesículas de dopamina e desenvolvem degeneração dopaminérgica progressiva (Caudle et al., 2007).

Em baixas concentrações (0,5nM-30nM) a rotenona causa degeneração dos neurônios dopaminérgicos (Gao et al., 2002; Ahmadi et al., 2003; Gao et al., 2003; Moon et al., 2005; Hajjeva et al., 2009). Nas concentrações de 25nM a 30nM a rotenona inibe significativamente a atividade do complexo I, levando a diminuição letal no potencial de membrana mitocondrial (Greenamyre et al., 1999). Ahamadi et al (2003) relataram que a exposição a 30nM de rotenona durante 11 horas reduziu em

77% o número de neurônios dopaminérgicos em comparação com apenas 27% do total das células, indicando que os neurônios dopaminérgicos são mais sensíveis à toxicidade da rotenona.

Notavelmente, Arnold et al. (2011) demonstraram que as taxas de fissão e fusão mitocondrial aumentaram no início da exposição crônica a rotenona, a qual foi invertida mais tarde. Em modelo celular exposto a rotenona, a inibição da fissão, protege contra a perda de neuritos, sugerindo que a disfunção na dinâmica mitocondrial pode estar relacionada com os primeiros mecanismos neurodegenerativos induzidos por rotenona.

O modelo de tratamento com rotenona para a indução de agregados (Sherer et al., 2003; Hoglinger et al., 2005; Feng et al., 2006; Huang et al., 2009) utilizado no presente estudo é adequado, pois exposição crônica à droga induz formação de agregados proteicos contendo alfa-sinucleína, tau e beta-amiloide em células do hipocampo, substância negra, estriado e locus coeruleus (Chaves et al., 2010) e interfere com a expressão de RNAm e síntese de proteínas envolvidas no tráfego de mitocôndrias, a KIF1B e KIF5 (Melo et al., 2012).

A relação entre a formação dos agregados proteicos e a progressão da morte neuronal, inclusive levando ao comprometimento de funções neurológicas, como ocorre em doenças neurodegenerativas, ainda não está bem estabelecida nos trabalhos que tratam os mecanismos de morte neuronal. Não se sabe se a formação de agregados é a causa primária da degeneração ou uma consequência de disfunções neuronais que levam à morte neuronal. Neste sentido, o estudo do tráfego de mitocôndrias pode ser bastante elucidativo na compreensão dos mecanismos que levam à agregação de proteínas constitutivas, já que a dinâmica mitocondrial parece estar alterada em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (Van Laar e Berman, 2009).

Desta forma, conhecer a relação entre a mobilidade mitocondrial 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, uma vez que os primeiros sintomas relacionados ao mau funcionamento da comunicação celular sejam identificados precocemente.

### **1.5. MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) e neurodegeneração.**

Em 1970, um grupo de dependentes químicos fizeram uso de MPTP intravenosa e algumas semanas depois desenvolveram sintomas da doença de Parkinson, a partir de então pesquisas começaram a investigar os mecanismos dessa droga (Langston et al., 1983). Nicklas e colaboradores (1985) mostraram a atividade metabólica do MPTP sobre a mitocôndria, especialmente do seu metabólito MPP<sup>+</sup> que inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons responsável pela produção de energia (Parker et al., 1994).

Uma vez que a deficiência do complexo I mitocondrial foi provada ser um fator importante na neurodegeneração (Betarbet et al., 2000) e os sintomas parkinsonianos foram observados, o inibidor do complexo I mitocondrial MPTP tem sido amplamente utilizado em modelos animais (Langston et al., 1999).

A capacidade do MPTP causar parkinsonismo em seres humanos tem sido um impulso importante para a sua utilização como uma neurotoxina para estudar a patogênese da doença de Parkinson (Jackson-Lewis e Przedborski, 2007).

O MPTP atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica bem como as membranas celulares, é metabolizada pela MAO-B glial, sofre auto-oxidação até a formação do cátion tóxico final MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina).

Estudos dos mecanismos patológicos identificaram o envolvimento da neurodegeneração induzido por MPTP em ratos levando a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, ativação dos mecanismos de apoptose celular e excitotoxicidade

glutamatérgica (Prediger et al., 2011). Embora se aceite que o principal alvo da neurotoxicidade do MPP<sup>+</sup> seja a inibição do complexo I, foram propostos mecanismos alternativos, incluindo a despolimerização dos microtúbulos, o dano oxidativo e inibição da glicólise (Mazzio et al., 2003; Cappelletti et al., 2005).

No entanto, o modelo de MPTP não consegue abarcar a grande variedade de deficiências motoras observadas em pacientes com doença de Parkinson, por exemplo não há relatos da agregação proteica neste modelo (Beal, 2001).

Considerando então a ausência de agregados proteicos em modelos com MPTP, e que a rotenona promove a agregação proteica dependendo da concentração, a análise da mobilidade mitocondrial nestes dois modelos será interessante para o melhor entendimento da relação entre agregados proteicos e a mobilidade mitocondrial nas doenças neurodegenerativas.

## **1.6. Autofagia**

O sistema proteossomal e a via lisossomal são os mecanismos celulares que removem proteínas deformadas e agregadas. Disfunções em ambos mecanismos estão associados às doenças neurodegenerativas (Pan et al., 2008).

A rotenona inibe o sistema proteossomal pela disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, aumento de óxido nítrico e, a longo prazo, também pelo aumento das proteínas a serem degradadas (Chou et al., 2010).

O sistema ubiquitina-proteossomo é uma via altamente conservada que remove da célula as proteínas não funcionais, danificadas e/ou malformadas. No entanto, quando a capacidade do proteossomo é prejudicada, proteínas deformadas não podem ser degradadas e se acumulam no agregossomo, um corpo de inclusão localizado na proximidade do centro organizador de microtúbulos (MTOC).

Esses agregossomos, entretanto, podem ativar a autofagia seletiva de agregados proteicos envolvendo as ações orquestradas de p62/sqstm1, NBR1

(proteína que reconhece especificamente agregados), LC3 (proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve 3) ULK1 e HDAC6 (histona deacetilase 6) (Bjorkoy et al., 2005; Komatsu et al., 2007).

A p62 é uma proteína multifuncional que abriga vários domínios de interação proteína-proteína que medeiam o recrutamento dos autofagossomos via interação com LC3 (Kabeya et al., 2000; Pankiv et al., 2007) bem como favorece a interação com a HDAC6 (Ouyang et al., 2012).

A HDAC6 associa-se ao microtúbulo e às proteínas motoras do tráfego retrógrado (dineínas) para transportar proteínas malformadas ao longo dos microtúbulos ao agregossomo (Furuta et al., 2003). Deficiência de HDAC6 pode resultar no acúmulo de proteínas agregadas e em neurodegeneração, enquanto que a presença de HDAC6 confere neuroproteção, facilitando a degradação autofágica de agregados de proteínas tóxicas (Kawaguchi et al., 2003; Olzmann et al., 2007).

A HDAC6 é uma enzima predominantemente citoplasmática que está envolvida em muitos processos celulares, incluindo também a migração e interação celular (Valenzuela-Fernandez et al., 2008). A tubulina é o substrato principal da HDAC6, sendo que a inibição da HDAC6 pode aumentar a acetilação da tubulina, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hubbert et al., 2002; Zhang et al., 2003), redução na acetilação dos microtúbulos e falha do transporte intracelular são considerados como eventos patogênicos primários na progressão da doença de Alzheimer (Hempen e Brion, 1996).

As proteínas PINK1 e parkina são fatores que atuam em uma via comum para promover degradação autofágica seletiva de mitocôndrias danificadas (mitofagia). A PINK1 é uma quinase encontrada no citosol e na membrana mitocondrial onde ativa a parkina que é uma E3 ligase e sinaliza as mitocôndrias para sua degradação através da ligação de ubiquitinas (Wang et al., 2011). Além disso, a parkina é responsável pela

regulação do NRF1 (fator nuclear respiratório) formando um complexo com o PCG-1 alfa que estão envolvidos na biogênese mitocondrial (Kuroda et al., 2006).

Interessantemente, a parkina interage com a SUMO-1 e conduz a um aumento na atividade da ubiquitina ligase (Um e Chung, 2006). A SUMOilação, é um processo enzimático pós-traducional que envolve a ligação covalente de uma proteína chamada SUMO (proteína tipo ubiquitina) ao substrato. Embora a sequência primária da SUMO seja diferente da ubiquitina, suas estruturas tridimensionais são semelhantes.

Os corpos de Lewy são inclusões imunorreativas para SUMO-1 e a alfa-sinucleína (Dorval e Fraser, 2006). Além disso, a inibição da degradação da proteína tau pelo proteossoma aumenta sua ubiquitinação e reduz a sua SUMOilação (Dorval e Fraser, 2006) relevando a existência de uma regulação fina entre estas duas modificações pos-transducionais para manter a estabilidade da tau.

A rapamicina inibe a atividade da mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), promovendo o estímulo da autofagia. Estudos anteriores demonstraram que a rapamicina exerce efeitos neuroprotetores em vários modelos animais de doenças neurodegenerativas, incluindo o tratamento com rotenona, através do estímulo da autofagia (Qin et al., 2003; Ravikumar et al., 2004; Berger et al., 2006).

Publicações mais recentes têm mostrado que a rapamicina pode estender a expectativa de vida implicando no potencial papel da rapamicina no tratamento e prevenção de doenças relacionadas com a idade, visando a mTOR (Harrison et al., 2009).

A rapamicina levou a diminuição do acúmulo de proteínas ubiquitinadas de alto peso molecular, redução dos níveis de citocromo c na fração citosólica e diminuição dos níveis de citocromo oxidase marcador da subunidade IV (complexo IV) na fração mitocondrial em modelo celular de neurodegeneração utilizando rotenona, sugerindo que a inibição da autofagia por rapamicina pode representar uma estratégia terapêutica molecular para doenças neurodegenerativas (Pan et al., 2009).

## 2. Objetivos

---

Considerando a possibilidade da formação dos agregados ser decorrente de uma possível disfunção celular, a proposta do presente estudo é de avaliar a mobilidade de mitocôndrias e analisar a integridade do potencial de membrana mitocondrial nas fases que antecedem a formação dos agregados proteicos característicos do encéfalo senil contribuindo para o entendimento da neurodegeneração associada ao envelhecimento ou a doenças neurodegenerativas associadas à deposição proteica.

Desta forma, células cultivadas do hipocampo, substância negra e locus coeruleus serão analisadas com os objetivos específicos que seguem:

- Analisar a mobilidade das mitocôndrias antes e durante a formação dos agregados proteicos;
- Verificar a relação do tráfego mitocondrial e a integridade mitocondrial pelo potencial de membrana mitocondrial;
- Analisar o papel do cálcio sobre a mobilidade mitocondrial;
- Avaliar o tráfego mitocondrial após exposição ao MPTP como modelo de neurodegeneração não associado à agregação proteica
- Analisar o efeito do tratamento com rapamicina sobre o tráfego mitocondrial em células expostas a concentrações de rotenona suficientes para estimular a agregação proteica.

## 3. Material e Métodos

---

### 3.1. Animais

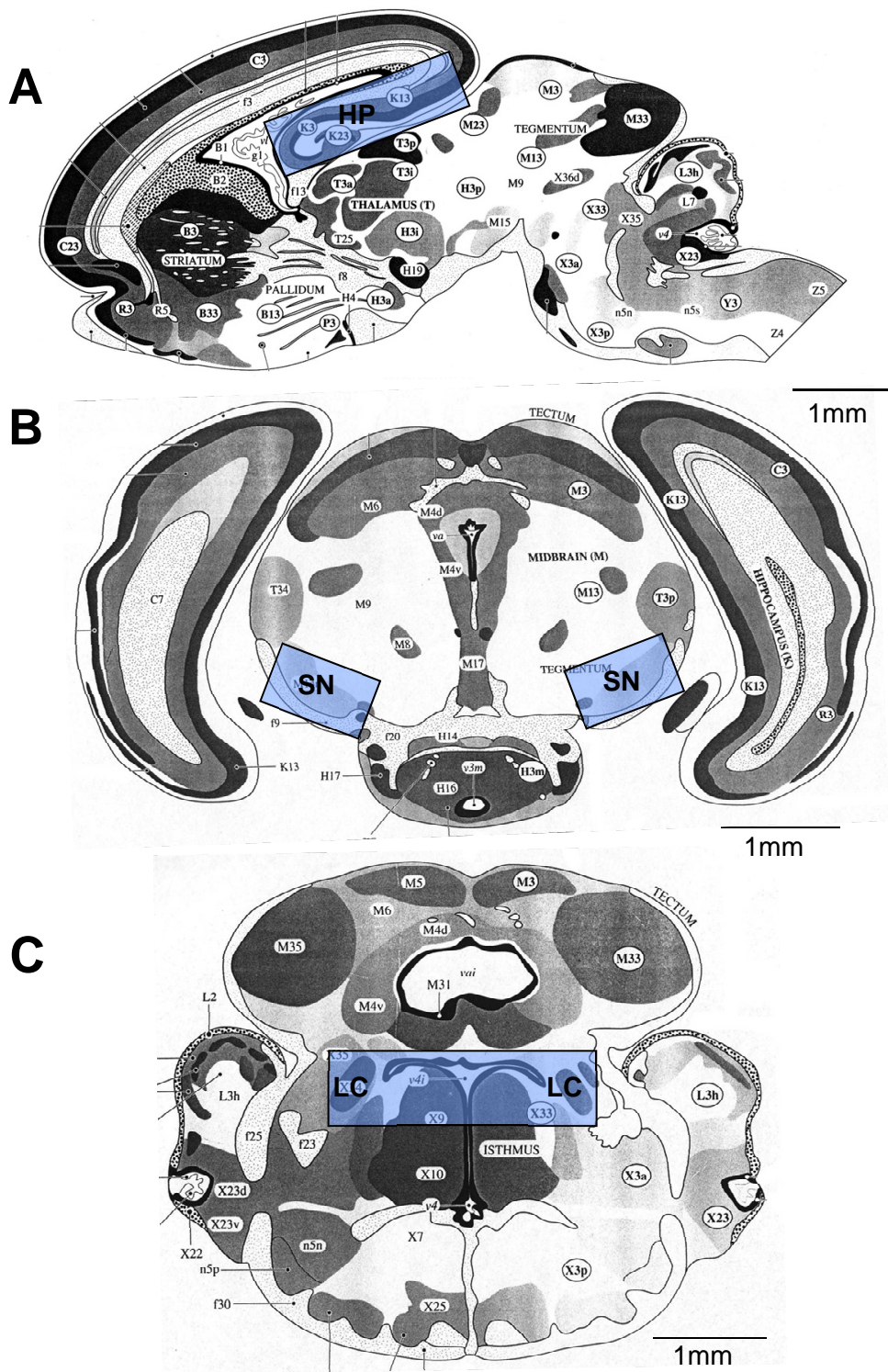
Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas e criados no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Esta linhagem foi escolhida por ser suscetível à agregação de proteínas constitutivas após tratamento com rotenona (Cannon et al., 2009). Os experimentos propostos estão em conformidade com todos os aspectos éticos de experimentação animal recomendados pelo COBEA foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Biociências (protocolo 144/2011) e da Faculdade de Medicina (Projeto 450/11) da USP.

### 3.2. Cultura de células do mesencéfalo, hipocampo e ponte

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e colaboradores (2001). Resumidamente, os encéfalos (n=20, por cultura) de ratos neonatos foram removidos para a retirada da porção ventral do mesencéfalo (contendo a substância negra), da porção dorsal da ponte (contendo o locus coeruleus) e o hipocampo que foram colocados em placa de petri estéril com solução fisiológica gelada contendo NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, glicose e água Milli Q, pH 7,2 ajustado com HCl.

O tronco encefálico foi separado do cérebro com auxílio de um estilete. Os dois hemisférios do cérebro foram separados com uma pinça, possibilitando a retirada do hipocampo. Uma fatia de aproximadamente 2 mm foi retirada do mesencéfalo a fim de isolar a porção ventrolateral que contém a substância negra. Para finalizar, também foi feita uma fatia de aproximadamente 2 mm do tronco encefálico para a retirada da porção dorsomedial contendo o locus coeruleus conforme ilustrado na figura 2.





**Figura 2.** Ilustrações representativas de secções do encéfalo de rato neonato contendo as regiões dissecadas para a cultura de células (quadro azul). (A) hipocampo (HP), (B) região ventrolateral do mesencéfalo contendo a substância negra (SN), (C) região dorsomedial da ponte contendo o locus coeruleus (LC). Esquemas modificados do atlas de Altman e Bayer (1995).

Em seguida, as células mesencefálicas, hipocámpais e pontinas foram dissociadas mecanicamente e quimicamente com Tripsina (0,006/ml Sigma), suspensas em meio de cultura Neurobasal A (Invitrogen) suplementado com *L*-glutamina (250µM, Sigma), glutamax (25µM, Gibco), complexo B27 (2%, Invitrogen) e gentamicina (40mg/l, Invitrogen), e plaqueadas, separadamente, na concentração de 1800 células/mm<sup>2</sup>, em placas de culturas com fundo de vidro, apropriadas para a microscopia confocal previamente tratadas com poli-D-lisina 10µg/ml (Sigma)

As células permaneceram em cultura durante 9 dias tendo o meio trocado após 3 horas do plaqueamento e a cada 3 dias.

### **3.3. Caracterização da cultura de células por imunocitoquímica**

A quantificação do número de neurônios em relação às células totais presentes nas culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus foi feita por imunocitoquímica utilizando-se anticorpo anti-MAP2 (específico para a proteína associada ao microtúbulo neuronal) e a marcação de todos os núcleos celulares com o DAPI (que se intercala ao DNA).

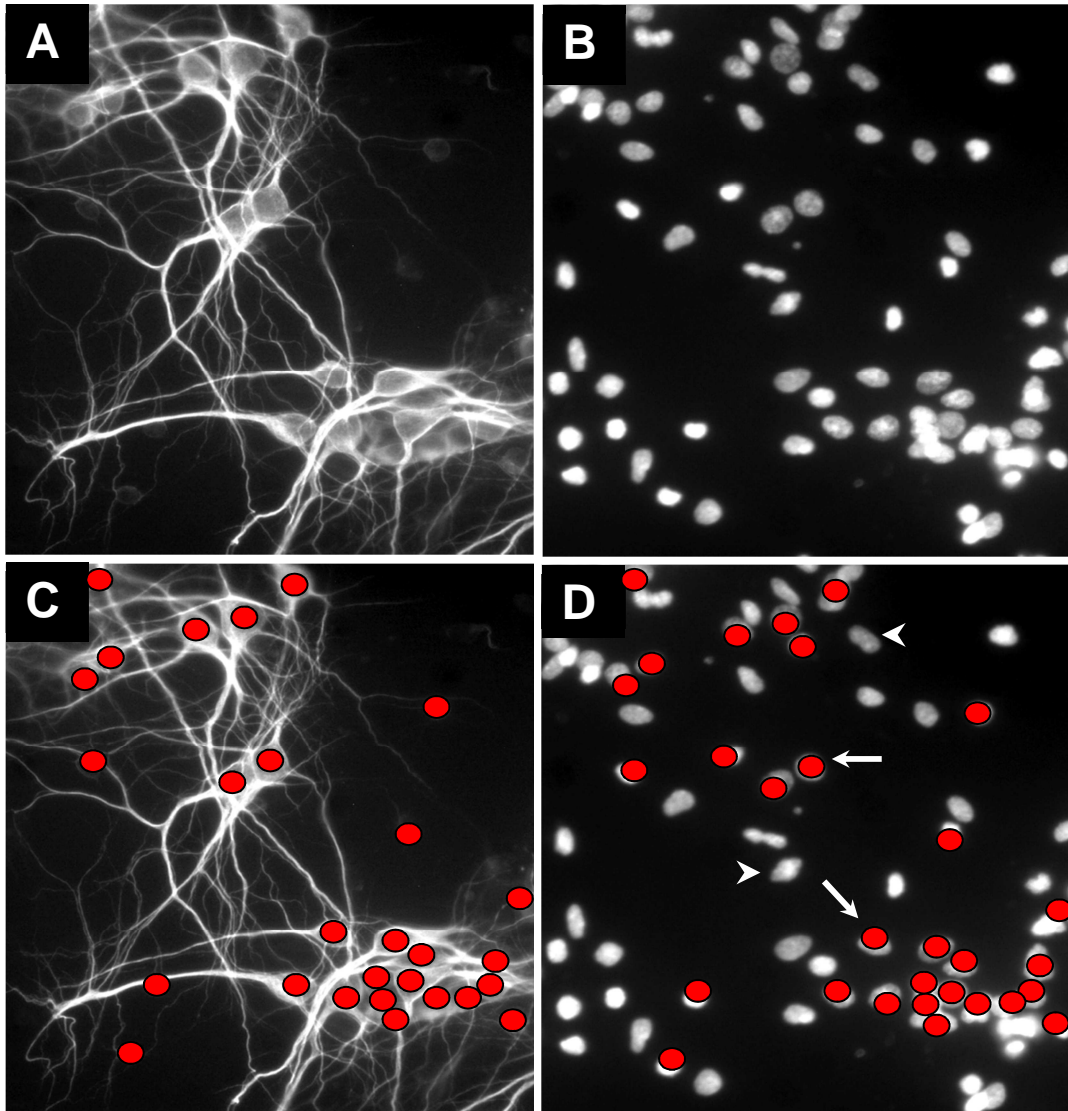
Para tanto, as células foram lavadas por 5 minutos com PBS gelado e fixadas com uma solução contendo metanol e acetona (1:1) durante 10 minutos à -20°C e então lavadas novamente 3 vezes com PBS gelado. Após a fixação as células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,2% de triton durante 30 minutos e bloqueadas também por 30 minutos com soro de cabra (NGS) a 2%, albumina bovina (BSA **Erro! Indicador não definido.**) a 4% em PBS com triton a 0,2% a fim de se evitar ligações não específicas dos anticorpos.

As células foram então incubadas com o anticorpo primário anti-MAP2 (Sigma) na concentração de 1:4000 diluído em solução de PBS contendo 1% NGS, 2% BSA e 0,2% triton, durante a noite à 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos cada, e incubadas com o anticorpo secundário anti-

camundongo (1:120) conjugado à molécula fluorescente FITC, diluído na mesma solução do anticorpo primário, durante 45 minutos à 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) cuja função é marcar os núcleos de todas células em azul.

As células foram então analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss) equipado com filtros para visualização do FITC (emissão de 520nm, verde) e do DAPI (emissão 460nm, azul). A quantificação foi feita comparando imagens digitais tiradas de um mesmo campo com os diferentes filtros usando o programa *Power Point* (Microsoft). O cálculo das porcentagens de neurônios em relação às células totais foi feita com a contagem das células que apresentavam a marcação para a MAP2 e DAPI (consideradas neurônios) e comparadas com a quantidade de células marcadas somente com DAPI (consideradas células da glia) como exemplificado na Figura 3.



**Figura 3.** Imagens digitais representativas do modo de quantificação do número de células imunopositivas ao MAP2 (neurônios). (A) células imunopositivas para MAP2. (B) núcleo das células marcadas pelo DAPI. (C) máscara feita sobre células neuronais. (D) sobreposição da máscara gerada em C sobre a imagem dos núcleos para a contagem. As setas indicam células consideradas neuronais, e as cabeças de setas ilustram núcleos de células não neuronais. A porcentagem de neurônios foi calculada contando-se o número de células imunopositivas à MAP2 em relação às células totais.

### **3.4. Tratamento com rotenona e MPTP das células em cultura**

Após 9 dias de cultivo as células foram expostas a 0,1nM, 0,3nM, 0,5nM e 1nM de rotenona por 24h e 48h ou MPTP a 0,5µM por 24h e 48h para analisar a mobilidade mitocondrial. Estas concentrações de rotenona foram ajustadas para que se estudasse o tráfego das mitocôndrias antes e durante a agregação proteica.

Experimentos anteriores do laboratório verificaram a formação de agregados proteicos contendo beta-amiloide, alfa-sinucleína e tau hiperfosforilada em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus após exposição à rotenona por 48 horas nas concentrações de 0,5nM e 1nM (Chaves et al., 2010). Além disso, demonstramos recentemente que as proteínas motoras de mitocôndrias também encontram-se alteradas em cultura de células expostas a rotenona, mas anterior à formação dos agregados proteicos (Melo et al., 2012).

A rotenona e o MPTP foram diluídos com meio de cultura até as concentrações de interesse. Para o controle, as células foram incubadas com DMSO diluído em meio de cultura (concentração final menor que 0,001%) que foi aplicado sobre as células. Após o tempo destinado ao tratamento (24h ou 48h) as células foram lavadas e submetidas às análises subsequentes da mobilidade mitocondrial usando a sonda fluorescente Mitotracker bem como envolveram também tratamento com EGTA.

### **3.5. Tratamento com EGTA e ionomicina das células em cultura**

A fim de explorar melhor o mecanismo de tráfego mitocondrial associado ao cálcio as células foram expostas a EGTA cuja principal função é quelar o cálcio do meio extracelular, diminuindo o influxo para o meio intracelular ou com ionomicina cuja sua função é aumentar o cálcio intracelular.

Para uma segunda análise sobre a influência do cálcio nos mecanismos desencadeados pela rotenona, as culturas de células do hipocampo e substância negra foram tratadas com EGTA ou ionomicina. As culturas de células foram expostas

a EGTA na concentração 2 $\mu$ M foi diluído em meio de cultura por aproximadamente 30 minutos após serem expostas a rotenona a fim de analisar a influência do cálcio na mobilidade mitocondrial. Já a ionomicina foi utilizado nas concentrações de 0,7 $\mu$ M e 2,0 $\mu$ M diluídos em meio de cultura no momento da análise após a exposição à rotenona por 48h.

### **3.6. Marcação das mitocôndrias**

As mitocôndrias foram marcadas com MitoTracker® Green FM (Invitrogen) em meio de cultura 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 solução de uso foi preparada a partir do estoque até a concentração de 30nM diluída em meio de cultura. Estas concentrações da sonda fluorescente não interferem o potencial de membrana da mitocôndria (Buckman et al., 2001). Após o tempo destinado à exposição à rotenona as células foram incubadas por 30 minutos com MitoTracker Green sendo então lavadas 1 vez com meio de cultura e imediatamente visualizadas.

As mitocôndrias com potencial de membrana intacto foram marcadas com a sonda específica Mitotracker Orange CMTMRos (Invitrogen) em meio de cultura para visualização em microscopia confocal, exatamente como descrito previamente para o MitoTracker Green FM.

### **3.7. Visualização e análise da mobilidade mitocondrial**

Após o tempo de incubação com MitoTracker as células foram imediatamente visualizadas em microscópio confocal para análise da mobilidade mitocondrial em células vivas.

A mobilidade mitocondrial foi analisada em microscopia confocal Zeiss LSM 510 Meta/UV com microscópio Axiovert 200, invertido, motorizado (equipamento multiusuário do Instituto de Biociências alocado no departamento de fisiologia), utilizando objetiva de 63x. O comprimento de onda para excitação do MitoTracker Green FM foi 490nm e para o Orange CMTMRos foi 554nm.

As mitocôndrias foram identificadas pela morfologia, posição, intensidade da marcação e padrão de movimentação. Esta análise foi realizada em 3 campos aleatórios, sendo que o experimento foi repetido 3 vezes com culturas diferentes e regiões diferentes. Foram capturadas 30 imagens por campo a intervalos fixos de 12 segundos.

A quantidade e mobilidade das mitocôndrias marcadas com Mitotracker Green FM ou MitoTracker Orange CMTRos foi estimada utilizando o programa ImageJ (NIH) associado ao plugin Difference Tracker (Babraham Institute, Cambridge, UK). A ferramenta Difference filter do plugin Difference Tracker identifica e extrai as partículas móveis das imagens seriadas bem como relaciona com o número total de partículas por 1000 pixels.

### **3.8. Análise dos resultados**

Os resultados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA). A estatística foi feita usando o programa Graph Pad Prism para Windows (versão 4.03, 21 de janeiro de 2005, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA), foi adotado o nível de significância de 5%. Todos os experimentos foram realizados com no mínimo 3 placas de culturas realizadas em dias diferentes. De cada placa foram quantificados 3 campos diferentes.

## 4. Resultados

---

### **4.1. Porcentagem de neurônios existentes nas culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus**

A quantificação da porcentagem de neurônios em relação às células totais revelou que aproximadamente 50% das células presentes nas culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus são neurônios. O que indica condições ideais para o estudo.

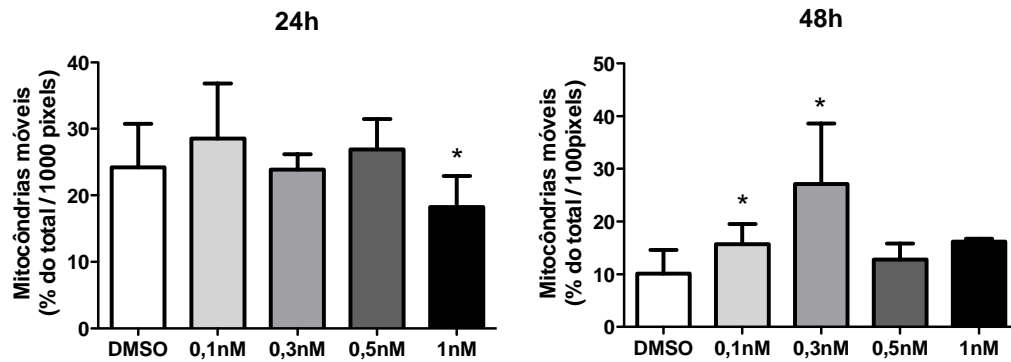
### **4.2. Mobilidade mitocondrial em cultura de células de hipocampo**

A mobilidade mitocondrial diminuiu em culturas de células do hipocampo tratadas com rotenona 1nM por 24h. No entanto, após 48h de incubação com rotenona 0,1nM e 0,3nM houve aumento significativo da mobilidade mitocondrial quando comparado com o DMSO (controle) (Figura 4). A figura 5 exemplifica a marcação das mitocôndrias em cultura de células do hipocampo.

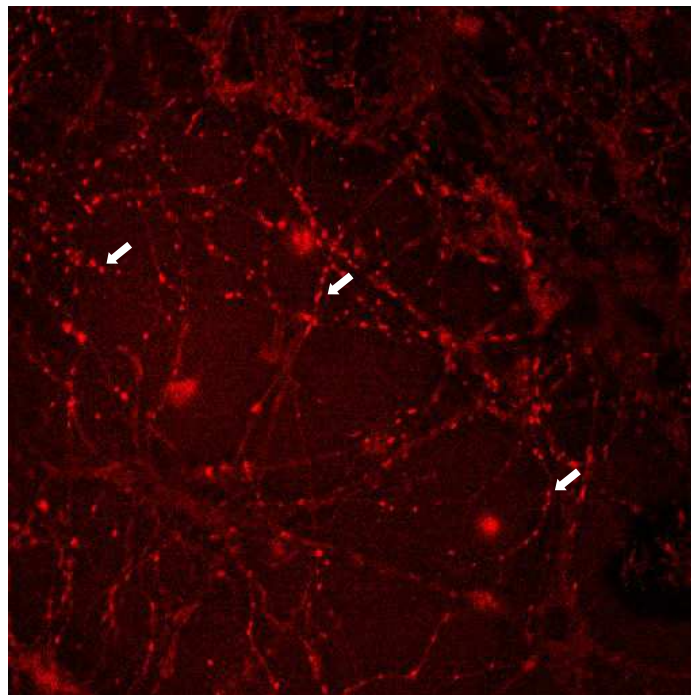
Em uma análise adicional dos dados, foi verificado que a mobilidade mitocondrial está aumentada em células expostas à rotenona durante 48h quando comparadas àquelas expostas durante 24 horas (figura 6).



## Mobilidade relativa das mitocôndrias em cultura de células do hipocampo

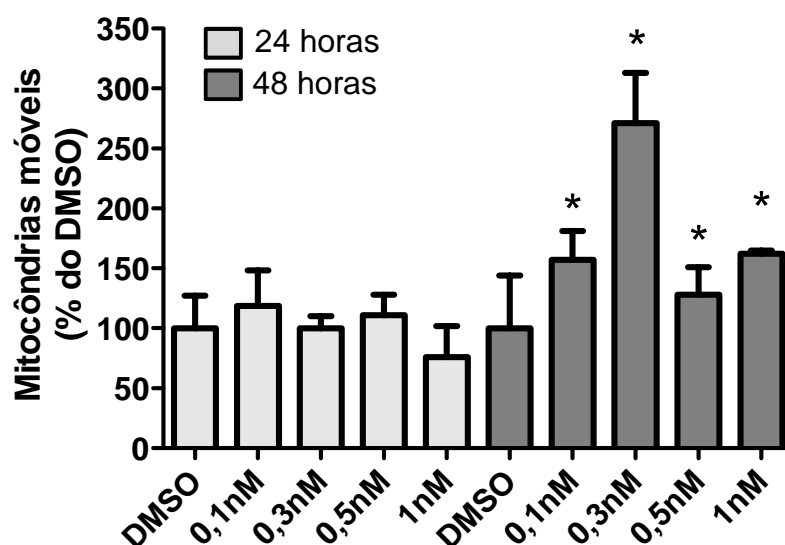


**Figura 4.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do hipocampo tratadas com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM e 1nM ou DMSO como controle por 24h e 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*, \* $p < 0,05$  comparado com o DMSO.



**Figura 5.** Imagem digital de cultura de células do hipocampo ilustrando a marcação de algumas mitocôndrias consideradas nas análises (setas).

### Mobilidade mitocondrial em cultura de células do hipocampo



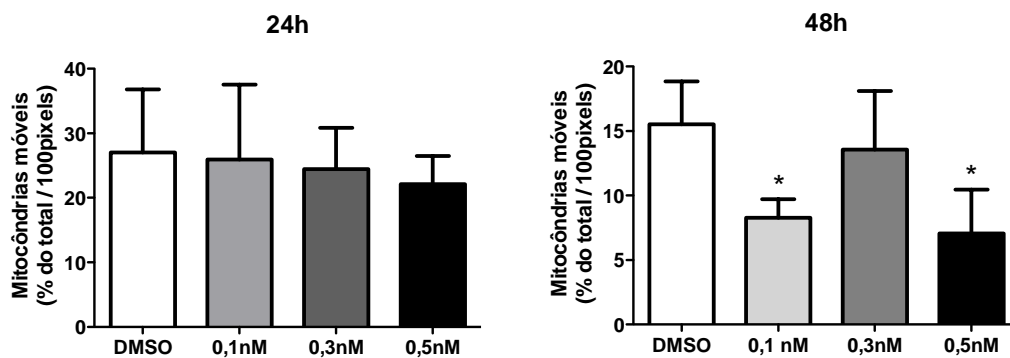
**Figura 6.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do hipocampo tratadas por 24h e 48h com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM; 1nM ou DMSO como controle. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com o grupo 24h mesma condição experimental.

#### 4.3. Mobilidade mitocondrial em cultura de células da substância negra

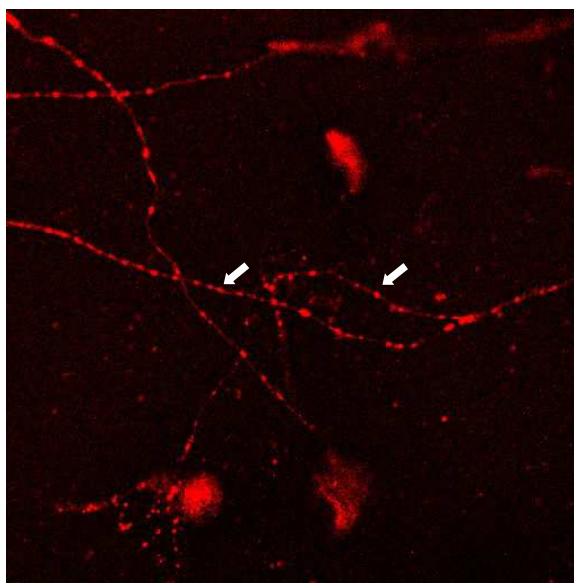
O tratamento com rotenona durante 24 horas não alterou a mobilidade mitocondrial em células da substância negra. Já as concentrações de 0,1nM e 0,5nM de rotenona após 48 horas de incubação promoveram diminuição da mobilidade mitocondrial quando comparado com as células expostas ao DMSO (Figura 7). A figura 8 é uma imagem digital representativa para ilustrar o padrão de marcação das mitocôndrias.

As culturas de células da substância negra tratadas com rotenona por 48h quando comparadas com culturas de células tratadas por 24h, não apresentam alteração da mobilidade mitocondrial como observado na figura 9.

### Mobilidade relativa das mitocôndrias em cultura de células da substância negra

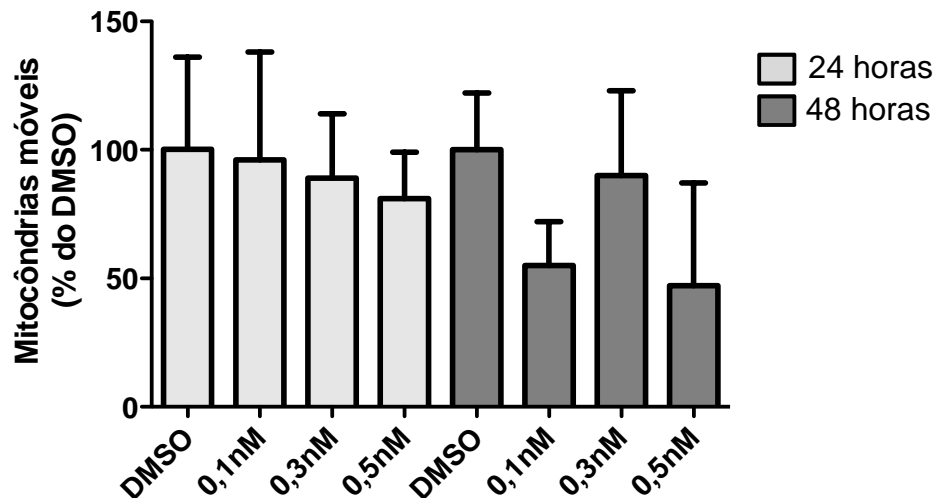


**Figura 7.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células da substância negra tratadas com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM ou DMSO como controle por 24h e 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*, \* $p < 0,05$  comparado com o DMSO.



**Figura 8.** Imagem digital de cultura de células da substância negra ilustrando algumas mitocôndrias consideradas para as análises (setas).

## Mobilidade mitocondrial em cultura de células da substância negra



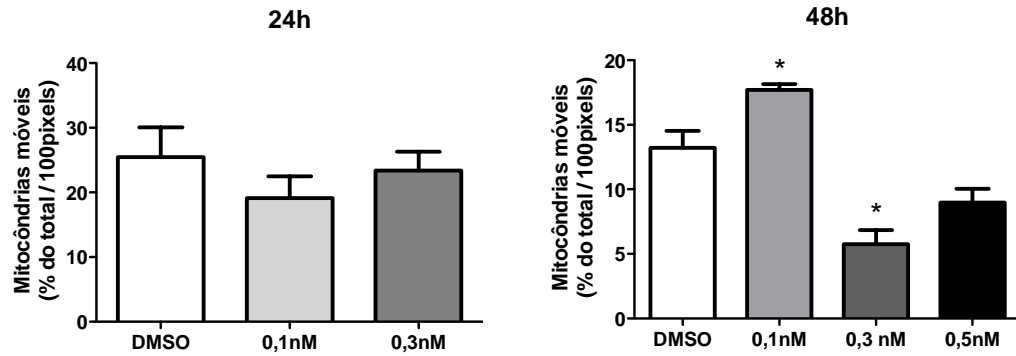
**Figura 9.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células da substância negra tratadas por 24h e 48h com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM ou DMSO como controle. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

### 4.4. Mobilidade mitocondrial em cultura de células do locus coeruleus

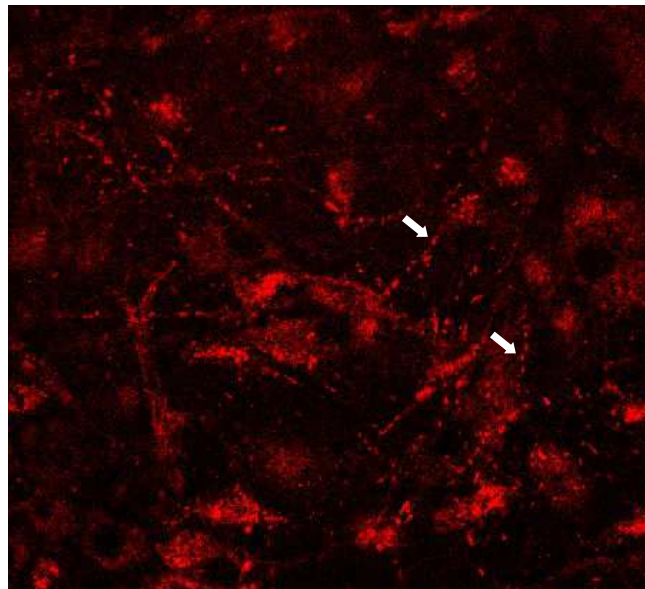
Exposição à rotenona nas concentrações 0,1nM e 0,3nM por 24h não alterou significativamente a mobilidade mitocondrial em culturas de células do locus coeruleus. Após 48 horas de exposição à rotenona, a mobilidade mitocondrial aumentou na concentração de 0,1nM e diminuiu com a concentração de 0,3nM comparado com células do locus coeruleus expostas ao DMSO (Figura 10). A figura 11 é uma imagem digital representativa para ilustrar o padrão de marcação das mitocôndrias das células do locus coeruleus.

Comparando-se a resposta entre os períodos de 24h e 48h de exposição à rotenona, notou-se aumento da mobilidade mitocondrial na concentração de 0,1nM e diminuição significativa na concentração 0,3nM (Figura 12).

### Mobilidade relativa das mitocôndrias em cultura de células do locus coeruleus

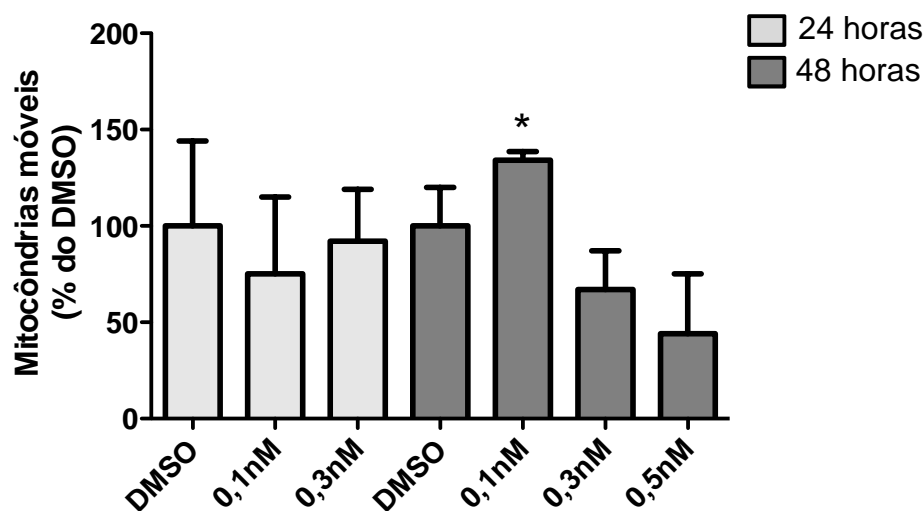


**Figura 10.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do locus coeruleus tratadas com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM ou DMSO como controle por 24h e 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*, \* $p < 0,05$  comparado com o DMSO.



**Figura 11.** Imagem digital de cultura de células do locus coeruleus ilustrando algumas mitocôndrias consideradas para as análises (setas)

## Mobilidade mitocondrial em cultura de células do locus coeruleus

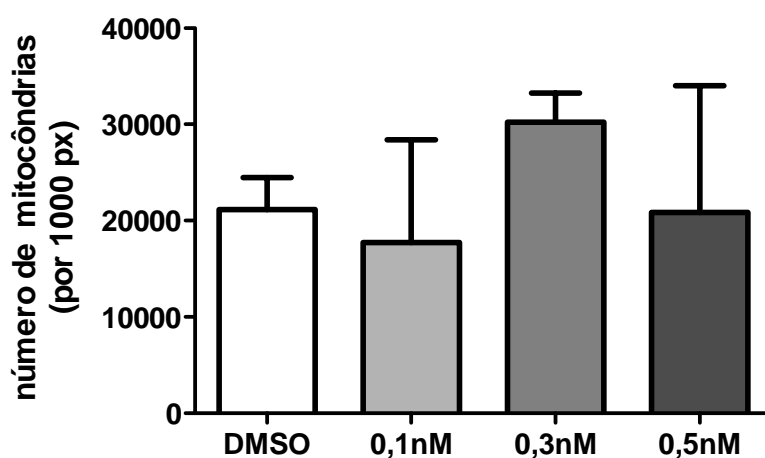


**Figura 12.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do locus coeruleus tratadas por 24h e 48h com rotenona 0,1nM; 0,3nM; 0,5nM ou DMSO como controle. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com o grupo 24h mesma condição experimental.

### 4.5. Número de mitocôndrias com potencial de membrana intacto

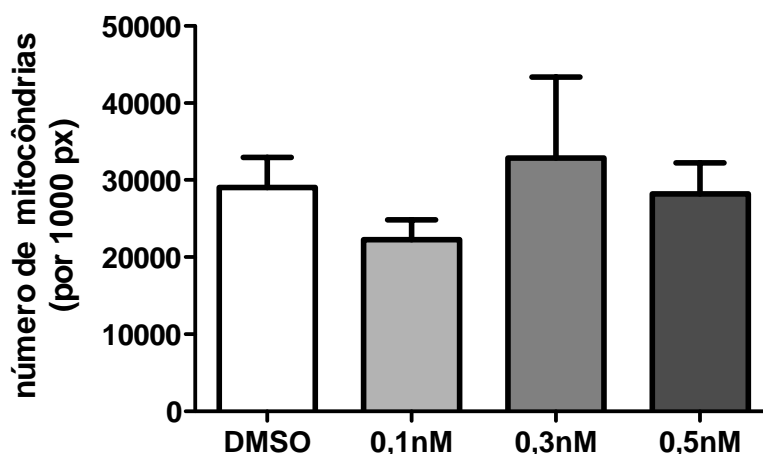
As culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus tratadas com rotenona nas concentrações 0,1nM, 0,3nM e 0,5nM não mostraram alteração no número de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial intacto (Figuras 13, 14 e 15). Podemos então sugerir que a alteração da mobilidade mitocondrial não se relaciona com alteração no potencial de membrana mitocondrial, sugerindo também que não há déficit energético (geração de ATP) que pudesse influenciar o desempenho das proteínas motoras.

**Número de mitocôndrias com potencial de membrana intacto em cultura de células do hipocampo**



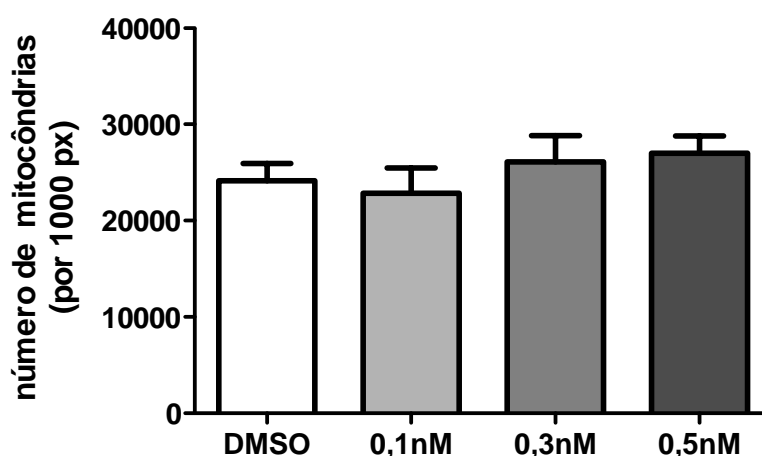
**Figura 13.** Número de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial intacto em cultura de células do hipocampo tratadas com DMSO (controle); 0,1nM; 0,3nM ou 0,5nM de rotenona por 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*.

**Número de mitocôndrias com potencial de membrana intacto em cultura de células da substância negra**



**Figura 14.** Número de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial intacto em cultura de células da substância negra tratadas com DMSO (controle); 0,1nM; 0,3nM ou 0,5nM de rotenona por 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*.

### Número de mitocôndrias com potencial de membrana intacto em cultura de células do locus coeruleus



**Figura 15.** Número de mitocôndrias com potencial de membrana mitocondrial intacto em cultura de células do locus coeruleus tratadas com DMSO (controle); 0,1nM; 0,3nM ou 0,5nM de rotenona por 48h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*.

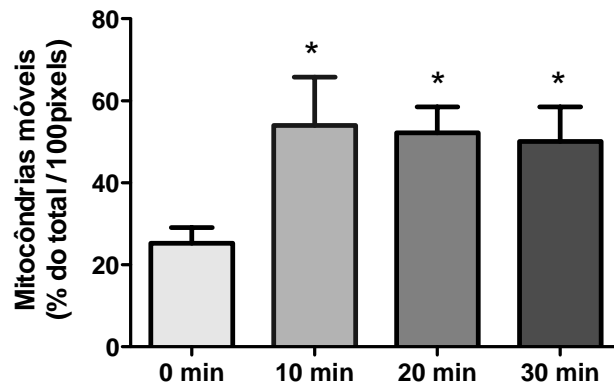
#### 4.6. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostas ao EGTA.

A padronização do tempo de incubação das culturas de células do Hipocampo foi realizada com EGTA na concentração de 2 $\mu$ M aplicados por 10, 20 ou 30 minutos. Os resultados mostraram que o EGTA aumentou a mobilidade mitocondrial desde 10 minutos de incubação (Figura 16).

As células do hipocampo tratadas com rotenona nas concentrações que promoveram aumento da mobilidade mitocondrial foram expostas a EGTA a fim de analisar se esse aumento da mobilidade mitocondrial estava relacionado à diminuição do influxo de cálcio e se seria possível aumentar ainda mais o tráfego mitocondrial. Como resultado foi obtido um aumento na mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo expostas a 0,3nM e 0,5nM de rotenona quando comparado com culturas de células tratadas sem EGTA (Figura 17).

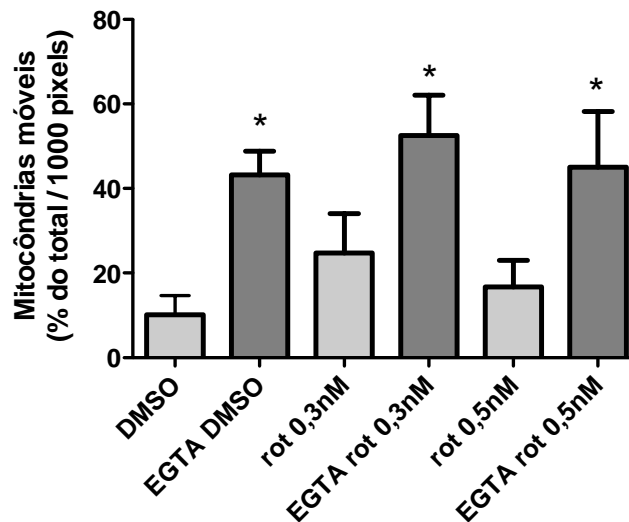


### Mobilidade mitocondrial após EGTA



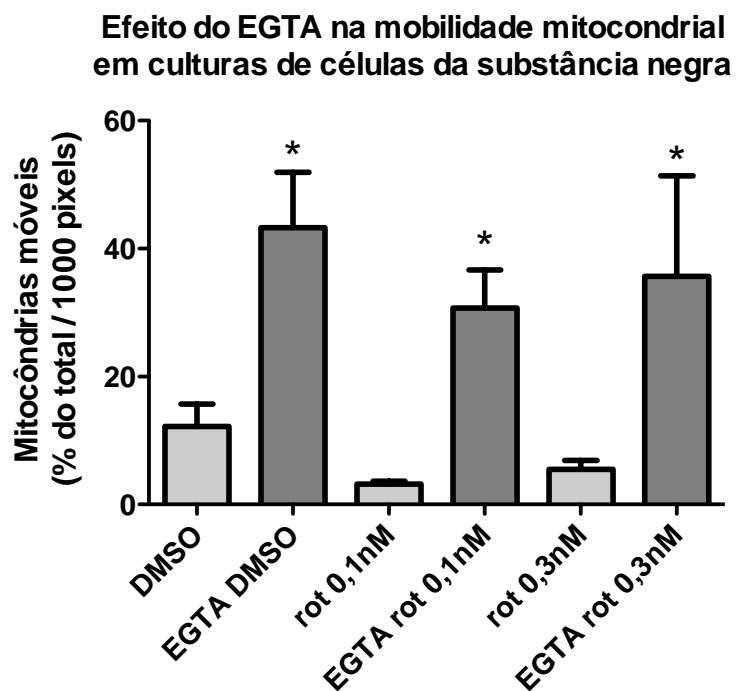
**Figura 16.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em células do hipocampo na ausência (0) e presença de EGTA (2 $\mu$ M) durante 10, 20 e 30 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós-teste de *Tukey*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem EGTA.

### Efeito do EGTA na mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo



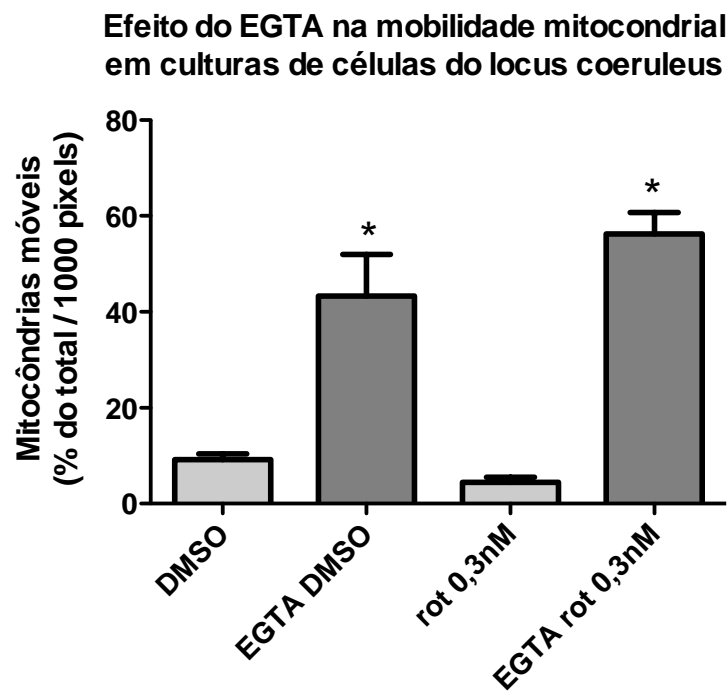
**Figura 17.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do hipocampo tratadas por 48h com DMSO (controle) ou rotenona 0,3nM e 0,5nM seguidas de exposição a 2 $\mu$ M de EGTA por 30 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem EGTA.

Para então avaliar se a diminuição da mobilidade mitocondrial na substância negra estava relacionada ao aumento de cálcio intracelular e se isso seria revertido pela depleção do cálcio, as culturas de células da substância negra tratadas com rotenona nas concentrações de 0,1 e 0,3nM por 48h foram então tratadas com EGTA por 30 minutos. Os resultados revelaram aumento na mobilidade mitocondrial em todas as situações experimentais e no controle (Figura 18).



**Figura 18.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células da substância negra tratadas por 48h com DMSO (controle) ou rotenona 0,1nM e 0,3nM seguidas de exposição a 2 $\mu$ M de EGTA por 30 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem EGTA.

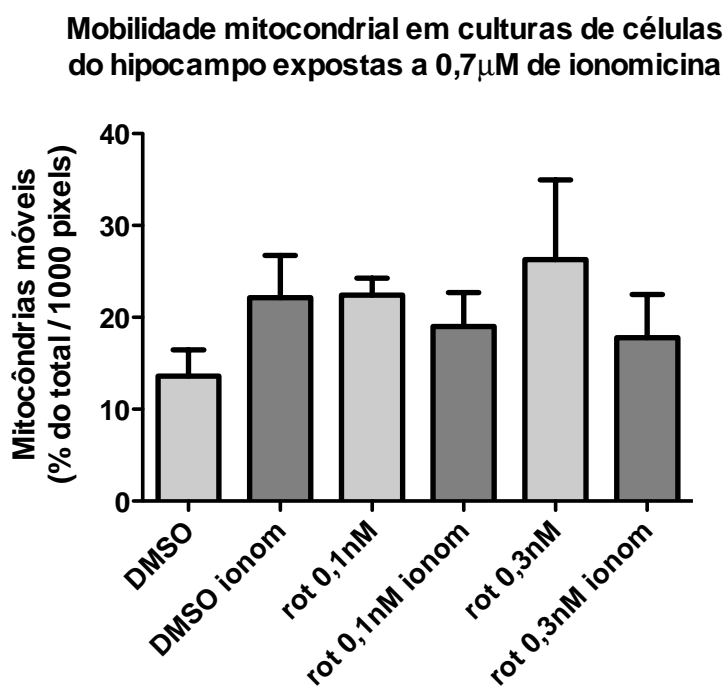
A cultura de célula do locus coeruleus exposta a rotenona na concentração de 0,3nM também mostrou uma diminuição na mobilidade mitocondrial, mas após o tratamento com EGTA houve um aumento significativo na mobilidade mitocondrial na situação controle e após a exposição à rotenona (Figura 19), o que novamente mostra o envolvimento do cálcio na mobilidade mitocondrial quando na presença de rotenona.



**Figura 19.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do locus coeruleus tratadas por 48h com DMSO (controle) ou rotenona 0,3nM seguidas de exposição a 2 $\mu$ M de EGTA por 30 minutos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem EGTA.

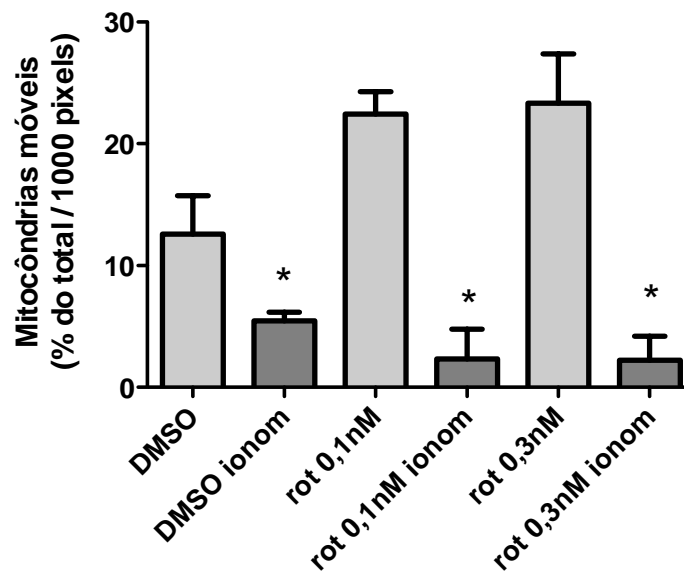
#### 4.7. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo expostas a ionomicina.

A ionomicina, como um inóforo de cálcio, foi utilizada a fim de observar a mobilidade mitocondrial na presença de cálcio. As culturas de células do hipocampo que apresentaram um aumento na mobilidade mitocondrial quando tratadas com rotenona nas concentrações 0,1 e 0,3nM por 48h foram expostas a ionomicina 0,7 $\mu$ M, não mostrando alteração na mobilidade mitocondrial (Figura 20). Entretanto, quando as células foram expostas a ionomicina a 2 $\mu$ M, possibilitando maior entrada de cálcio, houve diminuição significativa na mobilidade mitocondrial quando comparado com a situação sem ionomicina (Figura 21).



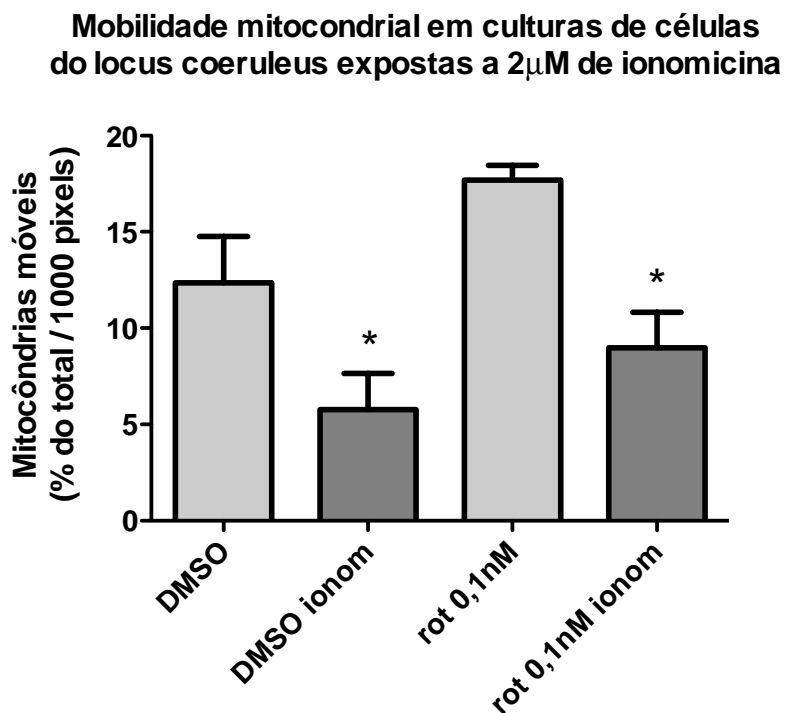
**Figura 20.** Mobilidade mitocondrial em cultura de células do hipocampo tratadas por 48h com DMSO ou rotenona 0,1 ou 0,3nM e após exposição a 0,7 $\mu$ M de ionomicina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo expostas a 2 $\mu$ M de ionomicina



**Figura 21.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do hipocampo tratadas por 48h com DMSO ou rotenona 0,1 ou 0,3nM e após exposição a 2 $\mu$ M de ionomicina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \*p<0,05 comparado com a situação sem ionomicina.

A cultura de célula do locus coeruleus, que também apresentou um aumento da mobilidade quando tratada com rotenona na concentração de 0,1nM, foi exposta a 2 $\mu$ M de ionomicina e apresentou diminuição significativa da mobilidade mitocondrial (Figura 22).

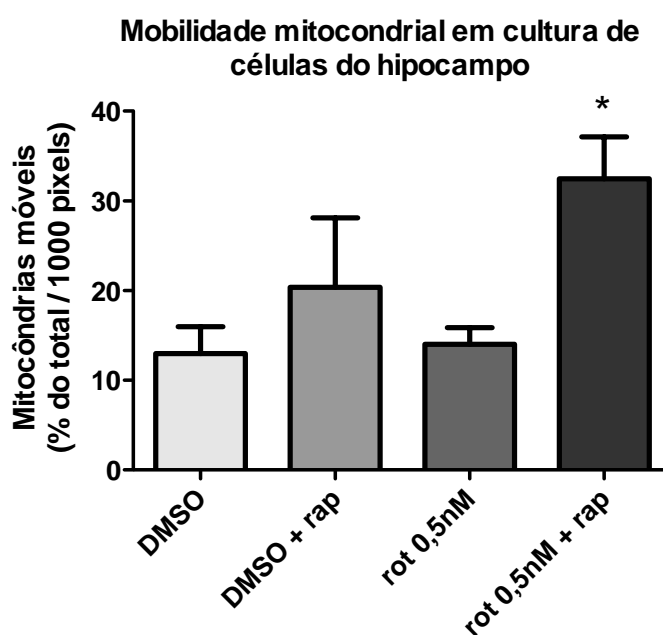


**Figura 22.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do locus coeruleus tratadas por 48h com DMSO ou rotenona 0,1nM e após exposição a 2 $\mu$ M de ionomicina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem ionomicina.

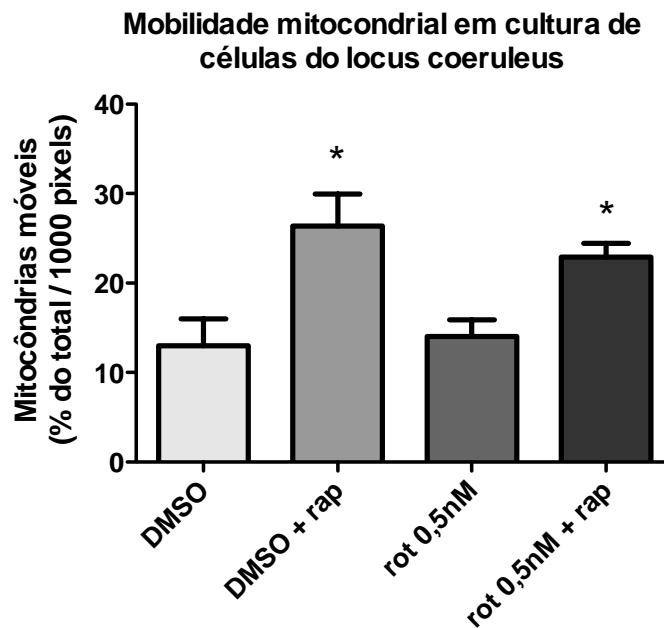
#### 4.8. Mobilidade mitocondrial em culturas de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostos a rapamicina

As culturas células expostas à concentração de 0,5nM de rotenona, as quais apresentam início de formação de agregados proteicos, foram expostas à rapamicina por 48h no intuito de avaliar o efeito da degradação desses agregados sobre a mobilidade mitocondrial. O tratamento com rapamicina promoveu aumento significativo do tráfego mitocondrial em culturas de células do hipocampo e locus coeruleus quando comparado com rotenona 0,5nM (Figuras 23 e 24).

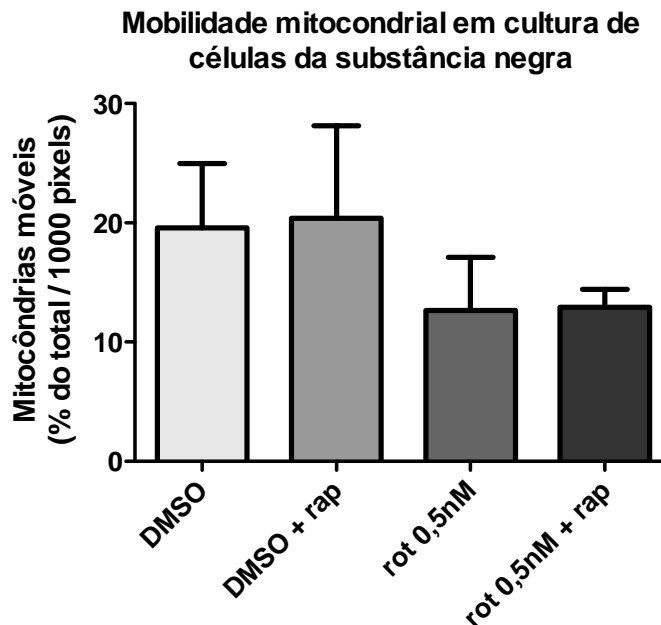
No entanto, as culturas de células da substância negra expostas a rotenona na concentração 0,5nM e rapamicina não apresentaram alteração na mobilidade mitocondrial (Figura 25).



**Figura 23.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em culturas de células do hipocampo tratadas por 48h com rotenona 0,5nM, ou DMSO como controle, e expostas a rapamicina 0,1µM. Os resultados são apresentados como média±S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \*p<0,05 comparado com a situação sem ionomicina.



**Figura 24.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em culturas de células do locus coeruleus tratadas por 48h com rotenona 0,5nM, ou DMSO como controle, e expostas a rapamicina 0,1 $\mu$ M. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem ionomicina.



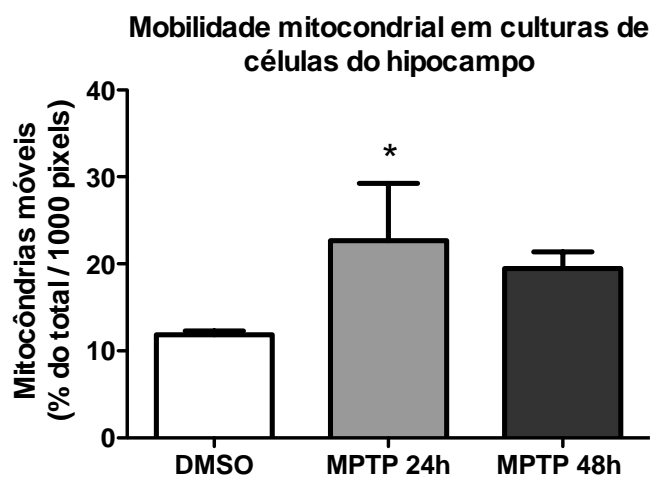
**Figura 25.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em culturas de células da substância negra tratadas por 48h com rotenona 0,5nM, ou DMSO como controle, e expostas a rapamicina 0,1 $\mu$ M. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de duas via seguido do pós-teste de *Bonferroni*, \* $p < 0,05$  comparado com a situação sem ionomicina.



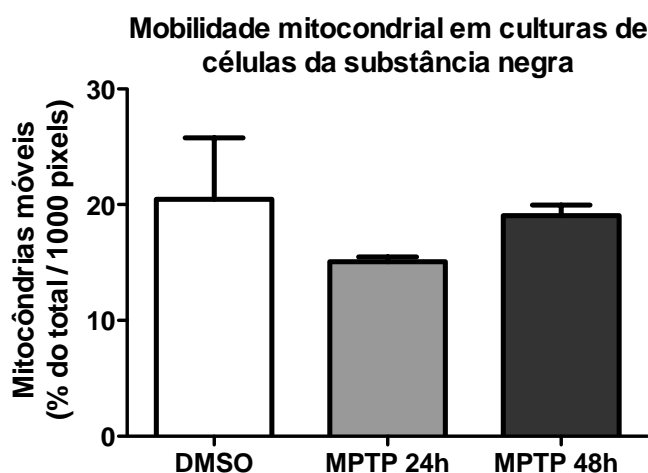
#### **4.9. Mobilidade mitocondrial em cultura de células expostas a MPTP.**

O MPTP também é um inibidor do complexo I assim como a rotenona, e também promove a despolimerização dos microtúbulos, o dano oxidativo e inibição da glicólise (Mazzio et al., 2003; Cappelletti et al., 2005), no entanto sem a formação de agregados proteicos. Para analisar o envolvimento da agregação de proteínas com a mobilidade mitocondrial, as culturas de células da região do hipocampo, substância negra e locus coeruleus foram expostas ao MPTP na concentração 0,5 $\mu$ M por 24 ou 48 horas de acordo com a literatura.

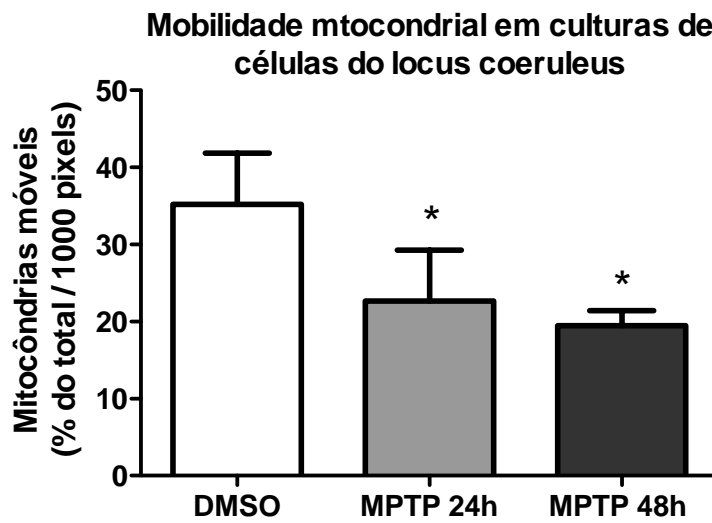
As culturas de células do hipocampo expostas ao MPTP por 24h mostraram um aumento significativo da mobilidade mitocondrial quando comparadas com o DMSO (Figura 26). Já as culturas de células da substância negra não apresentaram nenhuma alteração na mobilidade mitocondrial após o tratamento com o MPTP na concentração 0,5 $\mu$ M (Figura 27). Em contraste, as culturas de células do locus coeruleus tratadas com MPTP por 24h e 48h mostraram uma diminuição significativa na mobilidade mitocondrial (Figura 28).



**Figura 26.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do hipocampo tratadas com MPTP 0,5 $\mu$ M por 24h ou 48h, ou DMSO, como controle. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós teste de *Tukey*. \* $p$ <0,05 comparado com o DMSO.



**Figura 27.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células da substância negra tratadas com MPTP 0,5 $\mu$ M por 24h ou 48h, ou DMSO, como controle. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós teste de *Tukey*.



**Figura 28.** Porcentagem de mitocôndrias móveis em cultura de células do locus coeruleus tratadas com MPTP 0,5 $\mu$ M por 24h ou 48h, ou DMSO, como controle. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.D. de acordo com ANOVA de uma via seguido do pós teste de *Tukey*. \* $p < 0,05$  comparado com o DMSO.

## 5. Discussão

---

De maneira geral, os resultados mostram alterações no tráfego mitocondrial antes da formação dos agregados proteicos, o que concorda com dados da literatura recente e do nosso laboratório e corrobora com a hipótese de que a agregação proteica pode ser resultado de uma disfunção celular primária.

A rotenona é capaz de promover acúmulos de alfa-sinucleína, tau hiperfosforilada e beta amiloide, nas concentrações de 0,5nM e 1nM nas células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus em cultura (Chaves et al., 2010), no entanto a concentração de 0,3nM não promoveu agregação proteica (dado não publicado). Além disso, resultados anteriores do laboratório sugerem que alterações na síntese de proteínas motoras de mitocôndrias que atuam no tráfego anterógrado (Melo et al., 2012) e retrógrado (Chaves et al., 2013), ocorrem em fases que antecedem a formação dos agregados proteicos e podem contribuir para a alteração da mobilidade mitocondrial.

No presente trabalho demonstramos que o tráfego mitocondrial está aumentado no hipocampo após exposição a 0,1 e 0,3nM de rotenona (concentrações que antecedem a formação dos agregados proteicos) ao passo que diminui com 1nM da droga. Já na substância negra, houve uma diminuição do tráfego mitocondrial após 0,1 e 0,5nM de rotenona. O locus coeruleus tem resposta ambígua em que a mobilidade mitocondrial aumenta após 0,1nM e diminui com 0,3nM de rotenona.

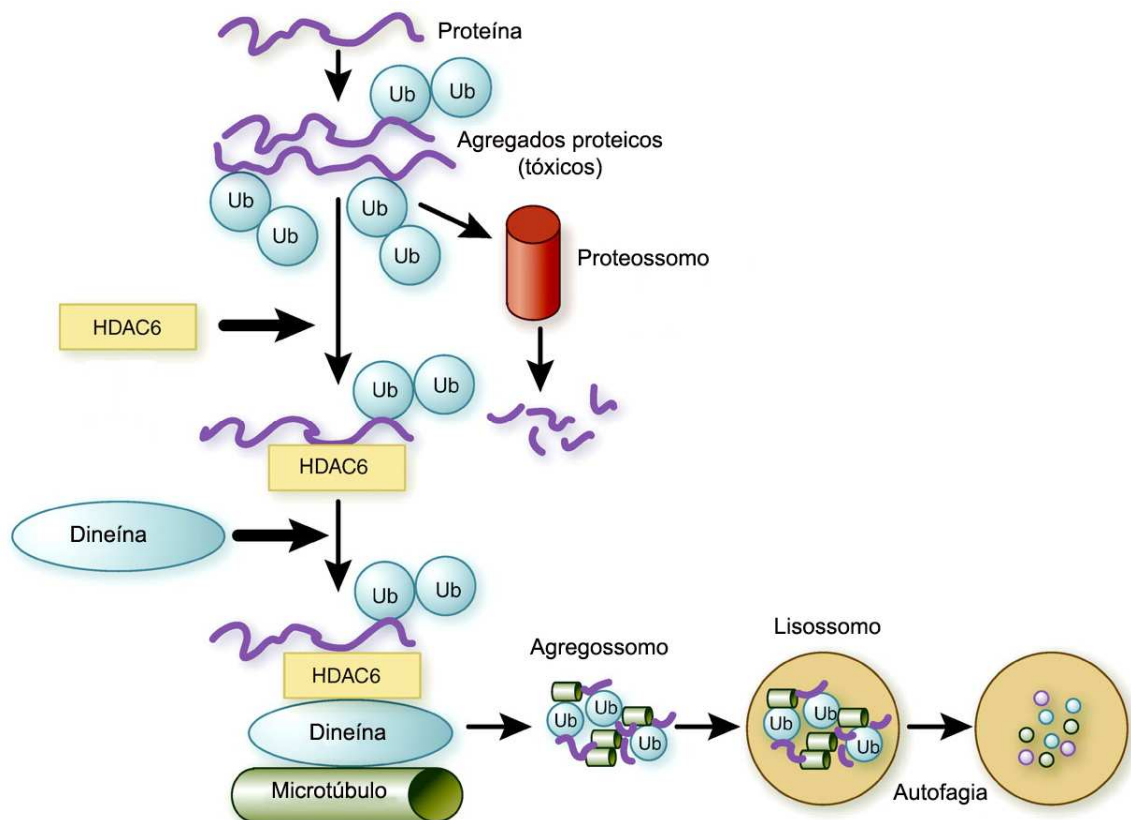
Os resultados sugerem que as regiões encefálicas podem se comportar de forma diferente frente ao estímulo neurodegenerativo, o que reflete diferenças na sensibilidade entre as regiões estudadas. De qualquer forma, pode-se notar que após o início da formação dos agregados, com 0,5nM e 1nM de rotenona, as alterações na mobilidade mitocondrial são de menor magnitude quando comparado com as fases pré-agregados.

Demonstrou-se também que as modificações da mobilidade não estão relacionadas a alterações do potencial de membrana mitocondrial. Os experimentos com EGTA e ionomicina confirmaram que a ação da rotenona sobre o tráfego mitocondrial, antes da agregação proteica, envolve a participação do cálcio, já que foi possível reverter a ação da rotenona ao bloquear (com EGTA) ou aumentar (com ionomicina) os níveis de cálcio nas células.

Já os experimentos com rapamicina mostraram um possível envolvimento do complexo mTOR na mobilidade mitocondrial em células do hipocampo e locus coeruleus, mas curiosamente não teve influência em células da substância negra. A concentração de rotenona utilizada nesses experimentos já é suficiente para promover o início de alterações proteicas.

Recentemente, Hongo e colaboradores (2012) demonstraram que a rotenona aumenta a atividade da GSK3 $\beta$  a qual é a principal quinase da proteína tau e está associada à hiperfosforilação e disfunção da mesma. Ao mesmo tempo, a hiperfosforilação da tau contribui para a ativação da histona deacetilase 6 (HDAC6) diminuindo a acetilação da alfa-tubulina que estabiliza os microtúbulos axonais. Este fenômeno é especialmente interessante quando analisamos a contribuição do tráfego intracelular para a formação de agregados proteicos, exemplificado na figura 29. É interessante notar que a rotenona age também sobre a histona deacetilase 6 e acentua a formação de agregados proteicos (Monti et al., 2010).

Uma das hipóteses para esse fenômeno é que a diminuição da acetilação  $\alpha$ -tubulina diminua também a interação entre os microtúbulos e as proteínas motoras, levando assim a uma disfunção no transporte axonal (Hideshima et al., 2005; Kim et al., 2012). Corroborando com isso, Kim e colaboradores (2012) demonstraram que a disfunção no tráfego intracelular provocada pela exposição ao peptídeo beta-amiloide no hipocampo pôde ser revertida pela inibição da HDAC6.



**Figura 29.** Esquema da associação entre a histona deacetilase 6 (HDAC6) e o sistema de degradação celular. Proteínas poliubiquitinadas (Ub) são enviadas ao proteossomo para degradação, entretanto, caso escapem desta via, são direcionadas para a via lisossomal por associação com a HDAC6 e proteínas motoras (dineína/dinactina) via tráfego dependente dos microtúbulos. Esquema modificado de Hideshima et al. (2005)

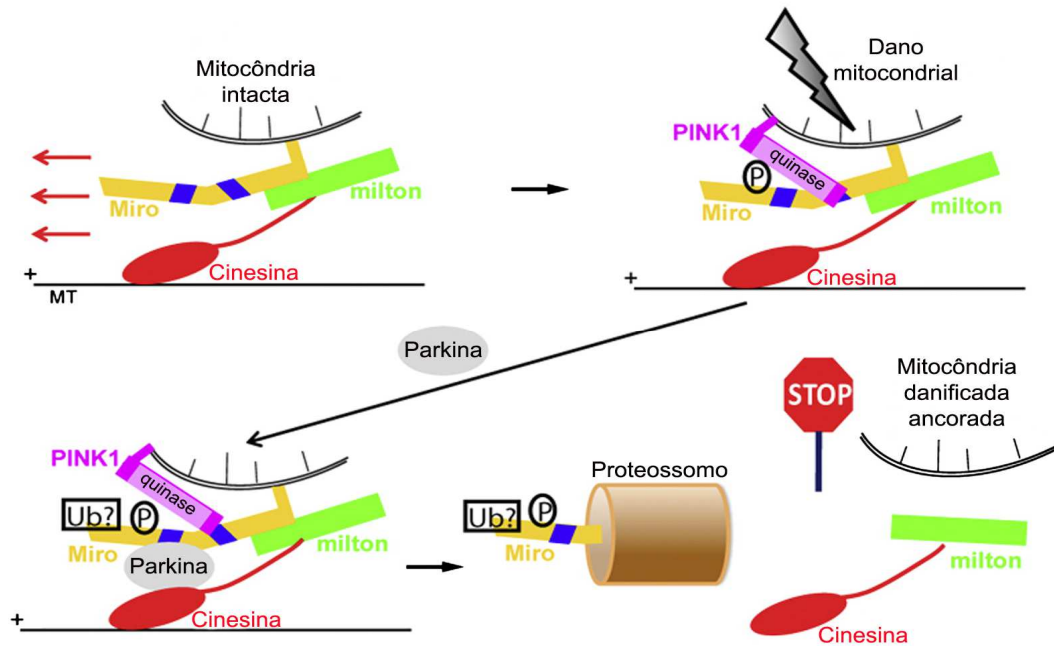
O transporte axonal é regulado pela interação entre as proteínas adaptadoras e motoras, bem como a sua estabilidade é importante no transporte axonal. Especificamente o transporte mitocondrial depende das proteínas adaptadoras Milton e Miro que liga a organela às proteínas motoras (Rice e Gelfand, 2006) e também regulam a mobilidade mitocondrial. Essa regulação da mobilidade mitocondrial dependente de Miro ocorre de uma forma eficiente onde os neurônios levam as

mitocôndrias para locais em que o cálcio citosólico é mais elevado (Wang e Schwarz, 2009).

O esquema representado na figura 30 exemplifica como a regulação do complexo miro/milton pode ser modulada pela disfunção mitocondrial. Chandana (2012) mostrou que a alteração do potencial de membrana mitocondrial ou o dano mitocondrial ativa a PINK1 que fosforila a Parkina a qual é uma ligase de ubiquitina que sinaliza a proteína Miro para degradação e conseqüentemente promove a ancoragem da mitocôndria com a ajuda da sintafilina (Wang et al., 2011). De fato, já tem sido relatada presença de substratos de Parkina em cérebro de pacientes com doença de Parkinson (Ryu et al., 2003; Ko et al., 2005). Além disso, camundongos transgênicos tratados com rotenona exibem aumento de alfa sinucleína fosforilada e da proteína quinase PINK1 (George et al., 2010).

A Parkina tem como substrato também a proteína FAF1, cujo aumento está associado ao aumento do estresse oxidativo, ativação da caspase 3 e formação de corpos de Lewy ligados à doença de Parkinson (Sul et al., 2013). Desta forma, há indícios de que a diminuição do tráfego mitocondrial após tratamento rotenona possa estar relacionada ao aumento dos níveis de PINK1 e parkina, o que deve ser analisado em estudos futuros.

Pensando então no envolvimento autofágico durante o transporte mitocondrial, estudos mostram que a rapamicina, um inibidor do mTOR e ativador autofágico, protege contra a apoptose induzida por rotenona (Pan et al., 2009) e é capaz de neutralizar os efeitos de perda de função da Parkina via aumento da mitofagia, resultando na melhora da função metabólica celular (Siddiqui et al., 2012).



**Figura 30.** Esquema proposto representativo do mecanismo de ancoragem mitocondrial dependente de PINK1 e Parkina. A despolarização mitocondrial estabiliza a PINK1 na superfície mitocondrial, a qual fosforila a Miro, permitindo sua ubiquitinação (Ub) e remoção pela Parkina. Com isso, a degradação da Miro desacopla o complexo Milton/cinesina da organela, ancorando-a. Esquema retirado e modificado de Wang e colaboradores (2011).

O movimento eficiente das mitocôndrias é essencial para o funcionamento dos neurônios. As mitocôndrias produzem a maior parte do ATP necessário para a atividade neuronal bem como desempenha um papel relevante na regulação da homeostase do cálcio e nos processos de apoptose. Já se sabe que a transição do estado móvel para o estado estacionário é finamente regulado para responder a alteração intracelular de cálcio (Yi et al., 2004), e a miro é um sensor de cálcio na regulação da mobilidade mitocondrial (Saotome et al., 2008).

Nossos resultados sugerem que a diminuição da mobilidade mitocondrial após exposição à rotenona envolve a participação do cálcio, já que quando as culturas de células foram expostas ao quelante de cálcio (EGTA) houve aumento da mobilidade



mitocondrial nas células do hipocampo e substância negra. Além disso, a ionomicina, um inóforo de cálcio, foi utilizada para induzir aumento cálcio intracelular (Parihar et al., 2008), o que promoveu diminuição significativa na mobilidade mitocondrial. Além disso, o acúmulo de cálcio na matriz mitocondrial também é um sinal importante que modula o gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, a fosforilação oxidativa.

Considerando a natureza bioquímica da substância negra e locus coeruleus há indícios que estas áreas sejam mais sensíveis aos efeitos do estresse oxidativo e processo senil acelerado, como elevados níveis de ROS, diminuição da mobilidade mitocondrial e danos no DNA mitocondrial (Wallace, 2005).

Em concordância com isso, tem-se que o locus coeruleus é um dos primeiros núcleos afetados durante o curso das doenças de Parkinson e Alzheimer, inclusive a maior perda neuronal em pacientes com doença de Parkinson ocorre no locus coeruleus (Winkler et al., 2007). Isso também pode ser comprovado pela característica clínica dessas doenças em que os pacientes têm o ciclo de sono comprometido. É interessante notar que a diminuição de melatonina no locus coeruleus está associada ao distúrbio do sono REM, na maioria dos pacientes com doença de Parkinson.

O hormônio também modula a função dopaminérgica cerebral e inibe a atividade locomotora, reduzindo a liberação de dopamina e de disparo neuronal no corpo estriado de rato conforme descrito por D'Ambrosio e Vizioli (1984). Tapias e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com melatonina exacerba os efeitos neurodegenerativos da rotenona. Em contraposição, há evidências que a melatonina atua como um antioxidante, prevenindo o acúmulo de alfa sinucleína, além de regular a disponibilidade dos transportadores de dopamina VMAT2 (Saravanan et al., 2007).

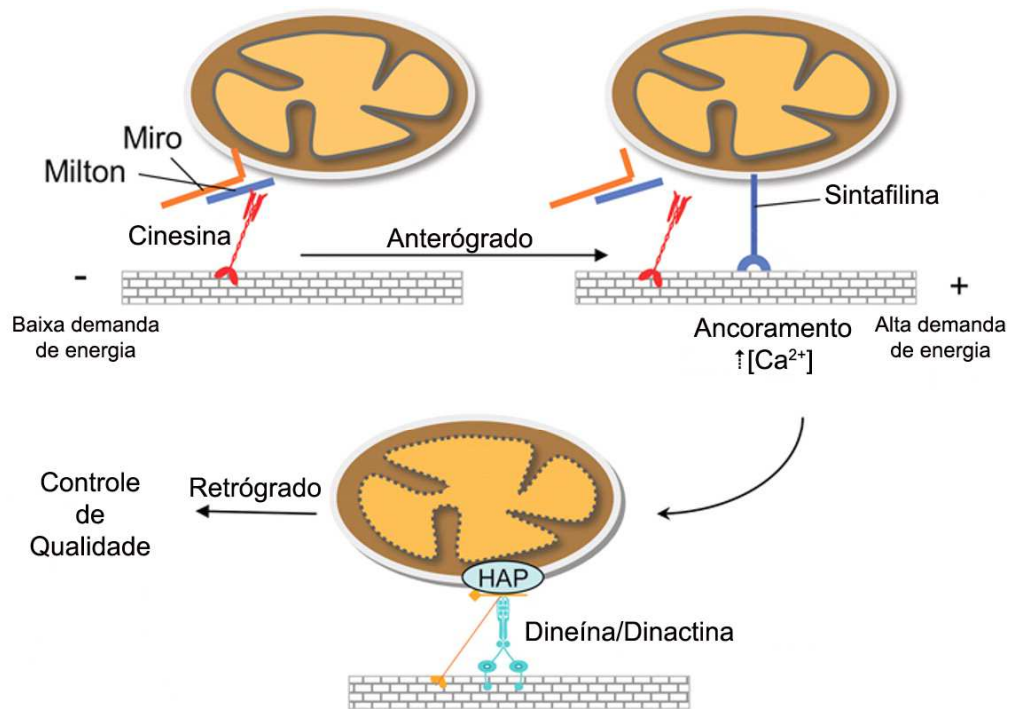
Já a região da substância negra é rica em neuromelanina, a qual encontra-se diminuída em doenças de Parkinson. Os neurônios dopaminérgicos dessa região são

mais vulneráveis a neuroinflamação na doença de Parkinson inclusive devido à reatividade microglial desta área (McGeer e McGeer, 2008)

Também tem sido demonstrado que a neuromelanina inibe a função do proteossomo e aumenta a produção de ROS, sugerindo o envolvimento da neuromelanina no acúmulo de proteínas mal formadas nos neurônios dopaminérgicos em doenças neurodegenerativas (Shamoto-Nagai et al., 2004). Além disso, tanto o MPTP quanto o MPP<sup>+</sup> têm uma elevada afinidade pela neuromelanina, o que parece ser importante para a toxicidade (Lyden et al., 1983), sugerindo um possível mecanismo intensificador da rotenona na substância negra.

Estudos utilizando ratos tratados com rotenona mostram a presença de SUMO1 (E3 ligase) nas regiões da substância negra e locus coeruleus (Wong et al., 2013), essa proteína é responsável pelo processo de SUMOilação e sinalização de seu substrato para degradação. Já foi descrito que a SUMO1 se conjuga com RanBP2 (proteína de ligação Ran2) responsável pela dispersão da mitocôndria (Cho et al., 2007), além do envolvimento da Parkina. A RanBP2 interage com a KIF5B/KIF5C, mas não com a KIF5A. O que vai ao encontro dos resultados do laboratório publicados por Melo e colaboradores (2012), onde células do locus coeruleus tratadas com rotenona na concentração 0,1nM apresentaram um aumento significativo no nível das proteínas KIF5B.

Experimentos do laboratório também mostraram diminuição da expressão do RNAm de proteínas motoras como dineína, dinactina e sintafilina (Figura 31) em concentrações que antecedem a formação de agregados proteicos estão diminuídas na substância negra e no locus coeruleus (Chaves et al., 2013) o que valida os resultados. Além disso, como já mencionado, há o envolvimento da proteína motora dineína com a via seletiva autofágica envolvendo a HDC6 (Hideshima et al., 2005).



**Figura 31.** Modelo de transporte de mitocôndrias dependente de microtúbulos. Participação das proteínas motoras e acessórias no transporte anterógrado (cinesina 1, milton - GRIF-1 e OIP-106, em mamíferos-, miro-1), ancoramento (sintafilina) e tráfego retrógrado (dinactina, dineína e proteína associada à huntintina - HAP) da mitocôndria. Esquema modificado de Milone e Benarroch (2012)

A mobilidade mitocondrial desempenha um papel fundamental também na dinâmica de fissão e fusão mitocondrial. Estudos mostram que o aumento da mobilidade leva ao aumento da fusão e diminuição da fissão (Cagalinec et al., 2013). Esses dados são importantes especialmente quando consideramos o aumento da mobilidade mitocondrial induzida por rotenona no hipocampo e no locus coeruleus.

Misko e colaboradores (2010) mostraram que a associação entre o complexo Milton/Miro/MFN2 é necessário para o transporte mitocondrial axonal. Portanto, o transporte mitocondrial pode afetar diretamente a morfologia mitocondrial, regulando a

fusão e a maquinaria de fissão. Por outro lado, a deficiência de fusão mitocondrial ou fissão prejudica a mobilidade e distribuição mitocondrial.

O prejuízo do transporte mitocondrial em modelo de doença de Parkinson induzido por MPTP foi mostrado pela primeira vez por Morfini (2007), demonstrando que era um evento precoce na neurodegeneração, com base em um estudo em axônios gigantes de lulas. Esses achados corroboram com os nossos estudos, onde demonstramos uma deficiência no transporte mitocondrial em cultura de células tratadas com MPTP. Outro estudo relatou que MPP<sup>+</sup> prejudica especificamente o transporte mitocondrial nos neurônios dopaminérgicos, um evento que antecede defeitos autofágicos e nos microtúbulos (Kim-Han et al., 2011).

No entanto, mecanismos compensatórios durante a degeneração axonal podem promover a polimerização dos microtúbulos pelo aumento dos níveis de tubulina da estabilidade dos microtúbulos (Cartelli et al., 2013), aumentando assim a mobilidade mitocondrial, como nós mostramos no hipocampo. Neste contexto, novamente é essencial considerar a participação da Parkina, pois ela pode liberar dos microtúbulos as mitocôndrias danificadas (Wang et al., 2011).

Tanto MPTP quanto a rotenona inibem o complexo I mitocondrial, reduzindo a síntese de ATP e aumento de produção de ROS (Nicklas et al., 1985) (Betarbet et al., 2000). No entanto, a falta de complexo I não protege os neurônios dopaminérgicos da administração dessas toxinas (Choi et al., 2008), sugerindo a existência de mecanismos de ação alternativos. Os resultados referentes à comparação da ação do MPTP e da rotenona sobre o tráfego mitocondrial são de difícil interpretação com relação à formação dos agregados proteicos, já que para o hipocampo as duas drogas aumentaram o tráfego mitocondrial, na substância negra a rotenona diminuiu o tráfego mitocondrial e o MPTP não promoveu alteração, enquanto no locus coeruleus a ação das duas drogas foi antagônica (a rotenona aumentou o tráfego mitocondrial e o MPTP o diminuiu). Ressalta-se que a concentração de rotenona empregada e a de MPTP

não promovem agregação proteica, portanto os resultados observados não são decorrentes da interferência dos agregados sobre a mobilidade mitocondrial.

Entretanto, a real importância desses eventos mitocondriais para o desencadeamento dos agregados proteicos deve ser analisada em estudos futuros.

## 6. Conclusões

---

Este estudo permite as seguintes conclusões:

- É possível criar um modelo de mobilidade mitocondrial e neurodegeneração baseado no uso de rotenona que recapitula os aspectos anteriores à agregação das proteínas e da doença.
- Houve uma alteração da mobilidade mitocondrial em cultura de células do hipocampo, substância negra e locus coeruleus expostas a rotenona o que ilustra uma resposta celular antes da agregação proteica.
- As respostas de tráfego mitocondrial estão associadas à alteração de cálcio intracelular promovida pela rotenona.
- A alteração da mobilidade mitocondrial não se relaciona com alteração na integridade do potencial de membrana mitocondrial em concentrações baixas.
- A alteração da mobilidade mitocondrial está associada à via autofágica.
- A mobilidade mitocondrial também se altera em células expostas ao MPTP, onde não há agregação proteica, o que deve ser melhor investigado a fim de relacionar a formação de agregados proteicos com a deficiência do tráfego mitocondrial.

## 7. Referências Bibliográficas

---

- Altman J, Bayers, SA (1995) Atlas of Prenatal Rat Brain Development. Hardcover, CRC.
- Ahmadi F. A., Linseman D. A., Grammatopoulos T. N., et al. (2003) The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. **J Neurochem** 87(4), 914-921.
- Arnold B., Cassady S. J., VanLaar V. S. e Berman S. B. (2011) Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model. **Neurobiol Dis** 41(1), 189-200.
- Ballatore C., Brunden K. R., Hurn D. M., Trojanowski J. Q., Lee V. M. e Smith A. B., 3rd (2012) Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. **J Med Chem** 55(21), 8979-8996.
- Bates G. (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. **Lancet** 361(9369), 1642-1644.
- Beal M. F. (2001) Experimental models of Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci** 2(5), 325-334.
- Bendiske J., Caba E., Brown Q. B. e Bahr B. A. (2002) Intracellular deposition, microtubule destabilization, and transport failure: an "early" pathogenic cascade leading to synaptic decline. **J Neuropathol Exp Neurol** 61(7), 640-650.
- Berger Z., Ravikumar B., Menzies F. M., et al. (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. **Hum Mol Genet** 15(3), 433-442.
- Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Giorgetti B., et al. (2007) Alterations of synaptic turnover rate in aging may trigger senile plaque formation and neurodegeneration. **Ann N Y Acad Sci** 1096, 128-137.
- Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Giorgetti B., Solazzi M., Baliotti M. e Meier-Ruge W. (2004) Role of mitochondrial deterioration in physiological and pathological brain aging. **Gerontology** 50(3), 187-192.
- Bertrand E., Lechowicz W., Szpak G. M. e Dymecki J. (1997) Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. **Folia Neuropathol** 35(2), 80-86.
- Betarbet R., Sherer T. B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A. V. e Greenamyre J. T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat Neurosci** 3(12), 1301-1306.
- Billingsley M. L. e Kincaid R. L. (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. **Biochem J** 323 ( Pt 3), 577-591.
- Bjorkoy G., Lamark T., Brech A., et al. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **J Cell Biol** 171(4), 603-614.
- Bohic S., Murphy K., Paulus W., et al. (2008) Intracellular chemical imaging of the developmental phases of human neuromelanin using synchrotron X-ray microspectroscopy. **Anal Chem** 80(24), 9557-9566.
- Borland M. K., Trimmer P. A., Rubinstein J. D., et al. (2008) Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. **Mol Neurodegener** 3, 21.
- Bronfman F. C., Escudero C. A., Weis J. e Kruttgen A. (2007) Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. **Dev Neurobiol** 67(9), 1183-1203.

- Buckman J. F., Hernandez H., Kress G. J., Votyakova T. V., Pal S. e Reynolds I. J. (2001) MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. **J Neurosci Methods** 104(2), 165-176.
- Bywood P. T. e Johnson S. M. (2003) Mitochondrial complex inhibitors preferentially damage substantia nigra dopamine neurons in rat brain slices. **Exp Neurol** 179(1), 47-59.
- Cagalinec M., Safiulina D., Liiv M., et al. (2013) Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. **J Cell Sci** 126(Pt 10), 2187-2197.
- Cai Q., Gerwin C. e Sheng Z. H. (2005) Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. **J Cell Biol** 170(6), 959-969.
- Cannon J. R., Tapias V., Na H. M., Honick A. S., Drolet R. E. e Greenamyre J. T. (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis** 34(2), 279-290.
- Cappelletti G., Surrey T. e Maci R. (2005) The parkinsonism producing neurotoxin MPP+ affects microtubule dynamics by acting as a destabilising factor. **FEBS Lett** 579(21), 4781-4786.
- Cartelli D., Casagrande F., Busceti C. L., et al. (2013) Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer epothilone d is neuroprotective. **Sci Rep** 3, 1837.
- Cataldo A. M., Peterhoff C. M., Troncoso J. C., Gomez-Isla T., Hyman B. T. e Nixon R. A. (2000) 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** 157(1), 277-286.
- Caudle W. M., Richardson J. R., Wang M. Z., et al. (2007) Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. **J Neurosci** 27(30), 8138-8148.
- Chada S. R. e Hollenbeck P. J. (2004) Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. **Curr Biol** 14(14), 1272-1276.
- Chan D. C. (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. **Annu Rev Cell Dev Biol** 22, 79-99.
- Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schluter O. M. e Sudhof T. C. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. **Cell** 123(3), 383-396.
- Chang D. T., Rintoul G. L., Pandipati S. e Reynolds I. J. (2006) Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. **Neurobiol Dis** 22(2), 388-400.
- Chaves R. S., Melo T. Q., D'Unhao A. M., Farizatto K. L. e Ferrari M. F. R. (2013) Dynein c1h1, dynactin and syntaphilin expression in brain areas related to neurodegenerative diseases following exposure to rotenone. **Acta Neurobiologiae Experimentalis** no prelo.
- Chaves R. S., Melo T. Q., Martins S. A. e Ferrari M. F. (2010) Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. **BMC Neurosci** 11, 144.
- Chen H., Detmer S. A., Ewald A. J., Griffin E. E., Fraser S. E. e Chan D. C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **J Cell Biol** 160(2), 189-200.
- Cho K. I., Cai Y., Yi H., Yeh A., Aslanukov A. e Ferreira P. A. (2007) Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. **Traffic** 8(12), 1722-1735.
- Choi W. S., Kruse S. E., Palmiter R. D. e Xia Z. (2008) Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(39), 15136-15141.



- Choi W. S., Palmiter R. D. e Xia Z. (2011) Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. **J Cell Biol** 192(5), 873-882.
- Chou A. P., Li S., Fitzmaurice A. G. e Bronstein J. M. (2010) Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. **Neurotoxicology** 31(4), 367-372.
- Clayton D. F. e George J. M. (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. **J Neurosci Res** 58(1), 120-129.
- Cooper A. A., Gitler A. D., Cashikar A., et al. (2006) Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. **Science** 313(5785), 324-328.
- Coyle J. T., Price D. L. e DeLong M. R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science** 219(4589), 1184-1190.
- D'Ambrosio G. e Vizioli R. (1984) Recklinghausen disease and Parkinson disease: an unusual association. **Acta Neurol (Napoli)** 6(4), 274-279.
- Dagda R. K., Cherra S. J., 3rd, Kulich S. M., Tandon A., Park D. e Chu C. T. (2009) Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. **J Biol Chem** 284(20), 13843-13855.
- Dawson T. M. e Dawson V. L. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science** 302(5646), 819-822.
- den Hartog Jager W. A. e Bethlem J. (1960) The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 23, 283-290.
- Detmer S. A., Vande Velde C., Cleveland D. W. e Chan D. C. (2008) Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. **Hum Mol Genet** 17(3), 367-375.
- Dixit R., Ross J. L., Goldman Y. E. e Holzbaur E. L. (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. **Science** 319(5866), 1086-1089.
- Dorval V. e Fraser P. E. (2006) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. **J Biol Chem** 281(15), 9919-9924.
- Double K. L. (2012) Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 18 Suppl 1, S52-54.
- Dubey M., Chaudhury P., Kabiru H. e Shea T. B. (2008) Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. **Cell Motil Cytoskeleton** 65(2), 89-99.
- Dubocovich M. L. (1984) N-Acetyltryptamine antagonizes the melatonin-induced inhibition of [3H]dopamine release from retina. **Eur J Pharmacol** 105(1-2), 193-194.
- Ebneth A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B. e Mandelkow E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. **J Cell Biol** 143(3), 777-794.
- Endo T. e Yamano K. (2009) Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. **Biol Chem** 390(8), 723-730.
- Evin G. e Weidemann A. (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. **Peptides** 23(7), 1285-1297.
- Exner N., Treske B., Paquet D., et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. **J Neurosci** 27(45), 12413-12418.
- Fedorow H., Tribl F., Halliday G., Gerlach M., Riederer P. e Double K. L. (2005) Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. **Prog Neurobiol** 75(2), 109-124.

- Feng Y., Liang Z. H., Wang T., Qiao X., Liu H. J. e Sun S. G. (2006) alpha-Synuclein redistributed and aggregated in rotenone-induced Parkinson's disease rats. **Neurosci Bull** 22(5), 288-293.
- Fountaine T. M. e Wade-Martins R. (2007) RNA interference-mediated knockdown of alpha-synuclein protects human dopaminergic neuroblastoma cells from MPP(+) toxicity and reduces dopamine transport. **J Neurosci Res** 85(2), 351-363.
- Fransson A., Ruusala A. e Aspenstrom P. (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. **J Biol Chem** 278(8), 6495-6502.
- Fransson S., Ruusala A. e Aspenstrom P. (2006) The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. **Biochem Biophys Res Commun** 344(2), 500-510.
- Frederick R. L., McCaffery J. M., Cunningham K. W., Okamoto K. e Shaw J. M. (2004) Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. **J Cell Biol** 167(1), 87-98.
- Furuta R., Hirai Y., Katase K., et al. (2003) Ectopic chromosome around centrosome in metaphase cells as a marker of high-risk human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasias. **Int J Cancer** 106(2), 167-171.
- Gao H. M., Hong J. S., Zhang W. e Liu B. (2002) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Neurosci** 22(3), 782-790.
- Gao H. M., Hong J. S., Zhang W. e Liu B. (2003) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. **J Neurosci** 23(4), 1228-1236.
- George S., Mok S. S., Nurjono M., et al. (2010) alpha-Synuclein transgenic mice reveal compensatory increases in Parkinson's disease-associated proteins DJ-1 and parkin and have enhanced alpha-synuclein and PINK1 levels after rotenone treatment. **J Mol Neurosci** 42(2), 243-254.
- Gibb W. R. e Lees A. J. (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 51(6), 745-752.
- Gierthmuhlen J., Lienau F., Maag R., et al. (2009) Somatosensory processing in a German family with PINK1 mutations: its potential role in Parkinson disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 80(5), 571-574.
- Gomes L. C., Di Benedetto G. e Scorrano L. (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. **Nat Cell Biol** 13(5), 589-598.
- Greenamyre J. T., MacKenzie G., Peng T. I. e Stephans S. E. (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochem Soc Symp** 66, 85-97.
- Haass C. e Selkoe D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8(2), 101-112.
- Hajieva P., Mocko J. B., Moosmann B. e Behl C. (2009) Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. **J Neurochem** 110(1), 118-132.
- Halliwell B. e Gutteridge J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J** 219(1), 1-14.
- Hardy J. (2004) Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. **Annu Rev Med** 55, 15-25.
- Hardy J. e Selkoe D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science** 297(5580), 353-356.
- Harrison D. E., Strong R., Sharp Z. D., et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **Nature** 460(7253), 392-395.

- Harrison R. S., Sharpe P. C., Singh Y. e Fairlie D. P. (2007) Amyloid peptides and proteins in review. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 159, 1-77.
- Hastings T. G., Lewis D. A. e Zigmond M. J. (1996) Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(5), 1956-1961.
- Hempfen B. e Brion J. P. (1996) Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 55(9), 964-972.
- Herrera E., Caramelli P. e Nitrini R. (1998) Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Psiquiatr Clin** 25, 70-73.
- Hideshima T., Bradner J. E., Chauhan D. e Anderson K. C. (2005) Intracellular protein degradation and its therapeutic implications. **Clin Cancer Res** 11(24 Pt 1), 8530-8533.
- Hoglinger G. U., Lannuzel A., Khondiker M. E., et al. (2005) The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. **J Neurochem** 95(4), 930-939.
- Hollenbeck P. J. e Saxton W. M. (2005) The axonal transport of mitochondria. **J Cell Sci** 118(Pt 23), 5411-5419.
- Hongo H., Kihara T., Kume T., et al. (2012) Glycogen synthase kinase-3beta activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. **Biochem Biophys Res Commun** 426(1), 94-99.
- Hu L. F., Lu M., Tiong C. X., Dawe G. S., Hu G. e Bian J. S. (2010) Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. **Aging Cell** 9(2), 135-146.
- Huang J., Hao L., Xiong N., et al. (2009) Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation. **Brain Res** 1279, 1-8.
- Hubbert C., Guardiola A., Shao R., et al. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature** 417(6887), 455-458.
- IBGE (2012). "Estatística populacional, estimativa 2012." Acesso em 23/04/2013, do site <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=1272>.
- Ishihara N., Nomura M., Jofuku A., et al. (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. **Nat Cell Biol** 11(8), 958-966.
- Jackson-Lewis V. e Przedborski S. (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nat Protoc** 2(1), 141-151.
- Kabaya Y., Mizushima N., Ueno T., et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J** 19(21), 5720-5728.
- Kakita A., Takahashi H., Homma Y. e Ikuta F. (1994) Lewy bodies in the cerebellar dentate nucleus of a patient with Parkinson's disease. **Pathol Int** 44(12), 878-880.
- Kamal A., Almenar-Queralt A., LeBlanc J. F., Roberts E. A. e Goldstein L. S. (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. **Nature** 414(6864), 643-648.
- Kang J. S., Tian J. H., Pan P. Y., et al. (2008) Docking of axonal mitochondria by syntrophin controls their mobility and affects short-term facilitation. **Cell** 132(1), 137-148.
- Kawaguchi Y., Kovacs J. J., McLaurin A., Vance J. M., Ito A. e Yao T. P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. **Cell** 115(6), 727-738.

- Kim C., Choi H., Jung E. S., et al. (2012) HDAC6 inhibitor blocks amyloid beta-induced impairment of mitochondrial transport in hippocampal neurons. **PLoS One** 7(8), e42983.
- Kim-Han J. S., Antenor-Dorsey J. A. e O'Malley K. L. (2011) The parkinsonian mimetic, MPP+, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons. **J Neurosci** 31(19), 7212-7221.
- Kivell B. M., McDonald F. J. e Miller J. H. (2001) Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res Brain Res Protoc** 6(3), 91-99.
- Ko H. S., von Coelln R., Sriram S. R., et al. (2005) Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. **J Neurosci** 25(35), 7968-7978.
- Komatsu M., Waguri S., Koike M., et al. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. **Cell** 131(6), 1149-1163.
- Kondapalli C., Kazlauskaite A., Zhang N., et al. (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. **Open Biol** 2(5), 120080.
- Kotake Y. e Ohta S. (2003) MPP+ analogs acting on mitochondria and inducing neurodegeneration. **Curr Med Chem** 10(23), 2507-2516.
- Kuroda Y., Mitsui T., Kunishige M., et al. (2006) Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. **Hum Mol Genet** 15(6), 883-895.
- Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W. e Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science** 219(4587), 979-980.
- Langston J. W., Forno L. S., Tetrud J., Reeves A. G., Kaplan J. A. e Karluk D. (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Ann Neurol** 46(4), 598-605.
- Lantos P. L. e Papp M. I. (1994) Cellular pathology of multiple system atrophy: a review. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 57(2), 129-133.
- Li J., Scheller C., Koutsilieri E., et al. (2005) Differential effects of human neuromelanin and synthetic dopamine melanin on neuronal and glial cells. **J Neurochem** 95(2), 599-608.
- Li X. J., Orr A. L. e Li S. (2009) Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease. **Biochim Biophys Acta**, doi:10.1016/j.bbadis.2009.1006.1008.
- Liu X. e Hajnoczky G. (2009) Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex. **Int J Biochem Cell Biol** 41(10), 1972-1976.
- Luhrs T., Ritter C., Adrian M., et al. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(48), 17342-17347.
- Lyden A., Bondesson U., Larsson B. S. e Lindquist N. G. (1983) Melanin affinity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine, an inducer of chronic parkinsonism in humans. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)** 53(5), 429-432.
- Lyras L., Cairns N. J., Jenner A., Jenner P. e Halliwell B. (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem** 68(5), 2061-2069.
- Macaskill A. F., Rinholm J. E., Twelvetrees A. E., et al. (2009) Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. **Neuron** 61(4), 541-555.
- Mandelkow E. M., Stamer K., Vogel R., Thies E. e Mandelkow E. (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. **Neurobiol Aging** 24(8), 1079-1085.

- Mandelkow E. M., Thies E., Trinczek B., Biernat J. e Mandelkow E. (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. **J Cell Biol** 167(1), 99-110.
- Marsden C. D. (1961) Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. **J Anat** 95, 256-261.
- Martin L. J. (2007) Transgenic mice with human mutant genes causing Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis provide common insight into mechanisms of motor neuron selective vulnerability to degeneration. **Rev Neurosci** 18(2), 115-136.
- Mayeux R. (2003) Epidemiology of neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci** 26, 81-104.
- Mazzio E., Yoon K. J. e Soliman K. F. (2003) Acetyl-L-carnitine cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in neuroblastoma cells. **Biochem Pharmacol** 66(2), 297-306.
- McGeer P. L. e McGeer E. G. (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov Disord** 23(4), 474-483.
- Melo T. Q., D'Unhao A M., Martins S. A., Farizatto K. L., Chaves R. S. e Ferrari M. F. (2012) Rotenone-Dependent Changes of Anterograde Motor Protein Expression and Mitochondrial Mobility in Brain Areas Related to Neurodegenerative Diseases. **Cell Mol Neurobiol**.
- Mezey E., Dehejia A., Harta G., Papp M. I., Polymeropoulos M. H. e Brownstein M. J. (1998) Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? **Nat Med** 4(7), 755-757.
- Milone M. e Benarroch E. E. (2012) Mitochondrial dynamics: general concepts and clinical implications. **Neurology** 78(20), 1612-1619.
- Misko A., Jiang S., Wegorzewska I., Milbrandt J. e Baloh R. H. (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. **J Neurosci** 30(12), 4232-4240.
- Mohamed A., Cortez L. e de Chaves E. P. (2011) Aggregation state and neurotoxic properties of alzheimer beta-amyloid peptide. **Curr Protein Pept Sci** 12(3), 235-257.
- Monti B., Gatta V., Piretti F., Raffaelli S. S., Virgili M. e Contestabile A. (2010) Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. **Neurotox Res** 17(2), 130-141.
- Moon Y., Lee K. H., Park J. H., Geum D. e Kim K. (2005) Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. **J Neurochem** 93(5), 1199-1208.
- Morfini G., Pigino G., Opalach K., et al. (2007) 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(7), 2442-2447.
- Nangaku M., Sato-Yoshitake R., Okada Y., et al. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. **Cell** 79(7), 1209-1220.
- Nicklas W. J., Vyas I. e Heikkila R. E. (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **Life Sci** 36(26), 2503-2508.
- Norazit A., Meedeniya A. C., Nguyen M. N. e Mackay-Sim A. (2010) Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. **Brain Res** 1360, 119-129.
- Ohama E. e Ikuta F. (1976) Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. **Acta Neuropathol** 34(4), 311-319.
- Ohm T. G., Busch C. e Bohl J. (1997) Unbiased estimation of neuronal numbers in the human nucleus coeruleus during aging. **Neurobiol Aging** 18(4), 393-399.

- Olzmann J. A., Li L., Chudaev M. V., et al. (2007) Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. **J Cell Biol** 178(6), 1025-1038.
- Orr A. L., Li S., Wang C. E., et al. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. **J Neurosci** 28(11), 2783-2792.
- Ouyang H., Ali Y. O., Ravichandran M., et al. (2012) Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. **J Biol Chem** 287(4), 2317-2327.
- Oyanagi K., Wakabayashi K., Ohama E., et al. (1990) Lewy bodies in the lower sacral parasympathetic neurons of a patient with Parkinson's disease. **Acta Neuropathol** 80(5), 558-559.
- Pan T., Kondo S., Le W. e Jankovic J. (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. **Brain** 131(Pt 8), 1969-1978.
- Pan T., Rawal P., Wu Y., Xie W., Jankovic J. e Le W. (2009) Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. **Neuroscience** 164(2), 541-551.
- Pan-Montojo F., Anichtchik O., Dening Y., et al. (2010) Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS One** 5(1), e8762.
- Pankiv S., Clausen T. H., Lamark T., et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem** 282(33), 24131-24145.
- Parihar M. S., Kunz E. A. e Brewer G. J. (2008) Age-related decreases in NAD(P)H and glutathione cause redox declines before ATP loss during glutamate treatment of hippocampal neurons. **J Neurosci Res** 86(10), 2339-2352.
- Parker W. D., Jr., Parks J., Filley C. M. e Kleinschmidt-DeMasters B. K. (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. **Neurology** 44(6), 1090-1096.
- Pilling A. D., Horiuchi D., Lively C. M. e Saxton W. M. (2006) Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons. **Mol Biol Cell** 17(4), 2057-2068.
- Poole A. C., Thomas R. E., Andrews L. A., McBride H. M., Whitworth A. J. e Pallanck L. J. (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(5), 1638-1643.
- Prediger R. D., Aguiar A. S., Jr., Moreira E. L., et al. (2011) The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Curr Pharm Des** 17(5), 489-507.
- Qin Z. H., Wang Y., Kegel K. B., et al. (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. **Hum Mol Genet** 12(24), 3231-3244.
- Ravanel P., Tissut M. e Douce R. (1984) Effects of rotenoids on isolated plant mitochondria. **Plant Physiol** 75(2), 414-420.
- Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nat Genet** 36(6), 585-595.
- Reynolds I. J. e Rintoul G. L. (2004) Mitochondrial stop and go: signals that regulate organelle movement. **Sci STKE** 2004(251), PE46.
- Rice S. E. e Gelfand V. I. (2006) Paradigm lost: milton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. **J Cell Biol** 173(4), 459-461.
- Ross C. A. e Poirier M. A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(11), 891-898.

- Ryu S. W., Lee S. J., Park M. Y., Jun J. I., Jung Y. K. e Kim E. (2003) Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex. **J Biol Chem** 278(26), 24003-24010.
- Sandebring A., Thomas K. J., Beilina A., et al. (2009) Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. **PLoS One** 4(5), e5701.
- Saotome M., Safiulina D., Szabadkai G., et al. (2008) Bidirectional Ca<sup>2+</sup>-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(52), 20728-20733.
- Saravanan K. S., Sindhu K. M. e Mohanakumar K. P. (2007) Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. **J Pineal Res** 42(3), 247-253.
- Scazufca M., Cerqueira A., Menezes P., et al. (2002) Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. **Rev Saúde Pública** 36(6), 773-778.
- Schliebs R. e Arendt T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 113(11), 1625-1644.
- Selkoe D. J. (1989) The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. **Ann Med** 21(2), 73-76.
- Shamoto-Nagai M., Maruyama W., Akao Y., et al. (2004) Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. **J Neural Transm** 111(10-11), 1253-1265.
- Sheng Z. H. e Cai Q. (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci** 13(2), 77-93.
- Sherer T. B., Kim J. H., Betarbet R. e Greenamyre J. T. (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. **Exp Neurol** 179(1), 9-16.
- Siddiqui A., Hanson I. e Andersen J. K. (2012) Mao-B elevation decreases parkin's ability to efficiently clear damaged mitochondria: protective effects of rapamycin. **Free Radic Res** 46(8), 1011-1018.
- Soane L., Kahraman S., Kristian T. e Fiskum G. (2007) Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. **J Neurosci Res** 85(15), 3407-3415.
- Stamer K., Vogel R., Thies E., Mandelkow E. e Mandelkow E. M. (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. **J Cell Biol** 156(6), 1051-1063.
- Stefani M. e Dobson C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. **J Mol Med (Berl)** 81(11), 678-699.
- Stoothoff W., Jones P. B., Spires-Jones T. L., et al. (2009) Differential effect of three-repeat and four-repeat tau on mitochondrial axonal transport. **J Neurochem** 111(2), 417-427.
- Stowers R. S., Megeath L. J., Gorska-Andrzejak J., Meinertzhagen I. A. e Schwarz T. L. (2002) Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. **Neuron** 36(6), 1063-1077.
- Suen D. F., Norris K. L. e Youle R. J. (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes Dev** 22(12), 1577-1590.
- Sul J. W., Park M. Y., Shin J., et al. (2013) Accumulation of the parkin substrate, FAF1, plays a key role in the dopaminergic neurodegeneration. **Hum Mol Genet**.
- Sunde M., Serpell L. C., Bartlam M., Fraser P. E., Pepys M. B. e Blake C. C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. **J Mol Biol** 273(3), 729-739.
- Tai K. K. e Truong D. D. (2002) Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels confers protection against rotenone-induced cell death:

- therapeutic implications for Parkinson's disease. **J Neurosci Res** 69(4), 559-566.
- Tapias V., Cannon J. R. e Greenamyre J. T. (2010) Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone Parkinson's disease model. **J Neurosci Res** 88(2), 420-427.
- Trimmer P. A., Borland M. K., Keeney P. M., Bennett J. P., Jr. e Parker W. D., Jr. (2004) Parkinson's disease transgenic mitochondrial cybrids generate Lewy inclusion bodies. **J Neurochem** 88(4), 800-812.
- Trinczek B., Ebner A., Mandelkow E. M. e Mandelkow E. (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. **J Cell Sci** 112 ( Pt 14), 2355-2367.
- Trushina E., Dyer R. B., Badger J. D., 2nd, et al. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. **Mol Cell Biol** 24(18), 8195-8209.
- Um J. W. e Chung K. C. (2006) Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. **J Neurosci Res** 84(7), 1543-1554.
- Valenzuela-Fernandez A., Cabrero J. R., Serrador J. M. e Sanchez-Madrid F. (2008) HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. **Trends Cell Biol** 18(6), 291-297.
- Van Laar V. S. e Berman S. B. (2009) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. **Exp Neurol** 218(2), 247-256.
- Varadi A., Johnson-Cadwell L. I., Cirulli V., Yoon Y., Allan V. J. e Rutter G. A. (2004) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. **J Cell Sci** 117(Pt 19), 4389-4400.
- Vendruscolo M., Zurdo J., MacPhee C. E. e Dobson C. M. (2003) Protein folding and misfolding: a paradigm of self-assembly and regulation in complex biological systems. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci** 361(1807), 1205-1222.
- Verstreken P., Ly C. V., Venken K. J., Koh T. W., Zhou Y. e Bellen H. J. (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. **Neuron** 47(3), 365-378.
- Vossel K. A., Zhang K., Brodbeck J., et al. (2010) Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. **Science** 330(6001), 198.
- Wakabayashi K. e Takahashi H. (1997) Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. **Eur Neurol** 38 Suppl 2, 2-7.
- Wakabayashi K., Tanji K., Mori F. e Takahashi H. (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. **Neuropathology** 27(5), 494-506.
- Wallace D. C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu Rev Genet** 39, 359-407.
- Wang X. e Schwarz T. L. (2009) The mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. **Cell** 136(1), 163-174.
- Wang X., Winter D., Ashrafi G., et al. (2011) PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. **Cell** 147(4), 893-906.
- Watabe M. e Nakaki T. (2008) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells. **Mol Pharmacol** 74(4), 933-940.
- Watanabe M., Dykes-Hoberg M., Culotta V. C., Price D. L., Wong P. C. e Rothstein J. D. (2001) Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. **Neurobiol Dis** 8(6), 933-941.



- Wersinger C., Jeannotte A. e Sidhu A. (2006a) Attenuation of the norepinephrine transporter activity and trafficking via interactions with alpha-synuclein. **Eur J Neurosci** 24(11), 3141-3152.
- Wersinger C., Rusnak M. e Sidhu A. (2006b) Modulation of the trafficking of the human serotonin transporter by human alpha-synuclein. **Eur J Neurosci** 24(1), 55-64.
- Wersinger C. e Sidhu A. (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. **Neurosci Lett** 340(3), 189-192.
- Winkler S., Hagenah J., Lincoln S., et al. (2007) alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. **Neurology** 69(18), 1745-1750.
- Wong M. B., Goodwin J., Norazit A., et al. (2013) SUMO-1 is associated with a subset of lysosomes in glial protein aggregate diseases. **Neurotox Res** 23(1), 1-21.
- Wu Y. N. e Johnson S. W. (2009) Rotenone reduces Mg<sup>2+</sup>-dependent block of NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. **Neurotoxicology** 30(2), 320-325.
- Yang Y., Liu X., Long Y., et al. (2005) Systematic administration of iptakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, prevents rotenone-induced motor and neurochemical alterations in rats. **J Neurosci Res** 80(3), 442-449.
- Yang Y., Ouyang Y., Yang L., et al. (2008) Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(19), 7070-7075.
- Yi M., Weaver D. e Hajnoczky G. (2004) Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. **J Cell Biol** 167(4), 661-672.
- Yoshida M. (2007) Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration. **Neuropathology** 27(5), 484-493.
- Zecca L., Fariello R., Riederer P., Sulzer D., Gatti A. e Tampellini D. (2002) The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. **FEBS Lett** 510(3), 216-220.
- Zhang Y., Li N., Caron C., et al. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. **EMBO J** 22(5), 1168-1179.
- Zhou C., Huang Y., Shao Y., et al. (2008) The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(33), 12022-12027.
- Zucca F. A., Bellei C., Giannelli S., et al. (2006) Neuromelanin and iron in human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for neuronal vulnerability. **Journal of neural transmission** 113(6), 757-767.

## 8. Anexos

---



### CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **03.11.11** tomou ciência do Projeto nº **450/11** intitulado “**ANÁLISE DA MOBILIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS VIVAS DO HIPOCAMPO, SUBSTÂNCIA NEGRA E LOCUS COERULEUS ANTERIOR À AGREGAÇÃO PROTEICA ENVOLVIDA EM NEURODEGENERAÇÃO.**”, vinculado à pós-graduação do Programa de Fisiopatologia Experimental que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Merari de Fátima Ramires Ferrari

Pesquisador(a) Executante : Stephanie Alves Martins

CEP-FMUSP, 03 de novembro de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paulo Marchiori".

**Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori**  
**Vice-Coordenador interino**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**



OF.CEUA/IB/053/2011  
Ref. 2011.1.1039.41.8

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada nesta data, **APROVOU** o Projeto “Análise da mobilidade mitocondrial em células vivas do hopocampo, substância negra e locus coeruleus anterior à agregação proteica envolvida em neurodegeneração” – **Protocolo 144/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Stephanie Alves Martins).

A análise do procedimento experimental, envolvendo células que não se proliferam, justificam o número de animais utilizados.

Atenciosamente.

Prof. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no  
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.

Prof. Dra. MERARI DE FÁTIMA RAMIRES FERRARI  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

## 9. Atividades acadêmicas

---

- Participação no curso de extensão universitária na modalidade atualização: Animais de laboratório e pesquisa experimental na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo realizado nos dias 08 a 15 de outubro de 2012 com duração de 32 horas em São Paulo/SP.
- Apresentação em forma de painel do resumo intitulado “*Análise da mobilidade mitocondrial em cultura de células da substância negra antes da formação dos agregados proteicos envolvidos na neurodegeneração*”, com autoria de Martins, S.A e Ferrari, M.F.R., no 7º Congresso gaúcho de neurologia e neurocirurgia (Neurosul) realizado nos dias 16 a 18 de maio de 2013 em Canela/RS.
- Apresentação oral e em forma de painel do resumo intitulado “*Análise da mobilidade mitocondrial em cultura de células do hipocampo antes da formação dos agregados protéicos envolvidos na neurodegeneração*”, com autoria de Martins, S.A e Ferrari, M.F.R., na VII reunião regional da federação de sociedades de biologia experimental (Fesbe) realizado nos dias 06 a 08 de junho de 2013 em Guarapari/ES.
- Participação no curso “Técnicas de biologia molecular” coordenado por Patrícia Machado Bueno Fernandes (UFES) com duração de 3 horas durante a VII reunião regional da federação de sociedades de biologia experimental (Fesbe) realizado nos dias 06 a 08 de junho de 2013 em Guarapari/ES.

## 10. Artigo Publicado

---

- Publicação do artigo intitulado “Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to neurodegenerative diseases.” com autoria de Melo, T.Q.; D'unhão, A.M.; **MARTINS, S.A.**; Farizatto, K.L.; Chaves, R.S e Ferrari, M.F.R. na Cellular and Molecular Neurobiology (2013) 33(3):327-335.