

Karen Lisneiva Garcia Farizatto

*Estudo da degradação da proteína Tau hiperfosforilada por
vias independentes do proteassoma, em modelo experimental
de neurodegeneração*

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

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

São Paulo

2014

Karen Lisneiva Garcia Farizatto

*Estudo da degradação da proteína Tau hiperfosforilada por
vias independentes do proteassoma, em modelo experimental
de neurodegeneração*

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

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

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Farizatto, Karen Lisneiva Garcia

Estudo da degradação da proteína Tau hiperfosforilada por vias independentes do proteossoma, em modelo experimental de neurodegeneração / Karen Lisneiva Garcia Farizatto. -- São Paulo, 2013.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Merari de Fátima Ramires Ferrari.

Descritores: 1.Doenças neurodegenerativas 2.Doença de Alzheimer
3.Tauopatias/fisiopatologia 4.Proteínas Tau 5.Peptídeos beta-amiloides
6.Emaranhados neurofibrilares 7.Lisossomos 8.Chaperonas moleculares 9.Proteínas
rab de ligação ao GTP 10.Rotenona/farmacologia 11.Ratos endogâmicos Lewis 12.
Hipocampo 13.Envelhecimento/efeito de drogas 14.Ratos Sprague-Dawley
15.Modelos animais

USP/FM/DBD-450/13

Dedicatória

Aos meus pais, Arlete e Umberto, divido com vocês os méritos desta conquista, vocês fazem parte disso e ela também vos pertence.

“Just know, wherever you go, You are never alone...you can always come back home”. Jason Mraz.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Merari F. R. Ferrari pela oportunidade, vivência na pesquisa e principalmente por colocar situações durante esse trajeto que me ensinaram a enxergar a vida de uma outra forma.

Agradeço ao Professor Doutor Daniel C. Carrettiero pela ajuda científica, experimental e teórica, e por disponibilizar seu laboratório e seus alunos fazendo disso mais do que uma colaboração, uma parceria e amizade.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Ben A. Bahr, pelo qual tenho admiração não só pelo trabalho que desenvolve, mas também pela maneira como orienta e conduz sua pesquisa. Conviver com seu grupo “*PADK team*” me mostrou a diferença entre ser pesquisador e ser cientista. Seu entusiasmo é contagiante!

Estendo meus agradecimentos ao grupo de pesquisa do Dr. Bahr: Heather Romine, Sarah Hafner, Samuel Ikonne, Marsalis Smith, Beck Jhonson, Michael Tyler e Orlando por toda a ajuda, momentos divertidos, amizade e dedicação. Incluo também os amigos que fizeram parte desta história: Allyson Bahr, Sam Romine, Alyssa Romine, Adam Ruiz, Lindsay Ikonne, Lawrence, Ginger Littrell e Terry Littrell, por fazerem eu me sentir tão perto de casa.

Seguimos os agradecimentos aos meus irmãos de universidade que viveram essa trajetória comigo. Em ordem alfabética: Carolliny (Carol), João Paulo (JP), Michael (Maicu / Maicola), Rodrigo (Rosiiiine), Sérgio (Serjoca), Thaiany (Thay), Thaís (Thata) e Vitor (Vitoka). “Até aqui viajamos juntos. Passaram vilas e cidades, cachoeiras e rios, bosques e florestas. Não faltaram os grandes obstáculos. Frequentes foram as cercas, ajudando a

transpor abismos. As subidas e descidas foram realidade sempre presente. Juntos, percorremos retas, nos apoiamos nas curvas, descobrimos cidades. Trabalhamos, mas também rimos muito. Em algumas ocasiões, se nos fosse concedido mais 1 minuto juntos tenho a impressão que teríamos morrido de tanto rir. Chegou o momento de cada um seguir viagem pela trajetória que escolheu, mas com a certeza de que nunca mais estaremos sós. Que as experiências compartilhadas no percurso até aqui sejam a alavanca para alcançarmos a alegria de chegar ao destino projetado. Uma despedida não é o fim, mas com certeza um eterno reencontro”.

Thaís Menezes, Thaís Jong e Mariana, minhas grandes amigas que trago no coração. “Em ti o verão será eterno. E a beleza que tens não perderás e nem chegarás da morte ao triste inverno. Nestas linhas com o tempo crescerás. E enquanto nesta terra houver um ser, meus versos vivos te farão viver”, Willian Shakespeare.

Aos meus agregados, que sem dúvida nenhuma já tem seu espaço próprio na minha vida, Rodolfo e Samir. Agradeço a vocês, pois sei que me quiseram bem. Estiveram sempre presentes, abrindo a porta de vossas casas, coração e emprestando vossas “Thaíses”. A Thaís nossa de cada dia!

Aos meus irmãos, Michele e Everton, por serem sempre meus exemplos e estarem sempre presente na minha vida. Aos meus cunhados Cristiane e Jorge por fazerem parte desta família e compartilharem os momentos mais especiais conosco. Juntos somos completos!

Às crianças mais doces e bagunceiras desse mundo: Everton Jr., Isabella, Larissa e Eduardo. “Jogando bolinha, jogando peão, vi nos olhos da criança a revolução. Que solta pipa pensando em voar e nessa pipa no céu eu vi planar a paz necessária para se avançar”. Trecho da canção lado bom, escrita por Ferrez.

Agradeço aos colegas de laboratório pela convivência e companheirismo.

Agradeço aos professores do Instituto de Biociências, Luis Netto, Débora Chadi, Angela Morgante, João Morgante, Regina Célia e a professora do Instituto Butantan Marilene Demasi pelo respaldo científico e por disponibilizarem a infra-estrutura de seus laboratórios.

Agradeço aos diversos funcionários da Universidade de São Paulo por sempre estarem dispostos a ajudar.

Por fim, agradeço as agências de apoio financeiro para pesquisa CAPES, CNPq e Fapesp!

A felicidade não está nas coisas, mas em nós!

Epígrafe

“Nas palmas de tuas mãos leio as linhas da minha vida. Linhas cruzadas interferindo no teu destino. Não te procurei, não me procurastes, íamos sozinhos por estradas diferentes. Indiferentes, cruzamos...corri ao teu encontro. Sorri. Falamos. Esse dia foi marcado. E, desde então, caminhamos juntos pela vida”. Meu Destino, Cora Coralina.

Apoio Financeiro

Bolsa de Doutorado provida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Beneficiária: Karen L.G. Farizatto

Bolsa de Doutorado sanduíche do programa Ciências sem fronteiras do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNP, processo 246095/2012-1. Beneficiária: Karen L.G. Farizatto

Auxílios Regulares à pesquisa concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) processos: 2008/06484-3; 2011/0694347 e 2012/15495-2. Responsável: Profa. Dra. Merari F.R. Ferrari

Auxílios à pesquisa concedidos pelo CNPq processos: 472042/2008-4; 471779/2010-5. Responsável: Profa. Dra. Merari F.R. Ferrari

Resumo

Farizatto KLG. *Estudo da degradação da proteína Tau hiperfosforilada por vias independentes do proteassoma, em modelo experimental de neurodegeneração* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, está associado à presença de agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada (p-Tau). Esta disfunção da Tau leva a prejuízos na homeostase celular. Um mecanismo chave para diminuir e/ou prevenir os danos promovidos pelos agregados contendo Tau seria o estímulo de sua degradação. Neste sentido, a proposta do presente estudo foi analisar a degradação da proteína Tau após aumento da expressão exógena da co-chaperona Bag-2, a qual influencia o sistema proteassomal de degradação; bem como avaliar a ativação dos sistemas de degradação, a fim de correlacionar estes sistemas em cultura de células primárias e organotípica do hipocampo de ratos. Os resultados mostraram que a rotenona foi capaz de aumentar os níveis de p-Tau e que a superexpressão de Bag-2, foi eficiente em prevenir e degradar a p-Tau. O mecanismo envolvido neste processo envolve a coordenação dos sistemas proteassomal e lisossomal, já que a Rab7 e a Rab24 (envolvidas na via lisossomal) mostraram-se diminuídas na fase que antecede a agregação proteica, enquanto houve aumento da Rab24 na presença dos agregados proteicos. Com relação ao peptídeo beta amiloide, foi demonstrado tendência de aumento de p-Tau acompanhado de diminuição da atividade proteassomal e lisossomal. O tratamento com PADK (ativador lisossomal) foi capaz de reverter este efeito nestas diferentes condições. A análise da interrelação entre os sistemas mostrou que uma inibição do proteassoma favorece a via lisossomal e que o inverso não se repete. Os resultados sugerem que a modulação das vias de degradação pode ser interessante para o estudo, prevenção e tratamento das doenças neurodegenerativas associadas à agregação de proteínas.

Descritores: Doenças neurodegenerativas; Doença de Alzheimer; Tauopatias/fisiopatologia; Proteínas Tau; Peptídeos beta-amiloides; Emaranhados neurofibrilares; Lisossomos; Chaperonas moleculares; Proteínas rab de ligação ao GTP; Rotenona/farmacologia; Ratos endogâmicos Lewis; Hipocampo; Envelhecimento/efeito de drogas; Ratos Sprague-Dawley; Modelos animais.

Summary

Farizatto KLG. *Study of hyperphosphorylated Tau protein degradation by proteasome independent pathways, in experimental model of neurodegeneration* [thesis]. São Paulo: Universidade de Sao Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, are associated to protein inclusions containing hyperphosphorylated Tau (p-Tau). It is well established that Tau dysfunction impairs cell homeostasis. A key mechanism to prevent and/or reduce the damage promoted by aggregates of Tau might be its degradation. In view of this, the aims of the present study is to evaluate p-Tau clearance following exogenous expression of Bag-2, which stimulates proteasome; as well as to analyze the activation of both lysosome and proteasome pathways in order to understand the crosstalk between these two systems in primary and organotypic cultures of rat hippocampus. Results showed that rotenone was able of increasing p-Tau that was prevented and degraded by Bag-2 overexpression. Mechanisms involved in this process involve the coordination of cell degradation systems, depending upon aggregation status, since Rab7 and Rab24 (involved in lysosomal pathway) were decreased before protein aggregation, while Rab24 increased in the presence of protein inclusions. Amyloid-beta peptide also increased p-Tau accompanied by decreased proteasome and lysosome activity. PADK (lysosomal activator) treatment reverted that inhibition promoted by amyloid-beta peptide. Inhibition of proteasome leads to activation of lysosome, but lysosome inhibition does not affect proteasome. Overall results suggest that targeting degradation pathways might be useful to understand, prevent and treat neurodegenerative diseases associated with protein deposits.

Descriptors: Neurodegenerative diseases; Alzheimer disease; Tauopathies/physiopathology; Tau proteins; Amyloid beta-peptides; Neurofibrillary tangles; Lysosomes; Molecular chaperones; rab GTP-binding proteins; Rotenone/pharmacology; Rats, inbred Lewis; Hippocampus; Aging; Rats, Sprague-Dawley; Models, animal

Normas

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Estrutura textual: Desenvolvida de acordo com o disposto em:

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

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Envelhecimento e dados epidemiológicos | 1 |
| 1.2. A doença de Alzheimer e a agregação de proteínas | 3 |
| 1.3. As vias de degradação celular | 8 |
| 1.3.1. <i>O sistema de degradação proteassomal</i> | 9 |
| 1.3.2. <i>A co-chaperona Bag-2</i> | 11 |
| 1.3.3. <i>O sistema de degradação lisossomal</i> | 12 |
| 1.3.4. <i>A interrelação entre os sistemas proteassomal e lisossomal.</i> | 14 |
| 1.4. Proteínas Rab7 e Rab24 e sua relação com a neurodegeneração | 16 |
| 1.5. Modelos experimentais de neurodegeneração | 20 |
| 1.5.1. <i>Indução de agregados proteicos pela rotenona</i> | 20 |
| 1.5.2. <i>Modelo de inclusão proteica após exposição a beta-amiloide</i> | 22 |
| 1.5.3. <i>Estudo da interrelação entre as vias de degradação</i> | 23 |
| 2. Objetivos | 24 |
| 2.1. Objetivos Gerais | 24 |
| 2.2. Objetivos específicos | 24 |
| 3. Materiais e Métodos | 25 |
| 3.1. Animais | 25 |
| 3.2. Cultura primária de células do hipocampo | 25 |
| 3.3. Cultura organotípica do hipocampo | 27 |
| 3.4. Preparo dos clones e transfecção | 30 |
| 3.5. Tratamentos | 32 |
| 3.5.1. <i>Tratamento com rotenona e expressão exógena de Bag-2.</i> | 32 |
| 3.5.2. <i>Tratamento com peptídeo Aβ1-42</i> | 38 |
| 3.5.3. <i>Tratamento com ativador e inibidor lisossomal</i> | 38 |
| 3.5.4. <i>Tratamento com inibidor proteassomal</i> | 39 |
| 3.6. Imunocitoquímica | 39 |
| 3.7. Extração de Proteína e Western Blotting | 40 |
| 3.8. Extração de RNAe PCR em Tempo Real | 42 |
| 3.9. Ensaio sobre a atividade Proteassomal | 44 |
| 3.10. Ensaio sobre a atividade da Catepsina B | 45 |
| 3.11. Análise dos resultados | 46 |
| 4. Resultados | 47 |
| 4.1 Caracterização e validação da cultura de células do hipocampo | 47 |
| 4.2. Transfecção com Bag-2 | 48 |
| 4.3. Bag-2 diminui os níveis de p-Tau e aumenta t-Tau. | 51 |
| 4.4. 24 horas parece insuficiente para análise da ação de Bag-2. | 53 |

| | |
|--|------------|
| 4.5. Bag-2 promove degradação p-Tau em período de 48h, após a indução de agregados com rotenona _____ | 55 |
| 4.6. Expressão exógena de Bag-2 previne a hiperfosforilação da Tau pela rotenona _____ | 57 |
| 4.7. Análise dos níveis das proteínas Rab7 e Rab24 após tratamento com rotenona e superexpressão da Bag-2 _____ | 58 |
| 4.8. O PADK foi capaz de aumentar os níveis de Catepsina B inclusive na presença do inibidor proteassomal _____ | 60 |
| 4.9. Efeito dos inibidores dos sistemas lisossomal e proteassomal sobre marcadores celulares específicos e sobre suas atividades _____ | 61 |
| 4.9.1. Proteínas do sistema de degradação autofagolisossomal _____ | 61 |
| 4.9.2 Análise dos níveis da subunidade 20S do Proteassomo _____ | 63 |
| 4.9.3. Atividade lisossomal e proteassomal _____ | 64 |
| 4.9.4. Inibição dos sistemas de degradação não altera os marcadores sinápticos _____ | 66 |
| 4.10. Efeito do peptídeo A β 1-42 sobre os níveis de p-Tau e integridade sináptica _____ | 67 |
| 4.12. Efeito do peptídeo A β 1-42 sobre os níveis das proteínas relacionadas com as vias de degradação _____ | 69 |
| 4.13. Atividade do proteassomo após tratamento com A β e moduladores de degradação celular _____ | 70 |
| 4.14. Efeito do tratamento com peptídeo A β 1-42 sobre a atividade dos compartimentos de degradação variando o tempo _____ | 73 |
| 5. Discussão _____ | 75 |
| 5.1. Agregação proteica _____ | 75 |
| 5.2. Efeito da Bag-2 sobre a degradação de p-Tau _____ | 77 |
| 5.3. Associação da Bag-2 com a expressão de Rab7 e Rab24 _____ | 79 |
| 5.4. Interrelação entre as rotas de degradação _____ | 82 |
| 6. Conclusões _____ | 88 |
| 7. Referências Bibliográficas _____ | 89 |
| 8. Anexos _____ | 102 |
| 8.1. Aprovação do comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo _____ | 102 |
| 8.2. Aprovação do comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo _____ | 103 |

1. Introdução

1.1. Envelhecimento e dados epidemiológicos

O processo de envelhecimento está associado ao declínio progressivo na capacidade de resposta e adaptação aos desafios do ambiente. Tal declínio inclui as funções do sistema nervoso central o qual desenvolve alterações complexas no decorrer da idade, sendo elas: alterações nas estruturas e na composição bioquímica das células, alterações neuroquímicas, deficiência de reparação, formação de placas senis e neurofibrilares culminando com a morte neuronal, o que leva a alterações macroscópicas como: aumento da área dos sulcos e ventrículos cerebrais (Decarli *et al.*, 2005).

Dados epidemiológicos publicados sobre o envelhecimento pelas Nações Unidas em 2009 contabilizavam 737 milhões de indivíduos na faixa etária igual ou acima de 60 anos, sendo que a concentração dos idosos nos diferentes continentes é diretamente proporcional à renda per capita: uma em cada cinco pessoas tem idade superior a 60 anos de idade na Europa, já na América Latina, Ásia e Caribe há uma em cada dez pessoas e no continente Africano a proporção é de uma para cada dezenove pessoas (United Nations, 2009).

A tendência mundial no aumento da expectativa de vida da população está atrelada tanto às melhores condições de saneamento básico quanto ao desenvolvimento de terapias eficazes na prevenção e no tratamento de doenças, fator este que tem colaborado para o declínio progressivo das taxas de mortalidade (Alzheimer's Association, 2012).

Juntamente com as perspectivas de envelhecimento populacional, tem sido projetado o aumento de doenças que a ciência ainda está buscando entendimento, como, por exemplo, a doença de Alzheimer para a qual o maior fator de risco é justamente o envelhecimento. Desta forma, cerca de 90% dos casos da doença de Alzheimer são caracterizados como esporádicos, sem uma etiologia definida que acomete indivíduos idosos (**Alzheimer's Association**, 2012), em contraposição aos casos genéticos em que mutações em diversos genes contribuem para o surgimento da doença de Alzheimer mais precocemente, correspondendo a cerca de 10% dos casos da doença.

Em 2009, dados publicados pelas Nações Unidas projetavam que, no ano de 2050, a população idosa por volta dos 60 anos será de 2 bilhões de pessoas, sendo que 20% da população idosa irá corresponder a indivíduos acima de 80 anos (**United Nations**, 2009). Em conjunção a isso a prevalência da doença de Alzheimer estimada para 2050 quadruplicará em relação a 2006, em havia cerca de 26,6 milhões de pessoas acometidas (**Alzheimer's Association**, 2007).

De acordo com um estudo populacional brasileiro realizado com idosos numa comunidade de São Paulo, a prevalência de demência varia de 2%, entre indivíduos com idade de 65 a 69 anos; a altíssimos 40%, entre aqueles com idade superior a 84 anos (Herrera, Caramelli e Nitrini, 1998), sendo que 60% a 70% destes casos de demência correspondem especificamente à doença de Alzheimer. Outras doenças que também compoem este quadro são: degeneração lobar frontotemporal, doença de

Parkinson e acidente vascular cerebral (**Alzheimer's disease international**, 2009).

Os gastos associados ao cuidado de pacientes com doença de Alzheimer e outras demências chegaram a 200 bilhões no ano de 2012, e a perspectiva é que esse custo chegue a 1,1 trilhão em 2050 nos Estados Unidos (**Alzheimer's Association**, 2012).

A demência leva à inabilidade em desempenhar diversas funções, desde atividade laboral até incapacidade de cuidado próprio. Cerca de 12% dos anos vividos pelos indivíduos acometidos por demências são em estágio de inabilidade. Caso as intervenções terapêuticas fossem capazes de atrasarem a progressão da doença por apenas um ano, haveria 9,2 milhões de casos da doença a menos em 2050 (**Alzheimer's Association**, 2007).

De uma maneira geral, as doenças neurodegenerativas compartilham alterações fisiológicas, celulares e moleculares as quais serão detalhadas adiante especificamente para a doença de Alzheimer.

1.2. A doença de Alzheimer e a agregação de proteínas

A doença foi descrita por Alois Alzheimer, em 1906. Alzheimer nasceu na Alemanha em 14 de junho de 1864, em Marktbreit, e faleceu em 19 de dezembro de 1915 (Kircher e Wormstall, 1996). Ele era médico, psicólogo e cientista. Sua trajetória ficou marcada quando concluiu o caso de uma de suas pacientes, Auguste Deter, que em estágios precoces da doença, descrevia seus sintomas como: *“eu tenho perdido a mim mesma”*, identificado como lapsos de memória. Auguste era uma mulher saudável até

que os sintomas da doença ficaram mais evidentes, aos 51 anos de idade, caracterizados por desorientação, perda de memória recente e inabilidade no uso da linguagem, até que, a com a progressão da doença, ela passou a requerer cuidados especiais.

Após a morte de sua paciente, aos 55 anos, Alzheimer examinou o cérebro dela identificando e descrevendo suas alterações. Macroscopicamente, há nítida perda de massa encefálica, alargamento dos ventrículos e espaçamento dos giros cerebrais, caracterizando o quadro de atrofia cerebral (Cipriani *et al.*, 2011). Microscopicamente, foi identificada a presença de placas acumuladas nos espaços entre as células nervosas, bem como agregados neurofibrilares no meio intracelular (Graeber *et al.*, 1998). A presença desses agregados de proteínas serve ainda hoje, como marcadores para o diagnóstico das duas formas da doença de Alzheimer, esporádica e familiar.

Os agregados proteicos distribuem-se pelo encéfalo extra e intracelularmente, e estão associados aos processos patológicos relacionados com a neurodegeneração inclusive em indivíduos idosos não acometidos por doenças neurodegenerativas (Dayan, 1970).

A agregação proteica é uma característica comum das doenças neurodegenerativas, em conjunto com outras alterações nos diversos compartimentos celulares. Especificamente na doença de Alzheimer, são encontrados agregados contendo a proteína Tau hiperfosforilada e o peptídeo β -amiloide (Selkoe, 1989; Hardy e Selkoe, 2002), já na doença de Parkinson, por exemplo, o agregado proteico contém a α -sinucleína (Gibb e

Lees, 1988), dentre outras. A agregação de proteínas pode ser causada por uma alteração estrutural e/ou bioquímica dessas proteínas, mas também por falha dos processos de degradação.

A Tau é uma fosfoproteína, composta por 352-441 resíduos de aminoácidos, cujas funções principais são de estabilização dos microtúbulos axonais e modulação do transporte axonal através de sua distribuição no mesmo bem como interação com as proteínas motoras (Dixit *et al.*, 2008).

Existem seis isoformas de proteína Tau já descritas em células humanas, todas produto do gene MAPT, diferenciadas durante o processamento do RNA me por fosforilação em diferentes resíduos (Goedert *et al.*, 1989).

Em condições normais, a Tau contém 2-3 mols de fosfato por mol de proteína. O aumento dos níveis de fosfato na molécula Tau promove diminuição da afinidade pela tubulina, leva a desestabilização dos microtúbulos e acúmulos proteicos no corpo celular, prejudicando, dentre outras funções, o transporte intracelular de organelas e vesículas em geral, além de ser considerado altamente tóxico para o ambiente intracelular (Kopke *et al.*, 1993). A presença dos emaranhados neurofibrilares, que são agregados filamentosos de Tau hiperfosforilada e hiperacetilada, tem sido associada como um fator chave na perturbação da homeostase celular (Geschwind, 2003)

Historicamente, acreditava-se que os emaranhados neurofibrilares seriam os principais fatores neurotóxicos, entretanto recentemente tem-se demonstrado que as formas oligoméricas solúveis e as formas monoméricas

também são prejudiciais para as células (Lasagna-Reeves *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012).

As formas tóxicas (hiperfosforiladas) da Tau deveriam ser degradadas, mas na doença de Alzheimer esta forma da proteína Tau parece ser altamente resistente aos processos de proteólise fazendo com que a degradação seja ineficiente e, por consequência, esta forma da Tau se liga a outras proteínas citosólicas formando os emaranhados neurofibrilares.

A fosforilação da Tau é principalmente controlada positivamente por quinases, como aglicogênio sintasequinase-3 β (GSK-3 β) a quinase dependente de ciclina 5 (cdk5) e a proteína quinase ativada por mitógeno 1 (MAPK1 / ERK2)(Buee *et al.*, 2000; Gong, Grundke-Iqbal e Iqbal, 2010). Já as proteínas fosfatases 2A e 5 (PP2A e PP5) são as principais reguladoras de diminuição da hiperfosforilação da Tau (Gong, Grundke-Iqbal e Iqbal, 1994; Goedert *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2005), de fato estudos demonstraram que há diminuição dessas fosfatases em pacientes com doença de Alzheimer (Gong *et al.*, 1993; Loring *et al.*, 2001; Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005).

Pacientes acometidos pela doença de Alzheimer apresentam aumento de 4 a 8 vezes nos níveis encefálicos de Tau hiperfosforilada (Khatoon, Grundke-Iqbal e Iqbal, 1994), o que tem sido atribuído à disfunção na sua restauração (desfosforilação) e degradação (Poppek *et al.*, 2006) bem como à ativação exarcebada das proteínas quinases citadas anteriormente, e não a alterações na expressão do RNAm (Mah *et al.*, 1992).

Fatores ambientais também podem contribuir para a neurodegeneração. A hiperinsulinemia parece aumentar o risco para doença de Alzheimer (Ott *et al.*, 1996). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a insulina aumenta a fosforilação de Tau em células SH-SY5Y (linhagem celular de neuroblastoma humano) e em cultura primária de neurônios corticais de rato (Lesort, Jope e Johnson, 1999; Lesort e Johnson, 2000). Meske e colaboradores (2008) observaram que o tratamento de neurônios corticais em cultura com insulina poderia levar a uma interação regulatória das vias da GSK-3 β e PP2A aumentando os níveis de fosforilação da Tau.

A ativação da GSK-3 β também pode ser resultado de sua interação com o peptídeo beta-amiloide (Terwel *et al.*, 2008), mostrando uma regulação positiva entre os principais componentes dos agregados proteicos característicos da doença de Alzheimer.

O peptídeo beta-amiloide é formado por 40-42 aminoácidos originados pela clivagem da proteína integral de membrana precursora amiloide (APP) realizada pelas enzimas beta e gama-secretase. A produção do peptídeo β -amiloide é considerada um dos fatores determinantes na patofisiologia da doença de Alzheimer (Haass *et al.*, 2008), no entanto, sua citotoxicidade está associada à sua função sobre a proteína Tau (Rapoport *et al.*, 2002).

Exposição de neurônios em cultura a oligômeros de A β 1-42 levam a uma marcação positiva à proteína Tau nos dendritos, aumento local de cálcio livre, desestruturação dos espinhos dendríticos e dos microtúbulos (Zempel *et al.*, 2010). Em complemento a isso, a associação de A β 1-42 e Tau

levam a prejuízos sinápticos e cognitivos (Roberson *et al.*, 2011; Shipton *et al.*, 2011). Além disso, estudos têm mostrado que na doença de Alzheimer oligômeros de A β e Tau estão presentes na mitocôndria prejudicando a geração de energia e aumentando os níveis de radicais livres (Rhein *et al.*, 2009; Gotz *et al.*, 2010).

Os oligômeros parecem ser resistentes à degradação pelos compartimentos celulares, o que contribui para sua citotoxicidade (Soto, 2003). Encéfalos de pacientes com doença de Alzheimer apresentam diminuição na capacidade de degradação da proteína Tau pelas subunidades do proteossomo quando comparados com indivíduos normais da mesma idade (Yen, 2011). Esse quadro se mantém nas diversas doenças neurodegenerativas, as quais também apresentam disfunção no sistema ubiquitina-proteossomo resultando no acúmulo da Tau hiperfosforilada (Bence, Sampat e Kopito, 2001). Além disso, o peptídeo A β acumula-se próximo ao lisossomo, provocando estresse lisossomal (De Kimpe *et al.*, 2013), perda sináptica e déficit cognitivo (Bahr *et al.*, 1998). Fatores como estes contribuem fortemente para os mecanismos das doenças neurodegenerativas, levando a desestabilização dos microtúbulos, agregados de proteínas, falência no tráfego celular e perda da integridade sináptica.

1.3. As vias de degradação celular

As vias centrais de degradação celular envolvem o proteossomo e o lisossomo os quais são responsáveis pela reciclagem dos componentes

celulares e manutenção da boa qualidade das proteínas celulares. Esses mecanismos funcionam em sinergia, podendo um ser modulado pelo outro. As contribuições de cada uma das vias sobre a modulação, por exemplo, dos níveis da proteína Tau e quais caminhos suas isoformas adotam tem sido alvo de diversos estudos.

O estudo de vias alternativas bem como a interação modulatória entre os sistemas de degradação parece ser uma estratégia interessante para a modulação das vias de degradação durante o entendimento dos processos neurodegenerativos.

1.3.1. O sistema de degradação proteassomal

Os constituintes celulares a serem degradados, especialmente os conteúdos oriundos do direcionamento executado pelas chaperonas e co-chaperonas durante o processo de síntese proteica (“*fold*ing” e “*refold*ing”) para manter a qualidade das proteínas, são feitos pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Durante as desordens neurodegenerativas, a elevada presença de emaranhados proteicos contendo cadeias poliubiquitinadas prejudica a degradação (Mayer *et al.*, 1989) pela saturação e rompimento do sistema de degradação via ubiquitina-proteassoma (Bence, Sampat e Kopito, 2001).

De fato, o acúmulo de proteínas ubiquitinadas, placas de peptídeo A β , agregados de Tau e distrofia dos neuritos, como é observado no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, pode ser resultante do prejuízo no sistema ubiquitina-proteassoma (De Vrij *et al.*, 2004).

O sistema de proteólise da Tau utiliza um complexo proteico que consiste numa ligase E3 de ubiquitina chamada CHIP (do inglês “*Carboxyl-terminus of Hsp70 Interacting Protein*”) em conjunto com a chaperona Hsp70. Petrucelli e colaboradores (2007) sugeriram que a formação desse complexo direciona a Tau para sua eliminação por meio da maquinaria de degradação celular dependente de ubiquitina.

O complexo conformacional do proteassoma é denominado 26S, formado pela subunidade 19S, que é a unidade regulatória do proteassoma, com a subunidade 20S, que é o sítio catalítico. O 19S se acopla com a subunidade 20S em ambos os lados do centro catalítico. A subunidade 19S é responsável pelo reconhecimento dos substratos poliubiquitinados bem como pela desubiquitinação, desdobramento e abertura da tampa do proteassomo, permitindo a entrada do conteúdo a ser degradado na porção catalítica. A subunidade 26S está envolvida na degradação de proteínas que participam em diversas funções celulares essenciais, como no controle do ciclo e diferenciação celular, resposta inflamatória e apoptose.

O sistema de ubiquitinação e degradação de proteínas pelo complexo proteossomal 26S é essencial para a manutenção da homeostase celular (Glickman e Ciechanover, 2002). Mas, controversamente, a remoção de proteínas danificadas, principalmente de proteínas oxidadas, se dá por um processo independente de ubiquitinas (Jung *et al.*, 2009). Cerca de 20% a 30% dos proteassomos nas células de mamíferos não apresentam a subunidade regulatória e estão comprometidos com a degradação de proteínas agregadas (Tanahashi *et al.*, 2000; Babbitt *et al.*, 2005).

Durante a doença de Alzheimer, bem como no envelhecimento, há uma inibição da atividade proteossomal encefálica (Merker e Grune, 2000). Corroborando com isto, Schubert e colaboradores (2009) mostraram prejuízo na atividade quimiotripsina do proteassoma em um primeiro momento, seguido de um aumento, em cultura primária de ratos tratada com peptídeo beta-amiloide.

O acúmulo de proteína Tau ubiquitinada nas células neuronais de pacientes com doença de Alzheimer pode ser atribuído a uma falha no sistema ubiquitina-proteassoma, como mencionado. Entretanto, uma via alternativa para degradação dessas formas tóxicas de Tau é a via independente de ubiquitina, através da subunidade 20S do proteassomo (Delobel *et al.*, 2005; Elliott, Tsvetkov e Ginzburg, 2007). O estudo destas vias de degradação ou o desvio de uma via de degradação considerada preferencial, como é o caso da via ubiquitina-proteassoma, para uma via não preferencial, como a via da co-chaperona Bag-2, pode ser uma estratégia interessante do ponto de vista científico e farmacológico, uma vez que o déficit da via preferencial já está bem descrito.

1.3.2. A co-chaperona Bag-2

A proteína Bag-2 (*Bcl2-associated athanogene 2*) inibe a ligase de ubiquitina CHIP, o que resulta em bloqueio da degradação via proteossomo 26S (Arndt *et al.*, 2005). Esta proteína faz parte da família Bag, que interage com o domínio das chaperonas Hsp70/Hsc70 promovendo a troca de substratos do domínio ATPase através da região C-terminal, modulando a

atividade das chaperonas, que, por sua vez, em grande parte, executam a degradação pelo proteassomo.

Foi mostrado que Bag-2 favorece a degradação da proteína Tau através do proteassomo pela via independente de ubiquitina em células COS7 expressando agregados neurofibrilares (Carrettiero *et al.*, 2009). Por outro lado, a co-chaperona Bag-1 tem efeito oposto ao da Bag-2. Elliott e colaboradores (2007) mostraram que a superexpressão de Bag-1 promoveu um acúmulo de Tau. Assim, ressalta-se a importância da família proteica Bag na relação dos níveis de Tau e, conseqüentemente, para a patologia e tratamento da doença de Alzheimer.

Segundo Carrettiero e colaboradores (2009), a co-chaperona Bag-2, ao inibir a ubiquitinação de Tau, parece desviar sua degradação para uma via de degradação alternativa independente de ubiquitina através da subunidade 20S do proteassomo. Entende-se que este mecanismo possa ser compensatório ou modulatório, uma vez que a degradação dependente de ubiquitina não consegue dissolver os agregados e que as cadeias poliubiquitinadas presentes nos agregados proteicos acabam favorecendo o processo de morte celular.

1.3.3. O sistema de degradação lisossomal

Dano lisossomal na presença dos agregados proteicos bem como distúrbios na autofagia promovem um importante efeito durante o progresso da neurodegeneração, resultando em acionamento dos mecanismos de apoptose e perda de massa neuronal (Ditaranto, Tekirian e Yang, 2001; Lai *et al.*, 2008; Nixon, Yang e Lee, 2008).

Ao encontro disso, o estímulo do transporte anterógrado do lisossomo no axônio parece atrasar a degeneração do neurônio motor (Lim e Kraut, 2009).

Apesar das vias de degradação estarem sobrecarregadas os mecanismos proteolíticos estão ativados. Os oligômeros de A β 1-42 são internalizados por neurônios e astrócitos, mas se acumulam no compartimento lisossomal (Sasaki *et al.*, 2001; Laferla, Green e Oddo, 2007; De Kimpe *et al.*, 2013).

A indução na melhora do complexo autofago-lisossomo, melhora a degradação de agregados protegendo a célula dos efeitos tóxicos dessas proteínas malformadas (Ravikumar, Sarkar e Rubinsztein, 2008). Todavia, dependendo do estágio da doença, as vias lisossomal e endossomal podem se encontrar superreguladas (Cataldo *et al.*, 1996), mostrando um mecanismo compensatório.

O estresse lisossomal induz o deslocamento de fatores de transcrição específicos, que são enviados do citoplasma para o núcleo, como uma resposta celular para o aumento na degradação via lisossomo (Sardiello *et al.*, 2009). Defeitos no processamento pós-traducional das enzimas lisossomais bem como erro no tráfego lisossomal também são importantes fatores a serem considerados no decurso da neurodegeneração (Sardiello e Ballabio, 2009).

Zheng e colaboradores (2010) mostraram que alterações lisossomais podem ser consideradas marcadores de estágios iniciais de degeneração axonal e, conseqüentemente, a manutenção da função lisossomal em níveis

normais poderia ser importante para retardar a progressão de doenças neurodegenerativas.

Os lisossomos são organelas dinâmicas envolvidas tanto na reciclagem quanto na remoção de componente e proteínas do meio intracelular e extracelular, oriundos das vias endocítica, secretória e autofágica (Luzio, Bright e Pryor, 2007). O papel que os lisossomos desempenham sobre a degradação de proteínas é determinante para a função celular (Dermaut *et al.*, 2005), especialmente quando se trata de proteínas agregadas.

É estimado que haja cerca de 50-60 hidrolases ácidas no lisossomo (Journet *et al.*, 2002), e que uma melhor eficiência nos fatores pró enzimáticos, assim como na acidificação, poderia ser uma alternativa para uma melhor performance desta via proteolítica. De acordo com isso, Butler e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento farmacológico com o modulador lisossomal Z-Phe-Ala-diazomethylketone (PADK) aumenta em cerca de 4-8 vezes os níveis de catepsina B, promovendo diminuição dos agregados A β 1-42 em camundongos transgênicos superexpressando a proteína precursora amiloide (APP) e proteção sináptica, verificadas pela expressão da sinaptofisina e sinapsina II.

1.3.4. A interrelação entre os sistemas proteassomal e lisossomal.

As vias de degradação endossomal e autofagossomal, cujos destinos é o lisossomo, estão coordenadas com o sistema ubiquitina-proteassoma. Juntos eles representam o mecanismo central de degradação, reciclagem e

plasticidade neural altamente complexo e regulatório. Esta relação interdependente entre os sistemas proteassomal e lisossomal envolve a associação com a ubiquitina a qual sinaliza e direciona os substratos ao proteassoma ou lisossomo (Clague e Urbe, 2010). Os agregados de proteínas e organelas são ubiquitinados para a degradação seletiva por autofagia (Dikic, Johansen e Kirkin, 2010; Youle e Narendra, 2011).

Essa interrelação também fica evidenciada quando a atividade do proteassoma está inibida, onde há aumento do sistema autofago-lisossomal (Agholme *et al.*, 2012) e o acúmulo de proteínas passa a ser autofagocitado (Fortun *et al.*, 2003). Já a inibição da autofagia na célula neuronal, leva a ubiquitinação dos agregados e promove um efeito negativo no sistema ubiquitina-proteassoma (Korolchuk *et al.*, 2009).

Especificamente com relação à proteína Tau, monômeros de Tau mal enovelados são direcionados preferencialmente para o sistema de proteólise proteassomal, já a forma oligomérica é preferencialmente entregue ao sistema autofago-lisossomal (revisto por Chesser, Pritchard e Johnson, 2013) (FIGURA 1).

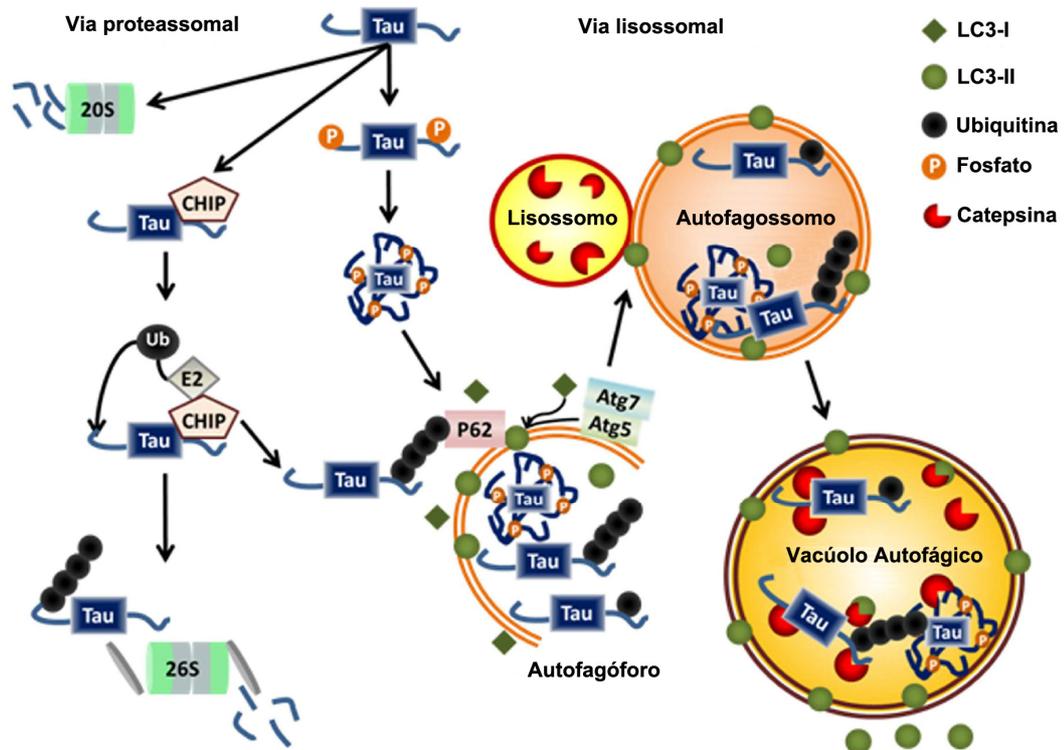


Figura 1. Ilustração simplificada dos mecanismos proteassomal e lisossomal de degradação ressaltando o direcionamento da proteína Tau para a proteólise em diferentes estágios de hiperfosforilação, bem como as principais proteínas envolvidas nesse processo. Modificado de Chesser et al., 2013.

1.4. Proteínas Rab7 e Rab24 e sua relação com a neurodegeneração

Para complementar outros aspectos que envolvem os compartimentos de degradação, propõe-se o estudo de 2 proteínas envolvidas juntamente na degradação e no tráfego intracelular, proteínas Rab7 e Rab24, sendo bastante interessante seu estudo, uma vez que o prejuízo no tráfego também já foi relatado no mesmo modelo de neurodegeneração empregado neste estudo (Melo *et al.*, 2013).

O tráfego intracelular conta com o aparato completo de diversas estruturas e moléculas. As proteínas Rabs fazem parte da grande família das GTPases, cuja função é de direcionamento, formação, endocitose e fusão de vesículas e organelas (Stenmark, 2009), como exemplificado na figura 2.

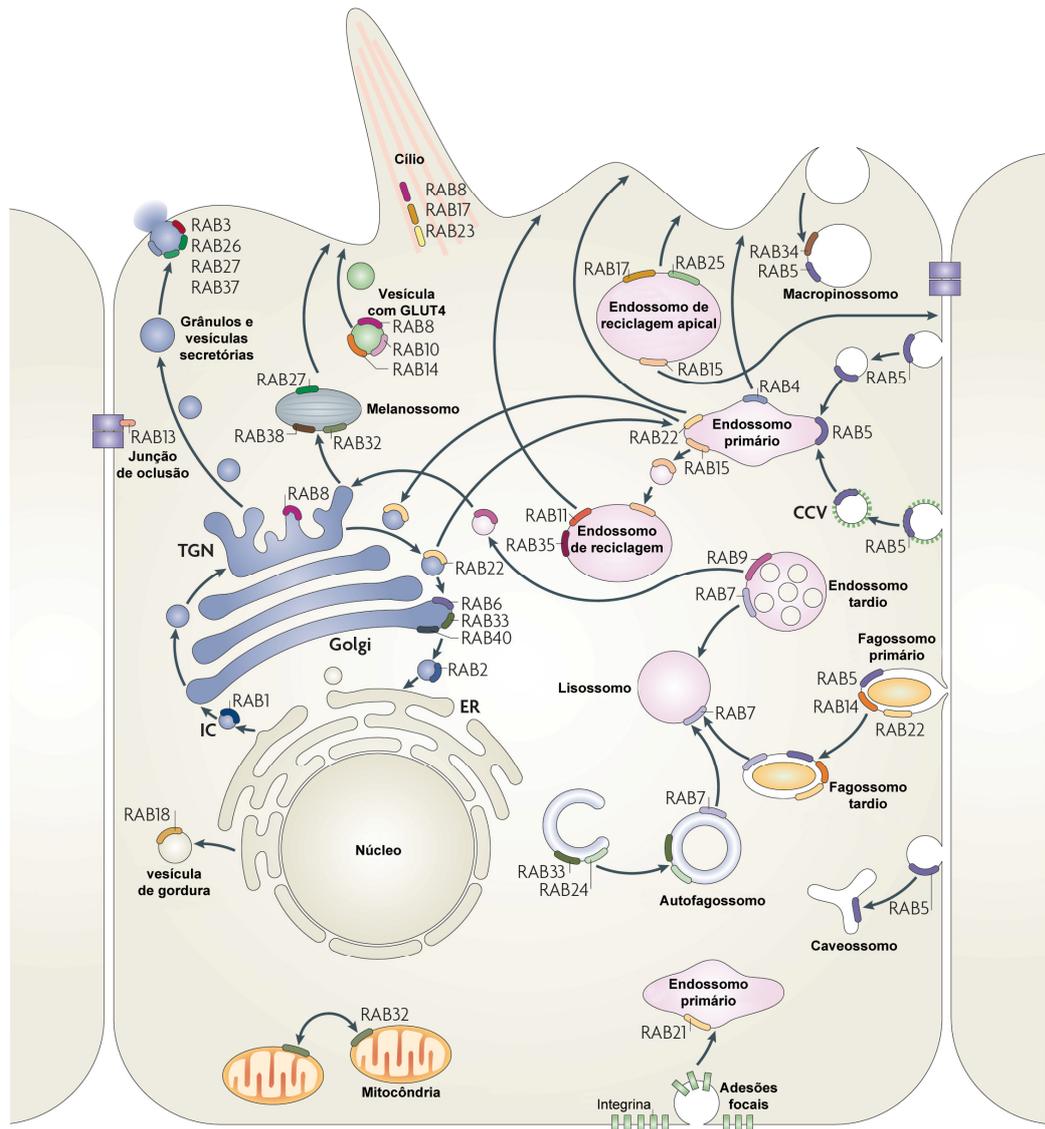


Figura 2. Representação esquemática da participação das proteínas Rab nas diversas etapas do tráfego intracelular. Modificado de Stenmark (2009).

A organização e garantia de transporte e entrega dos componentes do tráfego intracelular é dada pela pelas proteínas Rab em associação com as proteínas motoras, sobre o citoesqueleto de microtúbulos e actina (Hirokawa, 1998; Tuxworth e Titus, 2000; Vale, 2003).

Disfunção nessas proteínas pode causar grande prejuízo celular, como acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático e falhas nas vias de degradação (Scheper *et al.*, 2007). Além disso, elas têm sido associadas às doenças neurodegenerativas por executarem papel essencial em todo esse contexto relacionado com o tráfego dos componentes intracelulares contendo agregados de proteínas. Cataldo e colaboradores (2000) mostraram que o tráfego intracelular está alterado antes mesmo da formação dos agregados, o que pode ser determinante no processo de neurodegeneração (Mandelkow *et al.*, 2003; Bronfman *et al.*, 2007; Martin, 2007). A regulação do tráfego e formação de vesículas endocíticas também parece ser importante para a formação das placas senis (Haass *et al.*, 1992).

A proteína Rab24 regula a formação dos autofagossomos (Stenmark, 2009), porém, esta não parece ser sua única função dentro da célula. Olkkonen e colaboradores (1993), demonstraram que a Rab24 está envolvida no transporte retrógrado de proteínas entre a região Cis- do complexo de golgi em direção ao retículo endoplasmático, o que sugere seu envolvimento no processo de degradação.

Células tratadas com inibidor de proteassomo apresentam aumento do RNAm da Rab24 (Egami *et al.*, 2005), parecendo ter um efeito compensatório por ativar a via da autofagocitose quando há inibição da via

proteassomal. Seki e colaboradores (2009) mostraram uma maior atividade da Rab24 durante o processo de regeneração axonal de neurônios motores. Apesar de haver alguns estudos já descritos envolvendo a Rab24 em tecido encefálico, seu papel ainda é desconhecido na neurodegeneração, em particular envolvendo a degradação da proteína Tau.

A Rab7 tem como principal função direcionar as vesículas e organelas vindas do endossomo tardio e autofagossomo para o lisossomo (Feng *et al.*, 2001) favorecendo a autofagia (Jordens *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 2004).

Deficiências na função bem como mutações no gene da Rab7 foram descritas em doenças neurodegenerativas como a doença de Charcot-Marie-Tooth e doença de Alzheimer implicando em prejuízo da degradação celular (Verhoeven *et al.*, 2003; Cataldo *et al.*, 2008).

Em adição, a Rab7 parece ter papel chave no crescimento neuronal, uma vez que esta participa no tráfego retrógrado dos receptores de NGF (fator de crescimento neuronal) do tipo TrkA. Uma disfunção no tráfego da Rab7 poderia resultar numa inibição do crescimento celular ou promover apoptose (Deinhardt *et al.*, 2006).

O papel das Rab7 e Rab24 nas doenças neurodegenerativas ainda vem sendo discutido. Desta forma, estudar suas participações na formação/degradação dos agregados proteicos pode contribuir para o entendimento dos mecanismos alterados, especialmente por uma possível participação das Rabs na fase inicial das doenças neurodegenerativas.

1.5. Modelos experimentais de neurodegeneração

1.5.1. Indução de agregados proteicos pela rotenona

A rotenona é um pesticida natural e um inibidor específico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. As alterações intracelulares promovidas após sua exposição são consideradas relativamente equivalentes às alterações que são verificadas durante o envelhecimento, tais como: presença de agregados de proteínas e aumento no estresse oxidativo. O efeito da rotenona mais bem caracterizado está sobre o complexo I mitocondrial, no entanto, alguns estudos já demonstraram efeitos como inibição do proteassomo e disfunção da enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (GAPDH), (Sherer *et al.*, 2003; Dukes, Korwek e Hastings, 2005; Huang *et al.*, 2009; Chou *et al.*, 2010).

O modelo de tratamento com rotenona para a indução de agregados proteicos é bastante utilizado em trabalhos *in vivo* (Sherer, Kim *et al.*, 2003; Hoglinger, Lannuzel *et al.*, 2005; Feng, Liang *et al.*, 2006)

Os efeitos *in vitro* da rotenona sobre culturas primárias de neurônios foram demonstrados por nosso grupo que em baixas concentrações de rotenona foram capaz de induzir agregados proteicos, contendo Tau hiperfosforilada (Figura 3A e 3B) e β -amiloide (Figura 3C e 3D) em células do hipocampo (Chaves *et al.*, 2010).

Além disso, as concentrações padronizadas como sendo capazes de induzir agregados (0,5 e 1nM) não promoveram morte celular considerável, demonstrando que o modelo experimental proposto está adequado para a análise anterior à morte celular (FIGURA 4).

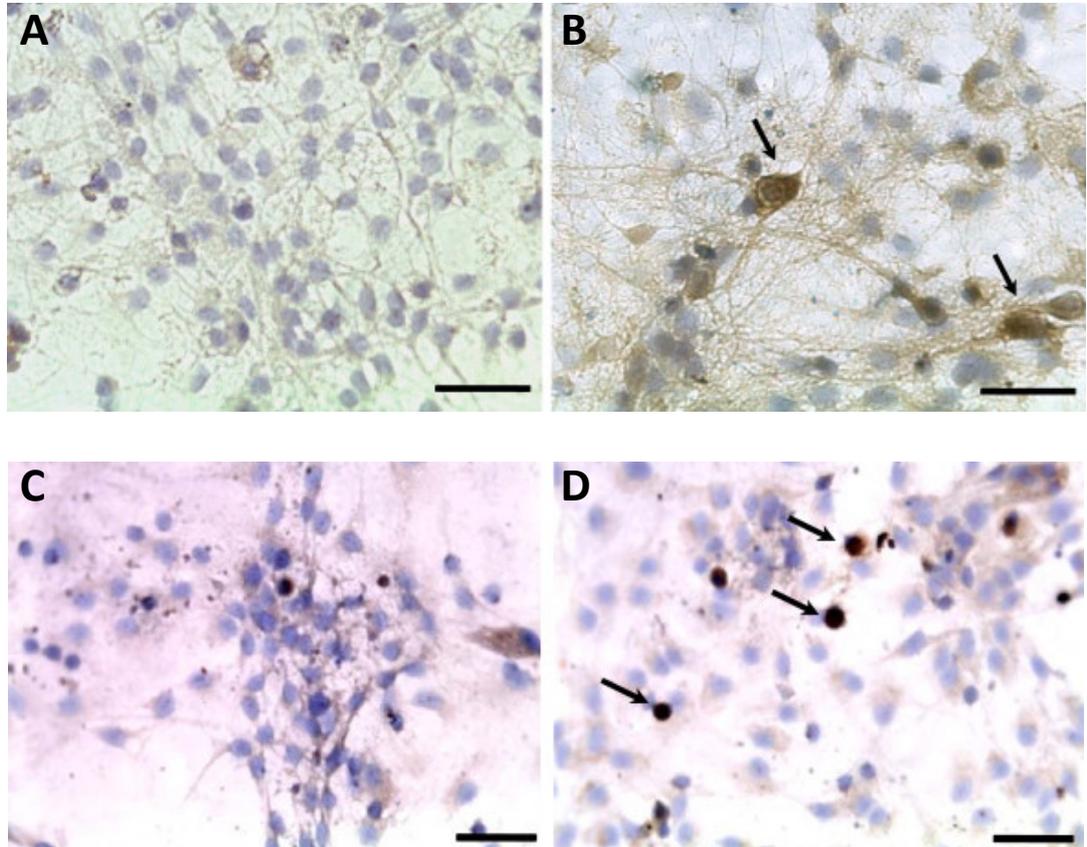


Figura 3. Imagens digitais ilustrativas de cultura de células do hipocampo após exposição a 0,5nM (A e C) e 1nM (B e D) de rotenona durante 48h submetidas a técnica de imunocitoquímica, apresentando marcação positiva para Tau hiperfosforilada (B) e β -amiloide (D). Barra de escala = 50 μ m. As imagens foram retiradas de Chaves e colaboradores (2010).

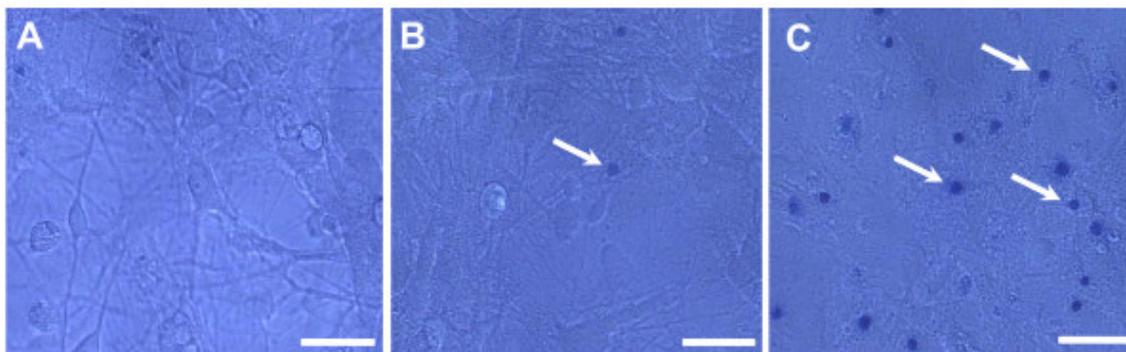


Figura 4. Imagens digitais ilustrativas de cultura de células do hipocampo após exposição a 0,5nM (A), 1nM (B) e 10nM (C) de rotenona durante 48h ao ensaio de morte celular utilizando azul de Tripán, reagente que atravessa a membrana plasmática de células mortas. Barra de escala = 50 μ m. As imagens foram retiradas de Chaves e colaboradores (2010).

1.5.2. Modelo de inclusão proteica após exposição a beta-amiloide

Tratando-se do modelo de inclusões proteicas, já está bem estabelecido na literatura o uso do peptídeo β -amiloide (fragmento A β 1-42) como modelo para se estudar e simular algumas das alterações ocorridas nas desordens da neurodegeneração, dentre as quais aumenta os níveis da proteína Tau hiperfosforilada, promovendo aumento dos níveis proteicos e de sua hiperfosforilação (Glabe, 2008; Roychaudhuri *et al.*, 2009).

A injeção intracerebroventricular de oligômeros solúveis de A β oriundos cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer ou de peptídeo sintético aceleram a fosforilação de Tau (Ma *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011). Da mesma forma, em cultura de células. Tokutake e colaboradores (2012) demonstraram que mesmo concentrações fisiológicas de A β seriam suficientes para induzir a hiperfosforilação de Tau.

1.5.3. Estudo da interrelação entre as vias de degradação

Considerando que a integridade e função do proteassomo são importantes para a homeostase celular, conforme descrito anteriormente, sua inibição é utilizada como modelo experimental para neurodegeneração.

A lactacistina é um inibidor proteassomal que age tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, a inibição promovida na atividade das subunidades tripsina e quimiotripsina é rápida e irreversível (Fenteany *et al.*, 1995), provando ser uma ferramenta interessante para o estudo dos processos neurodegenerativos.

O composto E64 é um inibidor de proteases lisossomais e interrompe a atividade de todas as classes de catepsinas, sendo um potente inibidor irreversível e altamente seletivo. A presença dos inibidores proteassomal e lisossomal também pode auxiliar no entendimento das respostas de interrelação dos sistemas de degradação, uma vez que a ausência da função de uma via pode desencadear uma resposta tanto compensatória quanto modulatória sobre o outro sistema de degradação, neste caso, respondendo o “*cross-talk*” entre proteassoma e lisossomo. Parte deste estudo utilizou ambos os componentes no modelo de inclusão proteica para descrever algumas respostas.

Também foi utilizado o composto PADK (Z-phenylalanyl-L-alanyl-diazomethyl ketone) para a ativação lisossomal e identificação de mecanismos neuroprotetores e/ou de desvio da rota de degradação o dos agregados proteicos (Bahr, Wisniewski e Butler, 2012).

2.Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Analisar o efeito da co-chaperona Bag-2 sobre o perfil de degradação de Tau hiperfosforilada, bem como a interação entre os sistemas lisossomal e proteassomal na degradação intracelular de agregados proteicos.

2.2. Objetivos específicos

1) Analisar os efeitos da superexpressão da proteína Bag-2 em prevenir a hiperfosforilação da Tau e/ou estimular a degradação dos agregados proteicos em cultura de células do hipocampo tratadas com rotenona;

2) Analisar a expressão do RNAm e os níveis das proteínas Rab7 e Rab24 a fim de inferir sobre o tráfego do autofagossomo e endossomo tardio antes, durante e após a formação dos agregados proteicos contendo Tau hiperfosforilada em cultura de células do hipocampo tratadas com rotenona na presença e ausência de BAG-2 exógena.

3) Analisar o efeito do tratamento com o peptídeo A β sobre os níveis da proteína LC3 I e II, catepsina B e Rab-7 bem como da subunidade 20S do proteassomo, além dos marcadores de integridade sináptica: GluR1 e sinapsina II em cultura organotípica do hipocampo.

4) Analisar o efeito dos moduladores da atividade lisossomal e proteassomal sobre a agregação proteica, bem como a interação entre as duas vias de degradação, em culturas organotípicas do hipocampo submetidas ao tratamento com o peptídeo A β .

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) neonatos da linhagem Lewis, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas e criados no biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Esta linhagem de ratos foi escolhida por apresentar suscetibilidade à agregação de proteínas constitutivas após o tratamento com rotenona.

Os experimentos propostos estão em conformidade com todos os aspectos éticos de experimentação animal Instituto de Biociências – USP (CEA/IB-USP protocolo 136/2011), pela coordenadoria de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (protocolo 168/10) e de acordo com o protocolo institucional aprovado e obtido pelo comitê de uso e cuidado com animal da Universidade da Carolina do Norte em Pembroke - EUA.

3.2. Cultura primária de células do hipocampo

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e colaboradores (2001).

Para cada experimento foram utilizados cerca de 20 ratos neonatos com no máximo 1 dias de vida pós-natal. Após decapitados, os encéfalos foram colocados em placa de petri estéril com solução fisiológica gelada preparada no dia. Essa solução é constituída de 0,7% de NaCl, 0,04% de KCl, 0,016% de KH₂PO₄, 0,062% de MgSO₄·7H₂O, 0,21% de NaHCO₃, 0,23% de glicose e água Milli-Q, pH ajustado para 7,2. A solução

foi esterilizada com filtro (0,22 μ m) e seringa estéreis no fluxo laminar. Com o auxílio de instrumentos cirúrgicos, os hemisférios cerebrais foram separados e foi feita a remoção bilateral do hipocampo, como ilustra figura 5.

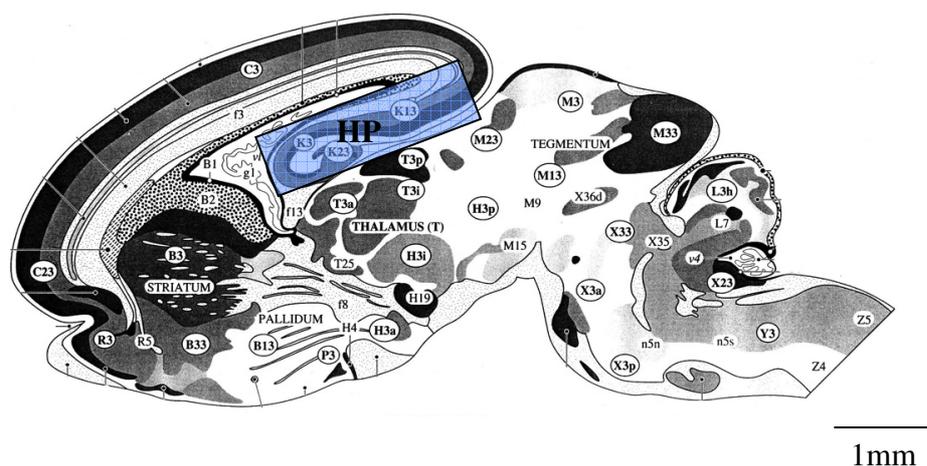


Figura 5. Imagem ilustrativa do encéfalo de rato neonato destacando a região do hipocampo, dissecada para a cultura de células primária. Modificado do atlas de Altman e Bayer (1995).

As células foram dissociadas mecanicamente com uma tesoura, e quimicamente com tripsina 0,05% (Gibco), colocadas num tubo falcon contendo solução fisiológica e incubadas a 37°C por 40 minutos em banho-maria com agitação. Após o período de incubação, já no fluxo laminar foi adicionada à solução contendo o tecido 0,006% de inibidor de tripsina (Gibco), seguido de uma dissociação com auxílio de uma pipeta Pasteur até que as células ficassem em suspensão.

A solução contendo as células completamente dissociadas foi centrifugada a 300g por 5 minutos para separação do precipitado celular. As

células foram então ressuspensas em meio de cultura Neurobasal A (Gibco) suplementado com 0,012% de Glutamax (Gibco), 0,2% de B27 (Gibco), 0,036% de L-Glutamina (Sigma) e 0,04% de Gentamicina (Gibco) e plaqueadas na concentração de 1800 células por milímetro quadrado.

A quantidade de células necessária para a placa de cultura escolhida foi calculada com base na área da placa. As placas de culturas eram tratadas no dia anterior a cultura com 0,01% de poli-D-lisina 10µg/ml (Sigma). Após plaqueadas, as células foram cultivadas em estufa contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C durante nove dias, tendo meio de cultura trocado após 3 horas após o plaqueamento e a cada 3 dias durante o período de cultivo.

3.3.Cultura organotípica do hipocampo

Foram utilizados ratos Sprague–Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) com 12 dias de idade. O encéfalo foi rapidamente removido, dissecado e o hipocampo foi colocado em solução fisiológica contendo: 124mM de NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 4mM MgSO₄, 4nM MgSO₄, 2mM CaCl₂ 2H₂O, 26mM NaHCO₃, 10mM glicose, 2mM ácido ascórbico, 75µM adenosina.

Após isso, os hipocampos foram posicionados no micrótomo para serem retiradas secções transversas (400 µm). As secções foram colocadas em placa de petri contendo a mesma solução fisiológica até o momento de serem plaqueadas. O plaqueamento das secções foi feito com auxílio de pinças esterilizadas. As secções foram colocadas em placa de cultura (Milli-

cell Organotypic Insert, Millipore), mantidas em meio contendo 50% meio neurobasal (Sigma, St. Louis, MO), 25% de soro de cavalo (Gemini Bio-products, Sacramento, CA), e suplementos definidos como previamente descrito (Bendiske *et al.*, 2002). As secções foram mantidas a 37°C em incubadora enriquecida com 5% de CO₂ durante o período de 14–25 dias até serem empregadas nos tratamentos propostos. A figura 6 ilustra os 2 protocolos experimentais do presente trabalho.

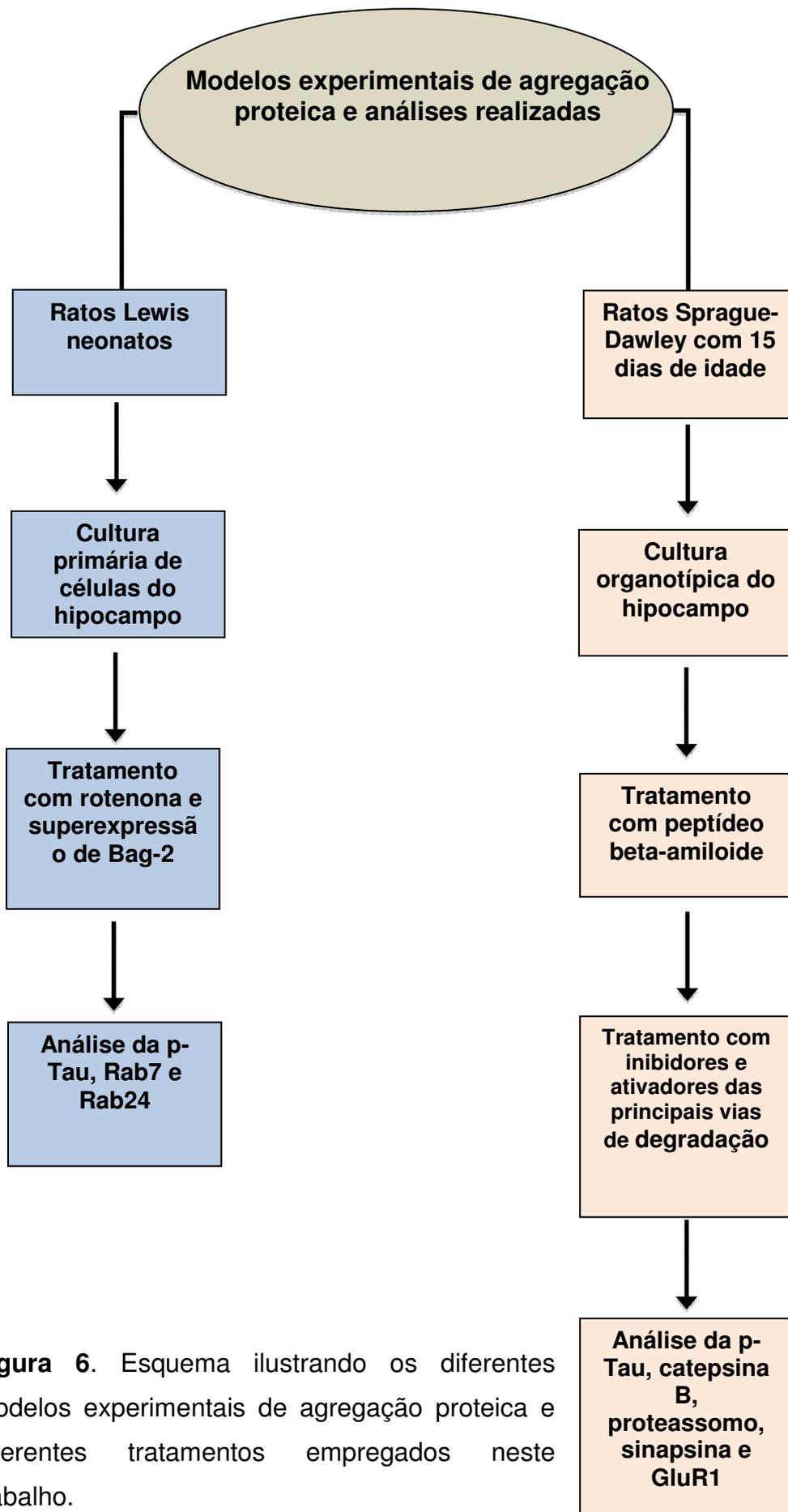


Figura 6. Esquema ilustrando os diferentes modelos experimentais de agregação proteica e diferentes tratamentos empregados neste trabalho.

3.4. Preparo dos clones e transfecção

O cDNA da chaperona Bag-2 (open biosystems) foi clonado em vetor fluorescente pEGFP-C1(Clontech) (FIGURA 7). Foram desenhados primers com sequências específicas para o cDNA da Bag-2 contendo os sítios de restrição Bam-H1 e Bgl-2. Foi adicionada a sequência FLAG à Bag-2 a fim de identificar a expressão da proteína Bag-2.

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

As sequências de cDNA foram clonadas e digeridas com duas enzimas de restrição, Bam-H1 e Bgl2 (New England biolabs), purificadas utilizando o kit de purificação (QIAGEN) e ligadas aos vetores pela ação da ligase T4 (New England Biolabs).

Os vetores foram adicionados a uma solução contendo bactérias competentes (Oneshot MAX efficiency DH5 α TM, Invitrogen cat. 12297-016), transformadas por eletroporação e incubadas em meio LB durante 1 hora. A solução foi plaqueada em placa de Petri com agar contendo 30 μ g/ml de antibiótico Kanamicina (Invitrogen). Após 24 horas de incubação, 10 colônias foram escolhidas e separadas em um tubo estéril contendo 2ml de meio SOC e antibiótico e novamente incubadas por 24 horas à 37°C. Após isso,

as bactérias foram lisadas, o DNA dos vetores foi purificado (QIAGEN plasmid maxiprep kit).

A verificação do sucesso da clonagem foi realizada via PCR e digestão enzimática, com as enzimas acima descritas; as colônias selecionadas foram transferidas para 1L de meio de crescimento 2XYT contendo 10% Triptona, 5% de extrato de levedura em pó e 10% NaCl, incubadas por 24 horas sob agitação. Finalmente o DNA foi purificado, diluído em 1ml de água e quantificado, pronto para ser transfectado nas culturas de células neuronais do hipocampo.

A transfecção foi feita com os vetores contendo a sequência para a proteína Bag-2 e o vetor p-EGFP-C1 vazio, ou seja, sem conter nenhuma sequência específica, sendo aplicado para os grupos controle. A transfecção foi feita através do reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen), formando lipossomas que atravessam a membrana plasmática celular e liberam a sequência de interesse no meio intracelular. A Bag-2 foi inserida nas culturas de células primárias do hipocampo, antes, durante e após o tratamento com diferentes concentrações de rotenona durante 24h, 48h, 72h ou 96h.

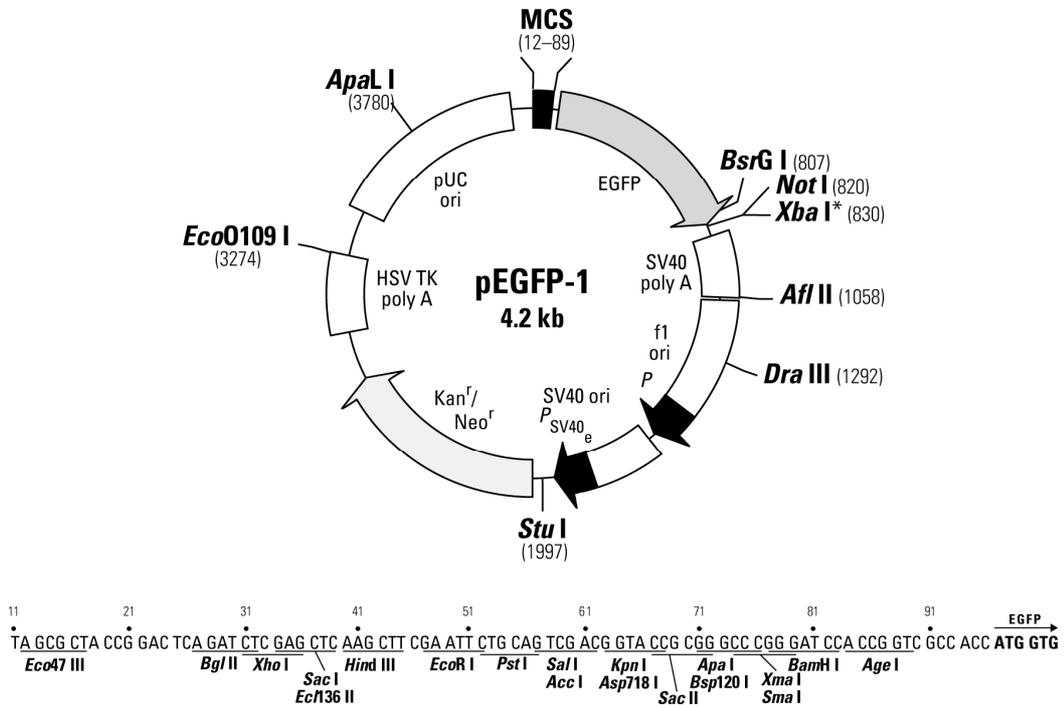


Figura 7: Esquema do vetor pEGFP-1 utilizado para clonar a sequência da Bag2. Informações sobre o vetor no Gen Bank Accession (U55763), número de catálogo (6084-1), obtido da BD Biosciences. As enzimas de restrição utilizadas foram: Bam-H1 e Bgl2.

3.5. Tratamentos

Os tratamentos, período de exposição às drogas e suas concentrações foram estabelecidos com base em dados previamente publicados, experimentos de curva concentração-resposta e curva temporal para determinação dos parâmetros, condições e concentrações ideais.

3.5.1. Tratamento com rotenona e expressão exógena de Bag-2.

Com base nos resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (Chaves, Melo et al., 2010), previamente detalhado, elegeu-se concentração

de 0,3nM de rotenona (Sigma) para a análise dos parâmetros de interesse da agregação proteica, a concentração de 0,5nM para a análise durante a formação dos agregados proteicos e 0,7nM para a análise após a formação dos agregados. O grupo controle foi exposto a DMSO (0,001%).

A rotenona foi preparada com DMSO (Sigma) em solução estoque de 1 μ M e diluída em meio de cultura nas concentrações determinadas para aplicação nas células.

O controle de transfecção foi feito com o vetor vazio e no grupo experimental a transfecção foi feita com o vetor plasmideal contendo a sequência de Bag-2. No entanto, os esquemas apresentados adiante mencionam apenas a transfecção do vetor com a sequência de Bag-2 para simplificação.

Foram feitos 4 experimentos diferentes para a análise do decurso temporal e da concentração para a ação da rotenona e da Bag-2 sobre os parâmetros de interesse.

Para a análise no período de 24 horas a exposição à rotenona e a transfecção foram feitos concomitantemente (FIGURA 8).

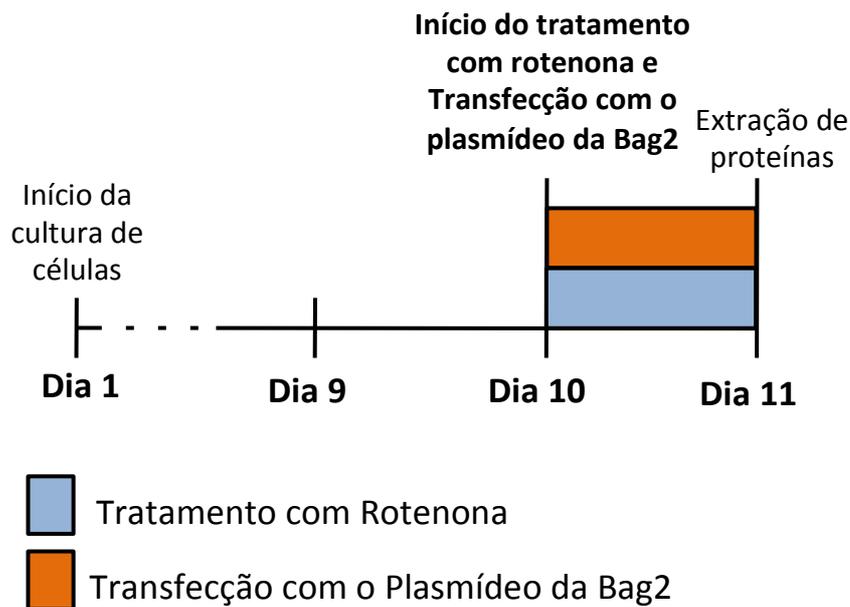


Figura8. Esquema ilustrativo do protocolo experimental de tratamento das culturas de células com rotenona (0,5nM) e de transfecção com o vetor plasmideal contendo a sequência da co-chaperona Bag-2. A exposição à rotenona e a superexpressão de Bag-2 foram feitas concomitantemente e por um período de 24 horas.

Para a análise de 48 horas os experimentos foram feitos em duas etapas: 1- o tratamento com rotenona foi iniciado e após 24 horas foi feita a transfecção com o vetor plasmideal contendo Bag-2 (FIGURA 9A); 2- A transfecção com o vetor plasmideal da Bag-2 foi feito simultaneamente ao tratamento com rotenona (FIGURA 9B). A rotenona e a transfecção foram mantidas por 48 horas, no entanto, em intervalos de tempo diferentes. Após a retirada da rotenona, as células foram mantidas com meio de cultura como descrito no item 3.2.

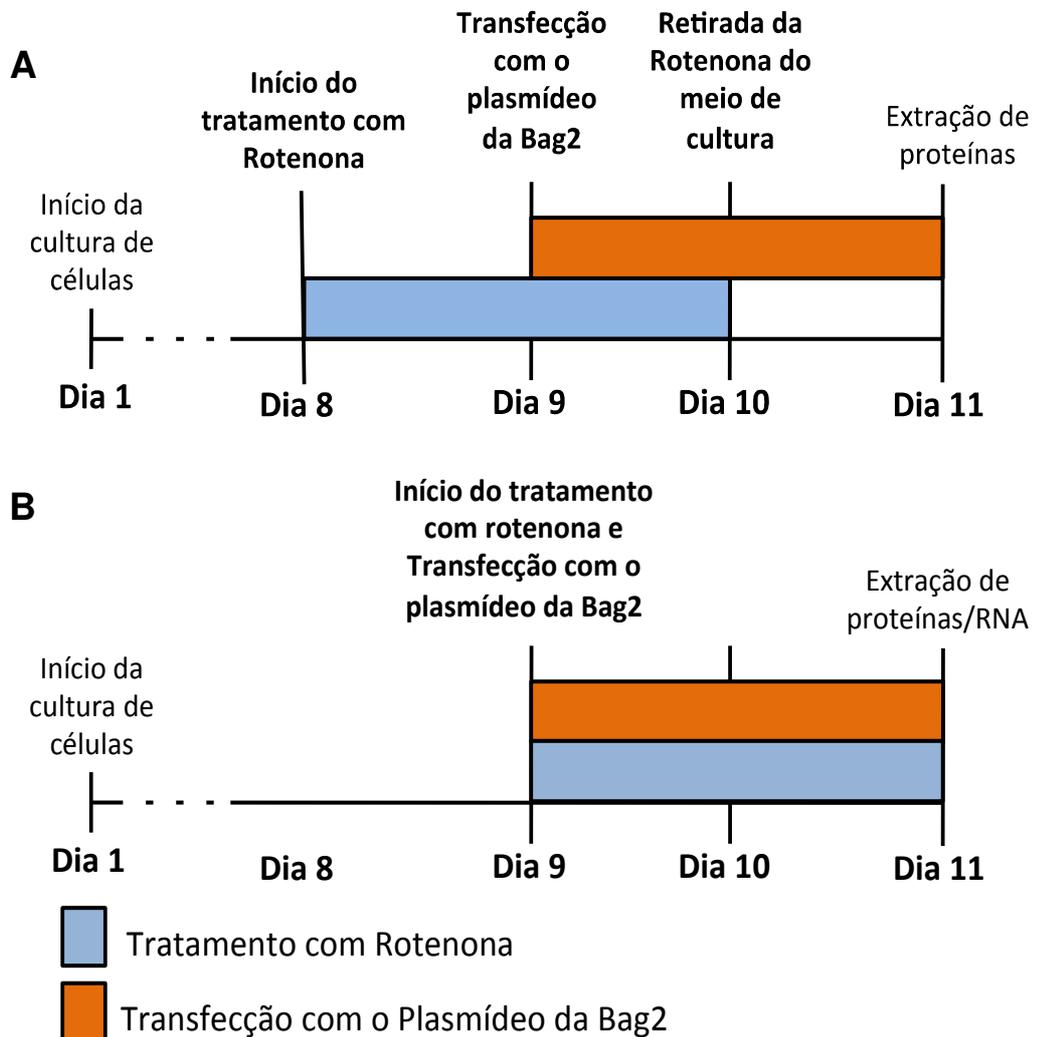


Figura 9. Esquema ilustrativo do protocolo experimental de tratamento das culturas de células com rotenona (0,3; 0,5 ou 0,7nM) e de transfecção com o vetor plasmideal contendo a sequência da co-chaperona Bag-2 durante 48 horas. No primeiro protocolo a rotenona foi aplicada 24 horas antes da transfecção com Bag-2 (**A**), no segundo protocolo o tratamento com rotenona foi concomitante à transfecção com Bag-2 (**B**).

Para a análise em 72 horas o tratamento do grupo rotenona foi iniciado e após 24 horas foi feita a transfecção para superexpressão da Bag-2. A rotenona foi mantida por um período de 48 horas e após seu término foi adicionado meio de cultura para manutenção da superexpressão de Bag2 foi por um período de 72horas (FIGURA 10).

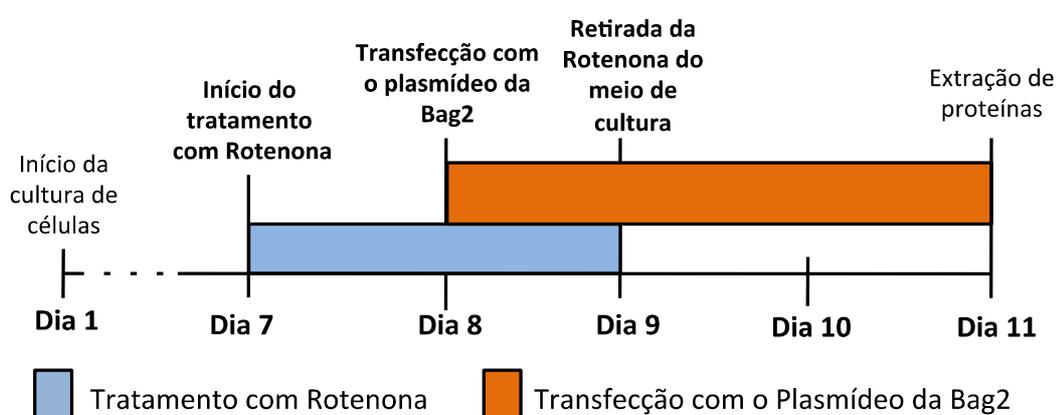


Figura10. Esquema ilustrativo do protocolo experimental de tratamento das culturas de células com rotenona (0,5nM ou 0,7nM) durante 48 horas e de transfecção com o vetor plasmideal contendo a sequência da co-chaperona Bag-2 durante 72 horas. A rotenona foi aplicada 24 horas antes da transfecção com Bag-2 e foi mantida por um período de 72 horas.

A análise da ação da Bag-2 em prevenir a formação dos agregados foi realizada durante 96 horas de superexpressão da co-chaperona. A transfecção com o plasmídeo da Bag-2 foi iniciada 48 horas antes do início do tratamento com rotenona, permanecendo por um período total de 96 horas na cultura de células. O tratamento com rotenona foi mantido por um período total de 48 horas (FIGURA 11).

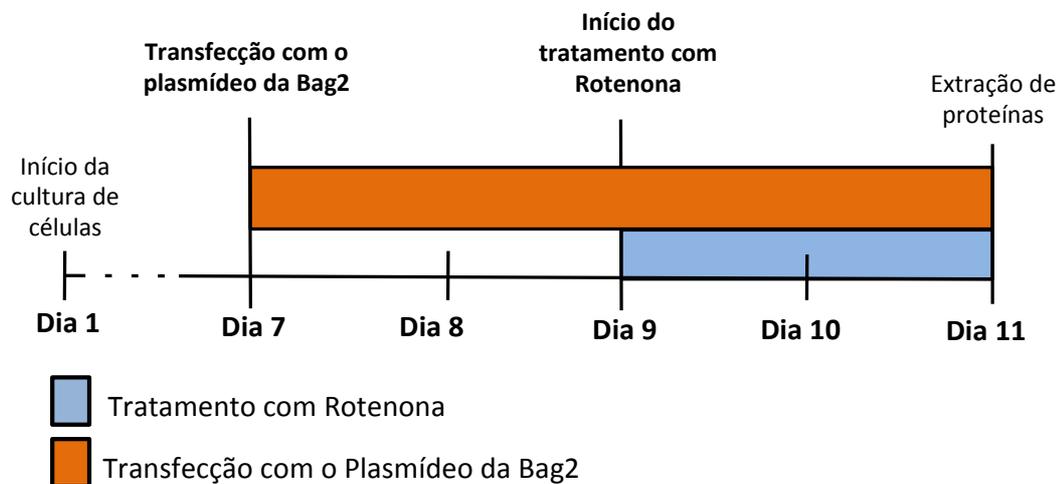


Figura11. Esquema ilustrativo do protocolo experimental para avaliar a ação da Bag-2 em prevenir a formação dos agregados proteicos. As células foram tratadas com rotenona nas concentrações de 0,5nM e 0,7nM. A superexpressão de Bag-2 foi iniciada 48 antes do tratamento com rotenona, somando um período total de 96 horas.

Após os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS para serem submetidas à técnica de imunocitoquímica, extração de proteínas para a técnica de Western Blotting e/ou extração de RNAm para a técnica de PCR

3.5.2.Tratamento com peptídeoAβ1-42

O peptídeo sintético Aβ1-42 foi obtido da empresa American Peptide Company (62-0-80B), preparado como solução estoque de 50μM em DMSO e armazenado a -20°C. Para uso, a solução chamada de pré-agregado foi preparada na concentração de 15μM em PBS, armazenada em temperatura ambiente e mantida protegida da luz durante 6 dias. Após isto, a solução pré-agregada foi adicionada ao meio de cultura dos experimentos de inclusão proteica na concentração de 1,5μM suficiente para promover o aumento da proteína Tau hiperfosforilada. As culturas organotípicas do hipocampo foram tratadas com o peptídeo sintético Aβ1-42 diariamente.

3.5.3.Tratamento com ativador e inibidor lisossomal

A solução estoque de PADK, ativador lisossomal, foi preparada na concentração de 30mM e posteriormente diluída em meio de cultura para a concentração de uso de 5μM. A solução de uso foi adicionada diariamente à secções durante um intervalo entre 1 dia a 6 dias.

O inibidor lisossomal E64, foi obtido da empresa Sigma Aldrich (cod. E3132) e preparado numa solução estoque de 50mM diluído em DMSO, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. A solução de uso foi preparada em meio de cultura nas concentrações de 10μM a 20μM e adicionada diariamente durante um intervalo entre 1 dia a 6 dias.

3.5.4. Tratamento com inibidor proteassomal

O inibidor proteassomal, lactacistina, foi obtido da empresa Santa Cruz Biotechnology, Inc (cod. SC-3575). A solução estoque foi preparada na concentração de 10mM. Para uso, a solução foi diluída em meio de cultura na concentração de 10 μ M e foi adicionada diariamente durante um intervalo entre 1 dia a 6 dias.

3.6. Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi realizada para permitir a caracterização da cultura de células primárias empregadas neste estudo e para identificação da eficiência na transfecção do plasmídeo da Bag-2.

Após o período de cultivo, as células foram lavadas com solução de PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% diluída em PBS gelado durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução contendo 0,2% de triton durante 30 minutos em temperatura ambiente e bloqueadas em solução contendo: PBS, 2% de NGS (soro de cabra, Vector Laboratories), 0,2% de triton e 4% de BSA (albumina de soro bovino, Sigma) durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Os anticorpos primários foram diluídos em solução contendo 1% NGS, 2% BSA e 0,2% triton em PBS e incubados durante 18 horas a 4°C. Os anticorpos primários utilizados para a caracterização da cultura neuronal foram: anti-GFAP (1:1000, sc-166481; Santa Cruz), para identificação dos

astrócitos e anti-Map2 (1:1000, sc 74422; Santa Cruz), para identificação dos neurônios.

Terminado o período de incubação as células foram lavadas 3 vezes com PBS gelado por 5 minutos cada e posteriormente incubadas com anticorpo secundário fluorescente conjugado ao Texas-Red 1:70 (Jackson Laboratories) específico para o anticorpo primário durante 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz.

As placas de cultura contendo as células marcadas foram montadas com meio contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector laboratories) e as células foram analisadas em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Zeiss) equipado com câmera AxioCam utilizando a objetivas e filtros apropriados para identificação dos neurônios, astrócitos e células que expressam o GFP (indicativo de expressão da Bag-2)

3.7. Extração de Proteína e Western Blotting

As células foram lavadas com PBS e em seguida lisadas e homogeneizadas, utilizando-se 100µL de tampão de lise constituído de 1% NP40, 0,5% deoxicolato de sódio, 1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA e 1% de coquetel inibidor de proteases (Sigma). A quantidade de proteína foi acessada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva de calibração foi feita utilizando-se albumina em quantidade de 0 a 16 µg de BSA por poço.

Para fracionamento, às amostras de proteínas (20µg) foi adicionado tampão de amostra as quais foram desnaturadas à 100°C durante 3 minutos

antes de serem aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12%. Na primeira canaleta foi aplicado o marcador de peso molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com 250mM trisma base (Sigma), 960mM glicina (Amresco) e 1% SDS (BioRad), as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora.

Após a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) que foi bloqueada com leite desnatado 5% preparado em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas diferentes incubações com anticorpos primários anti-Rab7 (H-50, 1:1000; Santa Cruz), anti-Rab24 (N-19; 1:500, Santa Cruz), anti-Tau fosforilada (Ser-199/202, 1:1000; Sigma), anti-Tau total (1:1000, Sigma), Anti-FLAG (1:1000, Santa Cruz), anti-Catepsina B(1:200; Novus Biologicals NBP1-19797), anti-GluR1 (1:700, Chemicon, Temecula, RH95), anti-Sinapsina II (1:200; Novus Biologicals, nb100-98778), anti-Bag-2 (1:300, Abcam, ab-80596), anti-LC3 (1:300, Cell Signaling, #2775) e anti- β -actina (1:1000; Santa Cruz, SC-47778). A solução diluidora de anticorpos foi preparada diferentemente, levando em consideração incubação do anticorpo secundário e o método de revelação da membrana.

Os anticorpos anti- p-Tau, Rab24 e Rab7 foram diluídos em leite desnatado (3%) em TBS-T e incubados com anticorpos secundários conjugados a uma peroxidase (HRP). Os anticorpos da t-Tau, catepsina B, sinapsina II, proteassomo 20S, GluR1 foram preparados em solução contendo 1% de BSA diluído em TBS-T e incubados com anticorpo secundário conjugado a uma molécula de fosfatase alcalina (AP). Os

anticorpos secundários foram diluídos em TBS-T contendo leite 3%, adicionados à membrana e mantido sem incubação sob agitação durante 1 hora em temperatura ambiente.

A marcação dos anticorpos conjugados à HRP foi revelada através de incubação com reagente quimioluminescente (Immobilon Western Enhancing Chemiluminescent HPR substrate, ECL kit, Millipore, EUA, Cod. WBKLS-0500) durante 5 minutos e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL, Life Technologies) que foram revelados conforme instruções do fabricante para os anticorpos secundários conjugados com a molécula HRP.

A marcação dos anticorpos conjugados a fosfase alcalina foi revelada através da incubação com reagente BCIP/NBT (Merck Millipore) durante 5 minutos na própria membrana.

Em seguida, as membranas foram submetidas à nova marcação com anticorpo anti- β -actina (1:1000, Santa Cruz, SC-47778), para normalização, seguida de incubação com o anticorpo secundário conforme já descrito.

Os filmes e as bandas obtidas na membrana foram quantificados por densitometria óptica usando o sistema de análise de imagens ImageJ (Image J Software).

3.8. Extração de RNAe PCR em Tempo Real

O ambiente de trabalho foi limpo utilizando-se solução descontaminante de RNase (RNase ZAP, Ambion). Os tubos e ponteiros utilizados também estavam livre de RNases. Para a extração de RNA foi

utilizado o kit de extração da Invitex (Invosorb RNA mini kit) e seguido o protocolo sugerido pelo fabricante.

Resumidamente, as células foram lisadas e homogeneizadas com 350µL de solução RA1 por placa contendo 10% de β-mercaptoetanol. O lisado foi filtrado e à solução filtrada foram adicionados 350µL de etanol 70%. Esta mistura passou por uma membrana especial onde ficaram retidos os ácidos nucleicos após centrifugação de 30 segundos a 8000g. A membrana foi desalinizada e em seguida tratada com DNase durante 15 minutos à temperatura ambiente. O RNA ligado à membrana foi eluído em um novo tubo e armazenado em freezer a -80°C até sua utilização.

Para acessar a quantidade e qualidade do RNA extraído, primeiramente uma amostra foi submetida ao espectrofotômetro para ter a absorbância à UV determinada. As amostras que revelaram uma razão $A_{260}:A_{280}$ menor que 1,8 foram descartadas. Após a determinação da concentração de RNA por tubo, uma amostra contendo 1µg de RNA total foi fracionada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. A proporção entre as frações 28S e 18S do RNA ribossômico foi de aproximadamente 2:1 indicando que o RNA era de boa qualidade e apropriado para as análises em PCR em tempo real.

O RNA foi transformado em cDNA, através de transcrição reversa. Para tanto, em 1µg de RNA total foram adicionados tampão TaqMan, $MgCl_2$, dNTPs, hexâmeros randômicos, inibidor de RNase e a enzima transcriptase reversa atingindo o volume final de 50µL, conforme instruções do fabricante

(TaqMan – Applied Biosystems, EUA). Ao final do procedimento o cDNA foi estocado em freezer a -80°C até sua utilização no PCR em tempo real.

Foram avaliadas a expressão dos RNAs das Rabs 7 e 24 e Bag-2 após tratamento com rotenona utilizando-se probes e primers comercialmente disponíveis e seguindo-se estritamente o protocolo recomendado pelo fabricante (TaqMan – Applied Biosystems, EUA). A normalização das reações foi feita utilizando primers e probe para RNA ribossômico (18S) (Applied Biosystems, EUA). As soluções foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e colocadas em placa de 96 poços com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA), posteriormente lacrada com adesivo também com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) e submetida à amplificação e detecção através de PCR em tempo real (modelo 7300, ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) por 50 ciclos.

Os dados referentes aos RNAm de estudo foram normalizados através da subtração dos valores referentes ao 18S e comparados entre si por normalização logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

3.9. Ensaio sobre a atividade Proteassomal

As culturas organotípicas do hipocampo foram submetidas a extração de proteína conforme descrito previamente e empregadas no ensaio para determinação da atividade proteassomal, como descrito previamente (Gaczynska e Osmulski, 2005). O peptídeo fluorogênicos-LLVY-AMC (Calbiochem) foi utilizado como um peptídeo padrão para o ensaio da

atividade quimiotripsina. Trinta microgramas de proteína foram incubada a 37°C em um tampão de Tris/HCl a 20 mM, pH 7.5, chamado de tampão padrão.

A incubação foi iniciada pela adição de 10–50 μ M do peptídeo s-LLVY-AMC e feita à análise fluorimétrica com base na reação com o substrato. O comprimento de onda para leitura foi de 365 nm para excitação e registrado a 440 nm. A quantidade da fluorescência do AMC liberada oriunda do substrato foi calculada usando uma curva livre de AMC captada pelo espectrofotômetro. A leitura foi feita durante 45 minutos em intervalos de 3 minutos para cada leitura. Os dados obtidos (V_{max} , unidades por segundo) foram então processados através da normalização com os controles negativos (tampão + Suc-LLVY-AMC).

3.10. Ensaio sobre a atividade da Catepsina B

O extrato proteico das culturas organotípicas do hipocampo foi submetido a ensaio para determinação da atividade da catepsina B. O peptídeo fluorogênico Z-Arg-Arg AMC foi utilizado após uma diluição de 100x da concentração estoque fornecida pelo kit (InnoZyme Cathepsin B Activity Assay Kit, fluorogenic, Cat. CBA001), combinado com tampão cisteína 1M e as respectivas amostras equalizadas para 10 μ g de proteína.

Após a mistura dos componentes em placa de 96 poços, a solução foi incubada a 37°C por 50 minutos e então submetida a leitura em espectrofotômetro num comprimento de onda de excitação de 360-380nm e

emissão 440-460nm. O experimento foi repetido 2 vezes. A leitura da placa foi feita pelo método fluorimétrico em “*Endpoint*”.

3.11. Análise dos resultados

Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes com culturas independentes, exceto quando especificado diferente. Foram utilizados 3 poços por experimento (n=3).

Os resultados referentes à cultura primária de células tratadas com rotenona e transfectadas com o vetor plasmideal da Bag-2 foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

Os resultados obtidos a partir das culturas organotípicas tratadas com peptídeo A β e com os moduladores das vias de degradação lisossomal e proteassomal foram avaliados por ANOVA de 1 via, seguido do pós-teste de Tukey.

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism para Windows (versão 5.00, 21 de janeiro de 2005, GraphPad). Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem comparado com o controle. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado para indicar diferença estatística.

4. Resultados

4.1 Caracterização e validação da cultura de células do hipocampo

Os resultados demonstram que 41% dos tipos celulares encontrados correspondem a neurônios (imunopositivos ao Map2) e 30% das células correspondem a astrócitos (imunopositivos ao GFAP) (FIGURA12). Estes resultados mostram que as culturas utilizadas para realização deste projeto compõem culturas mistas, constituídas tanto por neurônios quanto células gliais sendo adequadas ao estudo proposto.

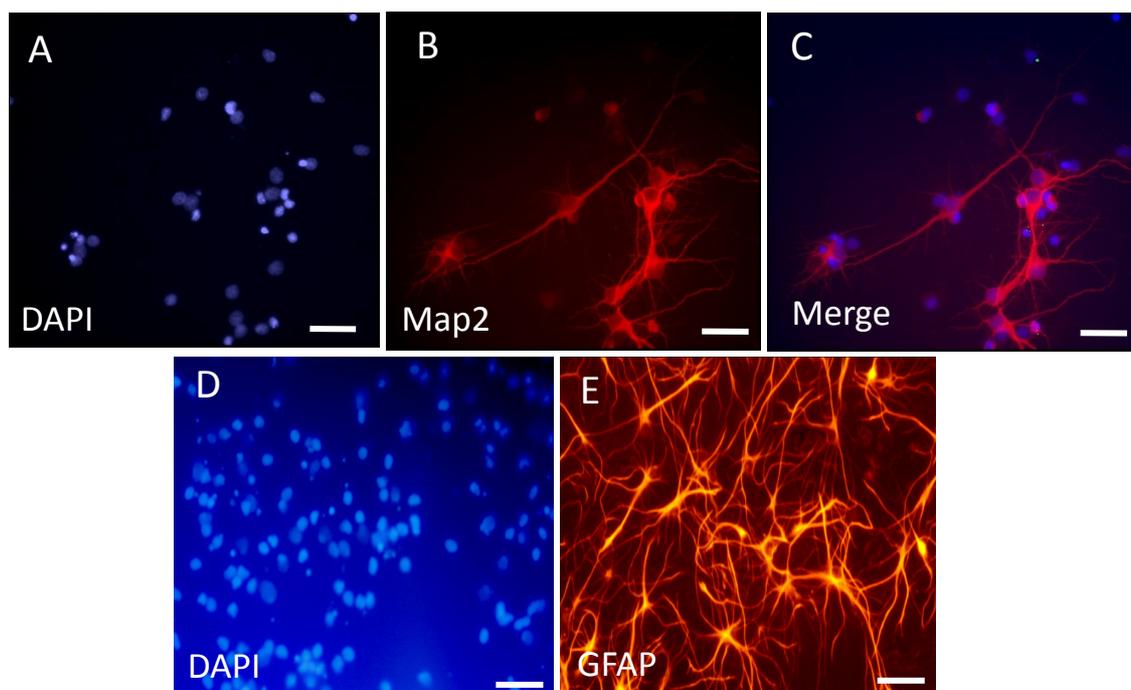


Figura 12. Imagens digitais representativas de cultura de células do hipocampo de ratos Lewis neonatos ilustrando a marcação dos núcleos (DAPI, **A** e **D**), a imunorreatividade ao Map2 (neurônios) (**B**), a colocalização da marcação do Map2 com os núcleos (**C**), e a imunomarcacão do GFAP (astrócitos) (**E**). Barra de escala=50 μ m

4.2. Transfecção com Bag-2

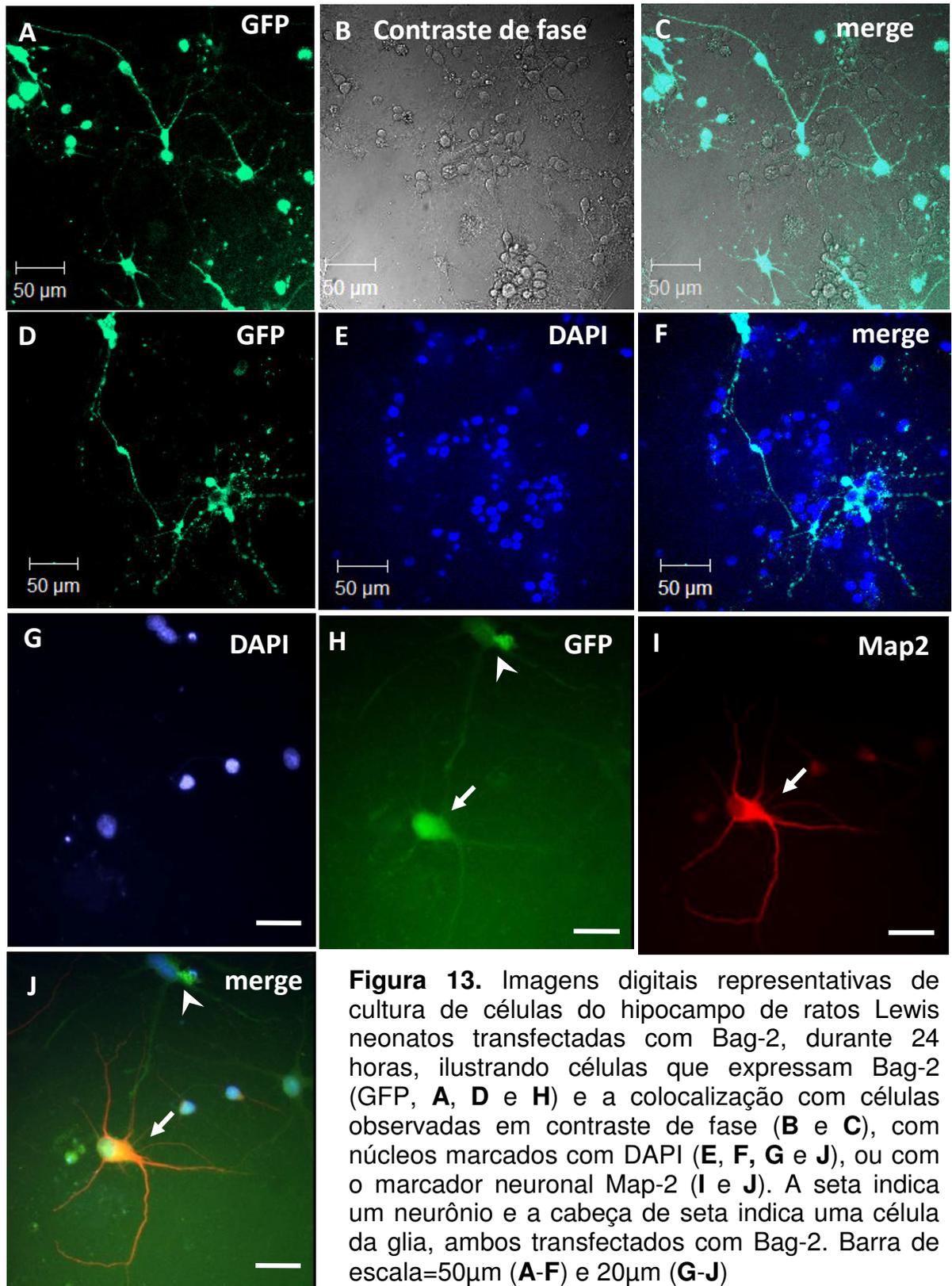
A validação do modelo experimental utilizando a expressão da Bag-2 foi realizado para verificação do potencial de transfecção, inserção dos plasmídeos em neurônios e certificação do aumento da expressão de Bag-2.

A metodologia utilizando lipossomas, empregada nas culturas de células primária foi capaz de inserir o plasmídeo de Bag-2 no meio intracelular em diferentes tipos celulares como observado por meio da fluorescência emitida pela molécula GFP presente na sequência de Bag-2 e sua colocalização com o marcador neuronal (FIGURA 13).

Os resultados sugerem uma porcentagem de 15% de células transfectadas, sendo que 7% correspondem a neurônios.

A análise do RNAm da co-chaperona Bag-2 mostrou aumento em sua expressão quando comparamos o grupo superexpressando Bag-2 com o grupo transfectado com o vetor vazio, sem a sequência de Bag-2 (FIGURA 14A). Além disso, não foi observada mudança na expressão do RNAm para Bag-2 endógena na presença da rotenona, tampouco a rotenona promoveu modificação no padrão de expressão da Bag-2 exógena (FIGURA 14A).

A sequência *Flag* para a Bag-2 foi marcada com anticorpo específico identificado por meio da metodologia de western blotting, o que valida os experimentos que avaliam a influência da presença de Bag-2 sobre mecanismos intracelulares de interesse do projeto (FIGURA 14B).



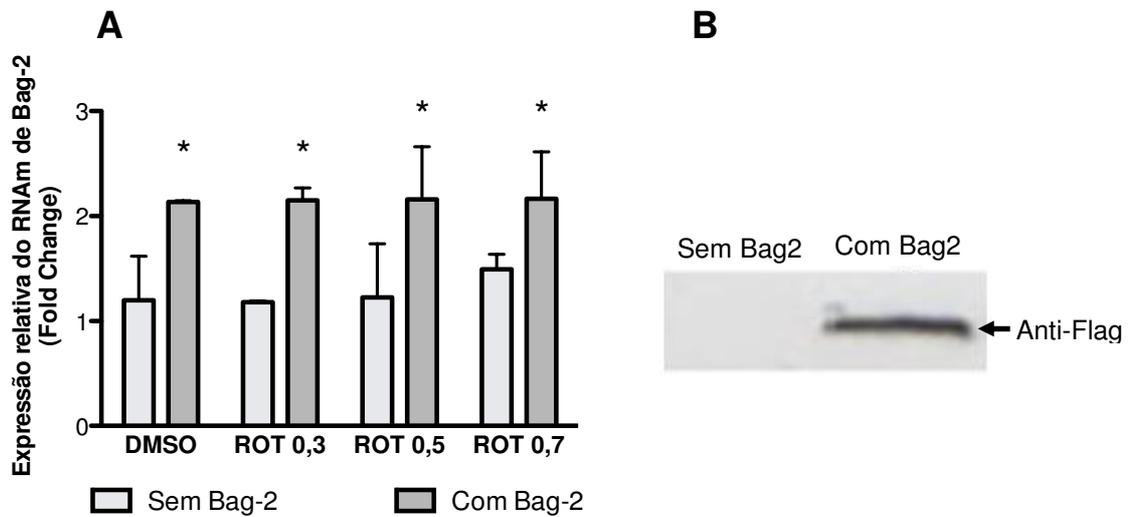


Figura 14. (A) Expressão do RNAm da Bag-2 em cultura de células do hipocampo de ratos Lewis neonatos expostas à superexpressão de Bag-2, a DMSO ou rotenona nas concentrações de 0,3nM, 0,5nM e 0,7nM. Os tratamentos permaneceram por 48 horas e foram realizados simultaneamente. (B) Imagem ilustrativa da banda de western blotting mostrando a presença da sequência *Flag* ligada à Bag-2 no grupo transfectado. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão, segundo a análise de variância de duas vias seguido do pós-teste de bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparados grupos na presença e ausência da superexpressão de Bag-2.

4.3. Bag-2 diminui os níveis de p-Tau e aumenta t-Tau.

A rotenona aumentou a hiperfosforilação da Tau em células do hipocampo em concentração de 0,5 e 0,7nM quando comparado com células expostas ao DMSO (FIGURA15A). Os níveis de p-Tau diminuíram após a superexpressão de Bag-2 em todas as condições experimentais quando comparadas com o grupo que não expressa Bag-2 exógena (FIGURA 15A). Além disso, a expressão da Bag-2 diminuiu a p-Tau em células expostas à rotenona quando comparadas com DMSO (FIGURA 15A).

Os níveis de Tau total aumentaram em células do hipocampo após exposição a 0,3; 0,5 ou 0,7 nM de rotenona quando comparadas com DMSO (FIGURA 15B). A superexpressão de Bag-2 promoveu aumento da t-Tau nas células expostas ao DMSO e a 0,5nM de rotenona quando comparado com o grupo sem Bag-2 na mesma condição de tratamento com DMSO ou rotenona (FIGURA15B). A superexpressão da Bag-2 promoveu diminuição da t-Tau nas células expostas a 0,3nM e 0,7nM de rotenona quando comparada com DMSO (FIGURA 15B). O tratamento com rotenona bem como a transfecção com Bag-2 foram feitos durante 48 horas (FIGURA 15C).

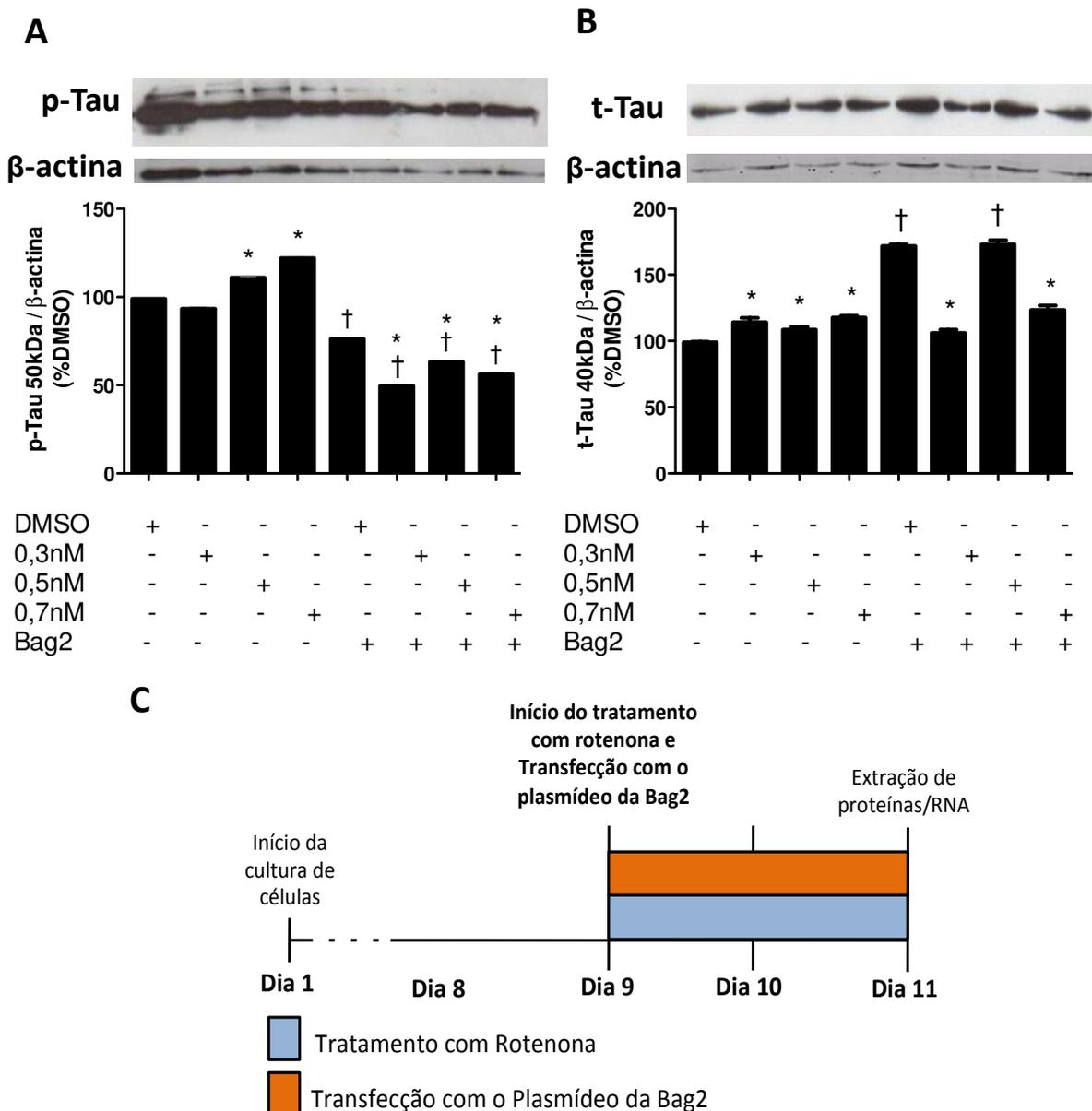


Figura 15. Níveis de proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) (**A**) e Tau total (t-Tau) (**B**) em cultura de células do hipocampo de ratos Lewis neonatos expostas a DMSO ou rotenona nas concentrações 0,3nM; 0,5nM e 0,7nM na ausência e presença de expressão exógena de Bag-2. (**C**) Ilustração do protocolo experimental. Experimento feito em duplicata técnica, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle (DMSO sem expressão de Bag-2), segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias. * $p < 0,05$ quando comparado com o DMSO na mesma condição de expressão de Bag-2; † $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sem a transfecção de Bag-2 na mesma condição de tratamento com rotenona ou DMSO.

4.4. 24 horas parece insuficiente para análise da ação de Bag-2.

Exposição das células do hipocampo a 0,5nM de rotenona por 24h não altera os níveis de p-Tau (FIGURA16A). Entretanto, a rotenona promoveu diminuição da t-Tau (FIGURA 16B)

A superexpressão da Bag-2 por 24 horas aumentou os níveis de p-Tau em células do hipocampo expostas ao DMSO (FIGURA 16A), bem como aumentou os níveis de t-Tau quando comparado ao grupo sem superexpressão da Bag-2 na ausência da exposição à rotenona (FIGURA 16B). Na presença de rotenona a Bag-2 promoveu diminuição nos níveis de p-Tau e t-Tau (FIGURAS 16A e B).

O protocolo experimental está ilustrado na figura 16C.

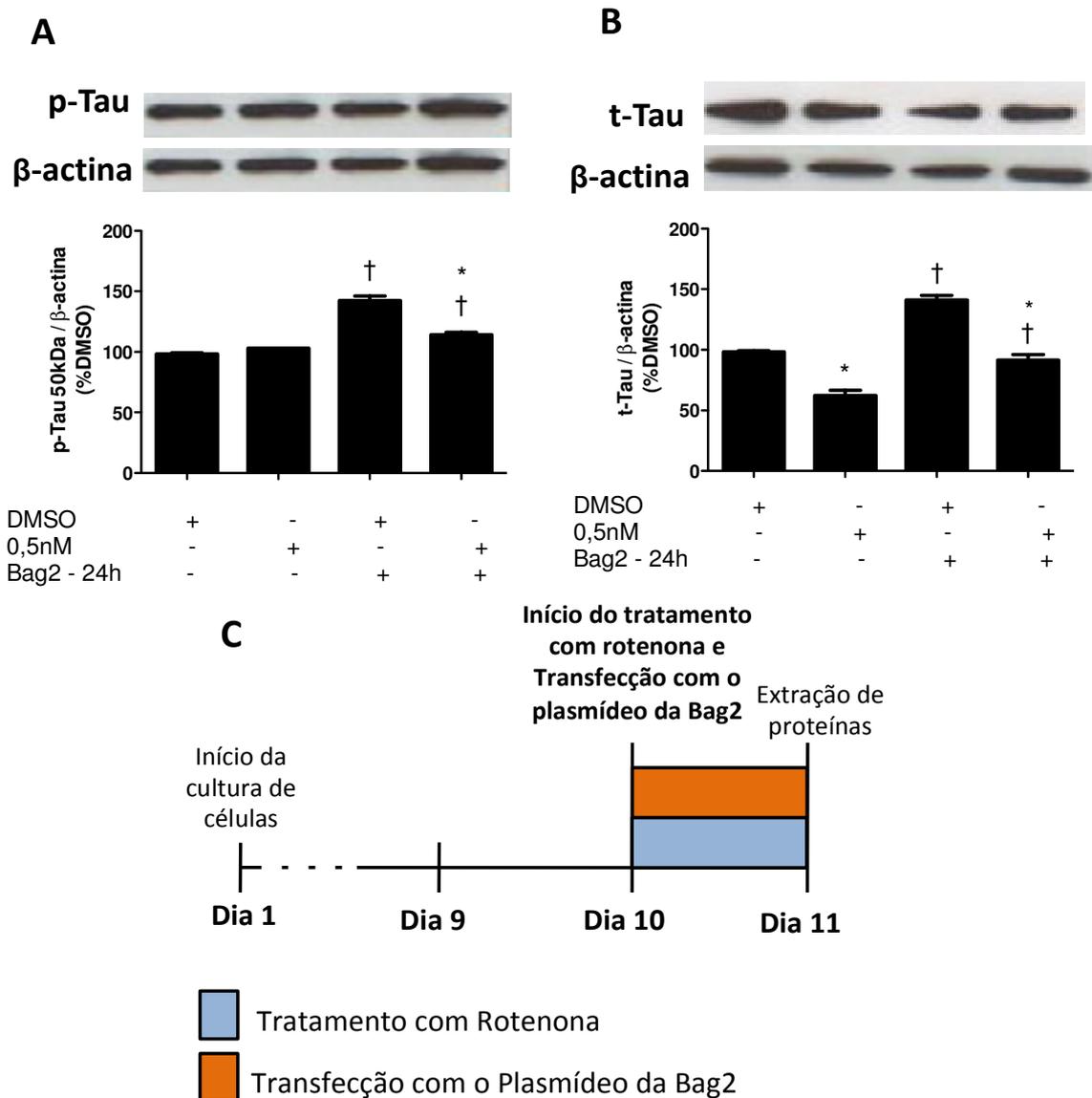


Figura 16. Níveis de proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) (**A**) e Tau total (t-Tau) (**B**) em cultura de células do hipocampo de ratos Lewis neonatos expostas a DMSO ou rotenona (0,5nM) na ausência e presença de expressão exógena de Bag-2. Os tratamentos permaneceram por 24h conforme ilustrado no protocolo experimental em **C**, foram realizados concomitantemente. Experimento feito em duplicata técnica, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle (DMSO sem expressão de Bag-2), segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias. * $p < 0,05$ quando comparado com o DMSO na mesma condição de expressão de Bag-2; † $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sem a transfecção de Bag-2 na mesma condição de tratamento com rotenona ou DMSO.

4.5. Bag-2 promove degradação p-Tau em período de 48h, após a indução de agregados com rotenona

As análises dos resultados a seguir foram feitas em decursos temporais diferentes, variando o tempo de permanência do efeito de Bag-2 em 48 horas e 72 horas combinado à exposição por 48 horas à rotenona.

A exemplo dos experimentos anteriores, a rotenona aumentou os níveis de p-Tau quando aplicada por 48h nas concentrações de 0,5nM e 0,7nM (Figura 17A). A superexpressão de Bag-2 por 48 horas foi eficiente em diminuir os níveis de p-Tau após a indução de agregados proteicos com o tratamento com rotenona nas concentrações de 0,5nM e 0,7nM quando comparado com o grupo sem Bag-2 exógeno (Figura 17A).

Não houve alteração dos níveis de p-Tau após exposição a 0,5nM e 0,7nM de rotenona por 72h, entretanto a superexpressão da Bag-2 mostrou diminuir os níveis de p-Tau na presença de 0,5nM de rotenona quando comparado com o grupo sem Bag-2 exógena (Figura 17B).

O protocolo de tratamento com rotenona e expressão da Bag-2 está detalhado na figura 17C e D.

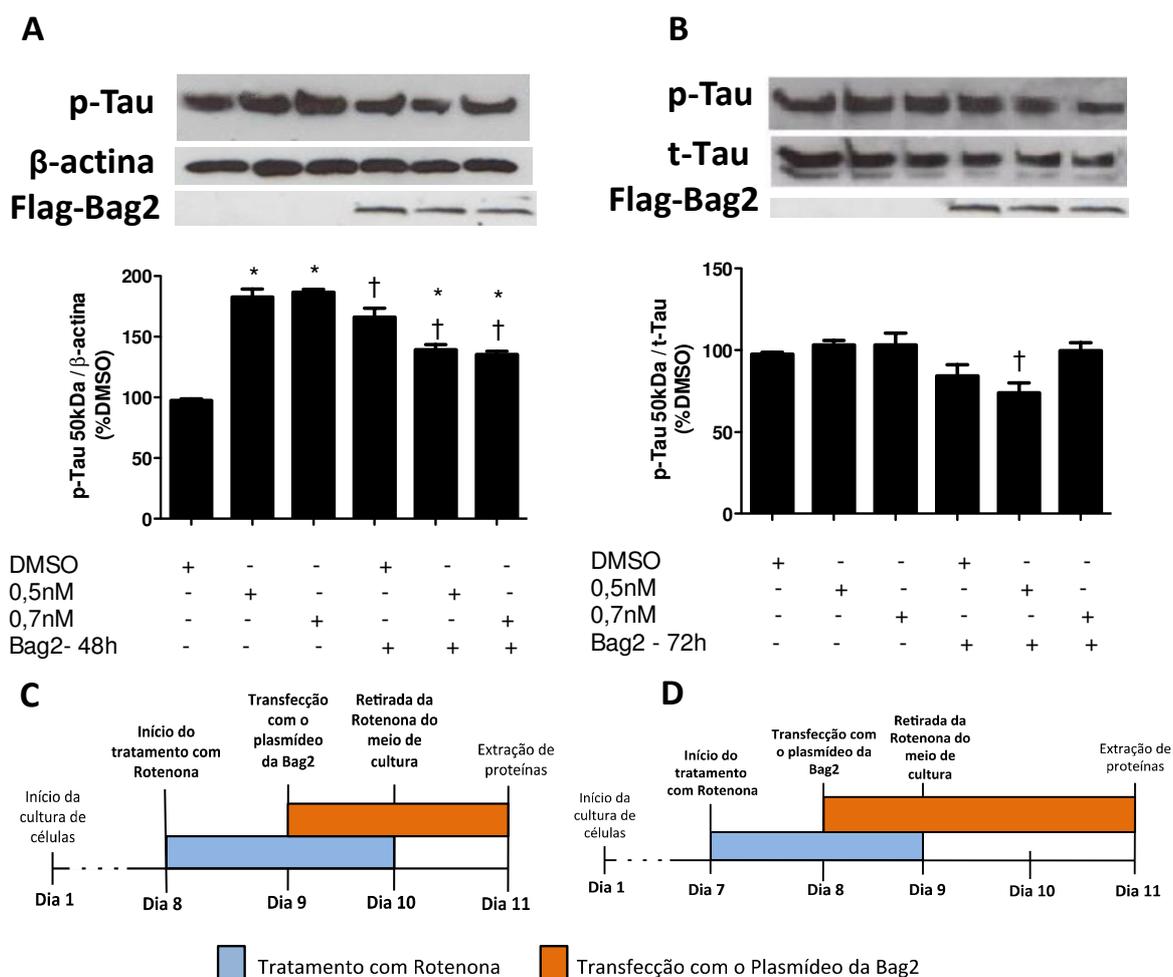


Figura 17. Níveis de proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) em células do hipocampo de ratos neonatos expostas a DMSO ou rotenona (0,5 ou 0,7nM) na ausência e presença de superexpressão de Bag-2 durante 48 horas (**A**) ou 72 horas (**B**) conforme ilustração do protocolo experimental (**C** e **D**). Experimento feito em duplicata técnica, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle (DMSO sem expressão de Bag-2), segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias. * $p < 0,05$ quando comparado com o DMSO na mesma condição de expressão de Bag-2; † $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sem a transfecção de Bag-2 na mesma condição de tratamento com rotenona ou DMSO.

4.6. Expressão exógena de Bag-2 previne a hiperfosforilação da Tau pela rotenona

A Bag-2 quando superexpressada por 48h antes da exposição à rotenona foi capaz de diminuir os níveis de p-Tau nas concentrações de 0,5nM, 0,7nM e no DMSO (FIGURA 18A).

O protocolo detalhado de transfecção com o plasmídeo de Bag-2, bem como, o tratamento com rotenona está ilustrado na figura 18 B.

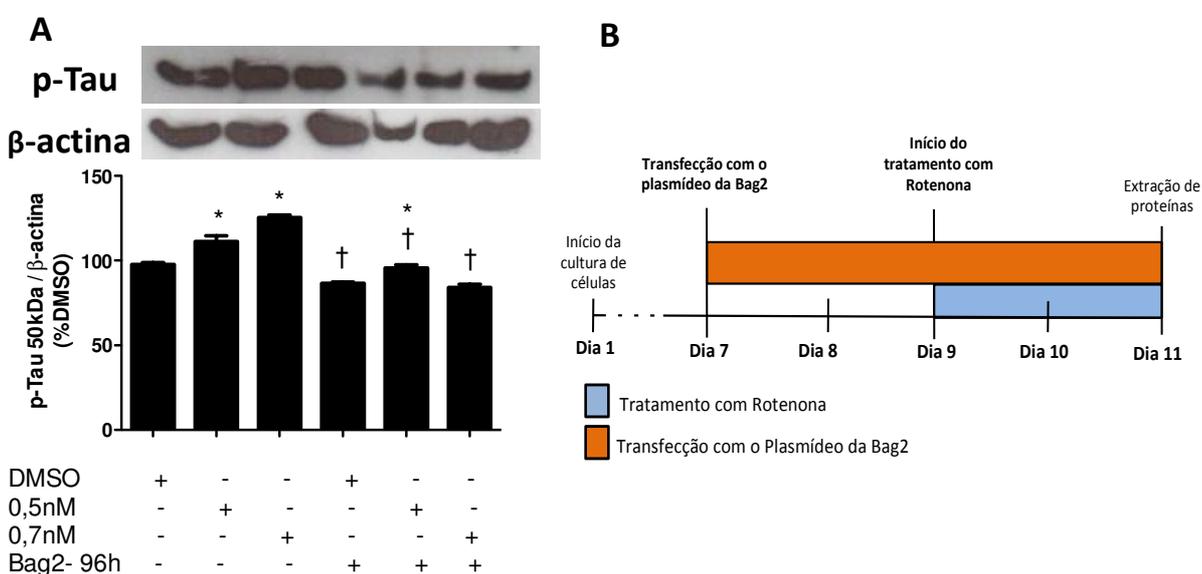


Figura 18. Níveis da proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) em células do hipocampo de ratos neonatos expostas a DMSO ou rotenona (0,5nM e 0,7nM) na presença e ausência de superexpressão de Bag-2 (A). O tratamento com Bag-2 foi iniciado 48h antes do início da exposição à rotenona e mantido por um período total de 96h, o tratamento com rotenona permaneceu nas últimas 48 horas da superexpressão de Bag-2 (B). Experimento feito em duplicata técnica, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle (DMSO sem expressão de Bag-2), segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias. * $p < 0,05$ quando comparado com o DMSO na mesma condição de expressão de Bag-2; † $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sem a transfecção de Bag-2 na mesma condição de tratamento com rotenona ou DMSO.

4.7. Análise dos níveis das proteínas Rab7 e Rab24 após tratamento com rotenona e superexpressão da Bag-2

Para um melhor entendimento do funcionamento das vias de degradação sob a influência de Bag-2 e do tratamento com rotenona, foram feitas análises das proteínas de tráfego Rab7 e Rab24 as quais estão relacionadas com a via de degradação lisossomal.

Não houve alteração significativa na expressão do RNAm da Rab7 e Rab24 após exposição às diferentes concentrações de rotenona ou na presença de Bag-2 exógena (FIGURA 19A e B). Já os níveis protéicos da Rab7 foram significativamente menores após a superexpressão de Bag-2 (FIGURA 19C). Os níveis proteicos da Rab24 diminuíram pós exposição a 0,3 e 0,5 nM de rotenona quando comparado com células expostas ao DMSO (FIGURA 19D). A superexpressão de Bag-2 não influencia os níveis de Rab-24 sem a presença da rotenona, entretanto, há diminuição nos níveis desta proteína após exposição a 0,7nM de rotenona quando compara-se os grupos na presença e ausência de Bag-2 exógena (FIGURA 19D). O protocolo experimental está detalhado na Figura 19 E.

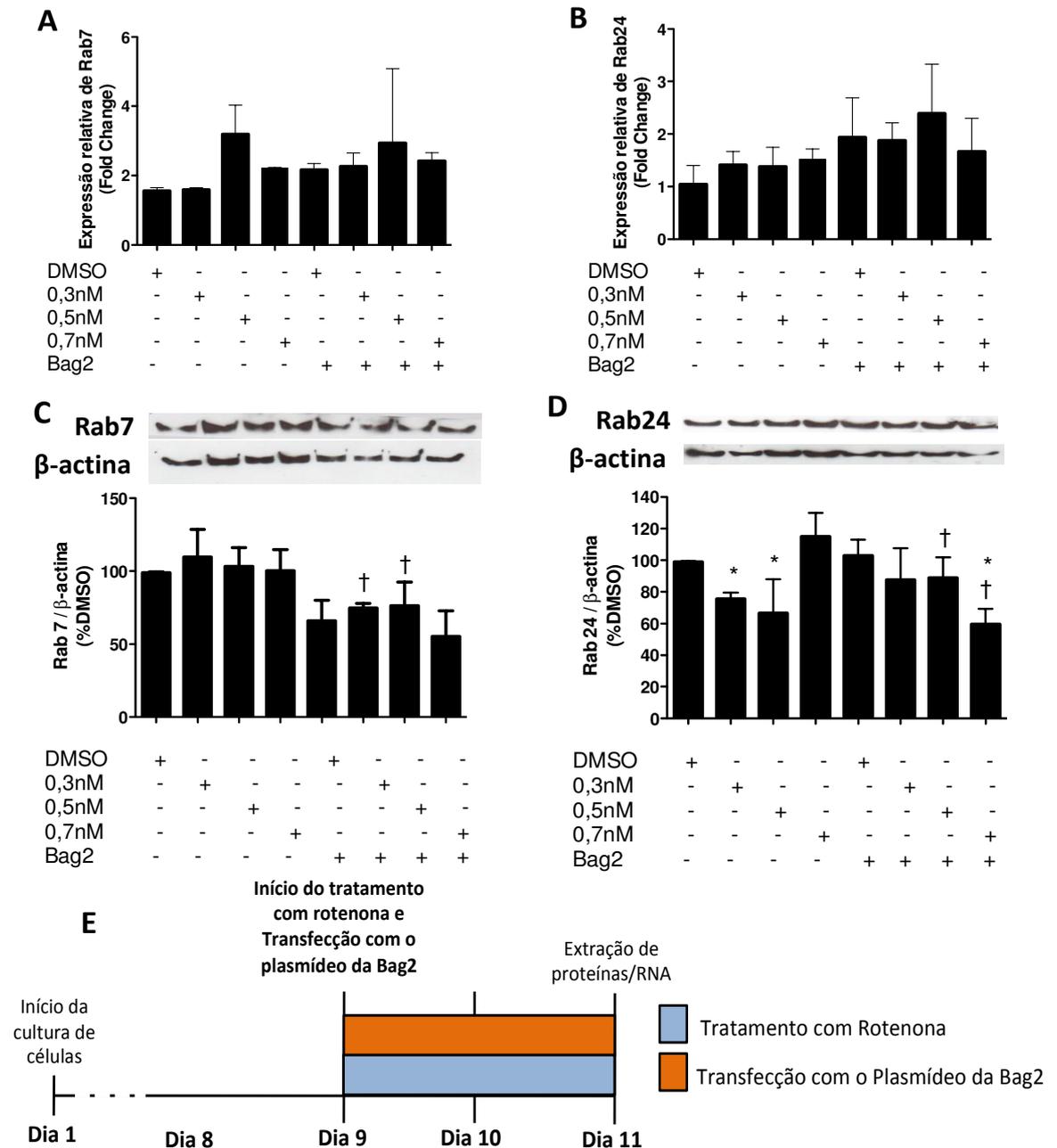


Figura 19. Expressão do RNAm e níveis das proteínas Rab7 (A e C) e Rab24 (B e D) em cultura de células do hipocampo de ratos Lewis neonatos expostas a DMSO ou rotenona (0,3; 0,5 e 0,7nM) na presença e ausência de superexpressão de Bag-2. Ambos os tratamentos permaneceram por 48 horas e foram realizados concomitantemente (E). Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle (DMSO sem expressão de Bag-2), segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias. * $p < 0,05$ quando comparado com o DMSO na mesma condição de expressão de Bag-2; † $p < 0,05$ quando comparado com o grupo sem a transfecção de Bag-2 na mesma condição de tratamento com rotenona.

4.8. O PADK foi capaz de aumentar os níveis de Catepsina B inclusive na presença do inibidor proteassomal

Os níveis de catepsina B aumentaram significativamente em cultura organotípica de hipocampo após o tratamento com 10 μ M de PADK (ativador lisossomal) por 48 horas quando comparado com o controle (FIGURA 20). Na presença de lactacistina (inibidor do proteassomo) o componente PADK também promoveu aumento da expressão da catepsina B quando comparado com o controle mas não atingiu os mesmos níveis do grupo exposto somente ao PADK (FIGURA 20). A lactacistina não influenciou os níveis de catepsina B (FIGURA 20).

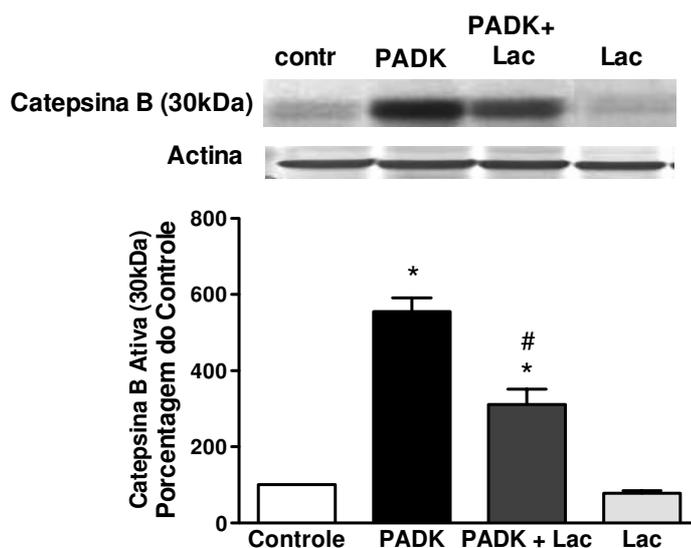


Figura 20. Níveis de Catepsina B em cultura organotípica do hipocampo expostas ao ativador lisossomal PADK (10 μ M) e/ou ao inibidor proteassomal Lactacistina (10 μ M) por 48 horas. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em porcentagem do controle segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via. * $p < 0,05$ comparado com o controle, # $p < 0,05$ quando comparado com os grupos expostos ao PADK e à Lactacistina isoladamente.

4.9. Efeito dos inibidores dos sistemas lisossomal e proteassomal sobre marcadores celulares específicos e sobre suas atividades

A análise dos níveis das proteínas apresentadas a seguir foi feita após exposição das culturas organotípica ao tratamento com Lactacistina e E64, os quais são inibidores do proteassomo e lisossomo, respectivamente, durante intervalos de tempo variados.

4.9.1. Proteínas do sistema de degradação autofagolisossomal

Não foi observada diferença significativa nos níveis da catepsina B quando comparados com o controle (DMSO) (FIGURA 21A). Os níveis da proteína LC3-I também não foram alterados após inibição do proteassomo e lisossomo (FIGURA 21B). No entanto, a proteína LC3-II apresentou um aumento significativo após o tratamento com Lactacistina por 3 dias quando comparado com os grupos tratados com Lactacistina + E64 por 2 dias e com E64 por 2 dias (FIGURA 21C).

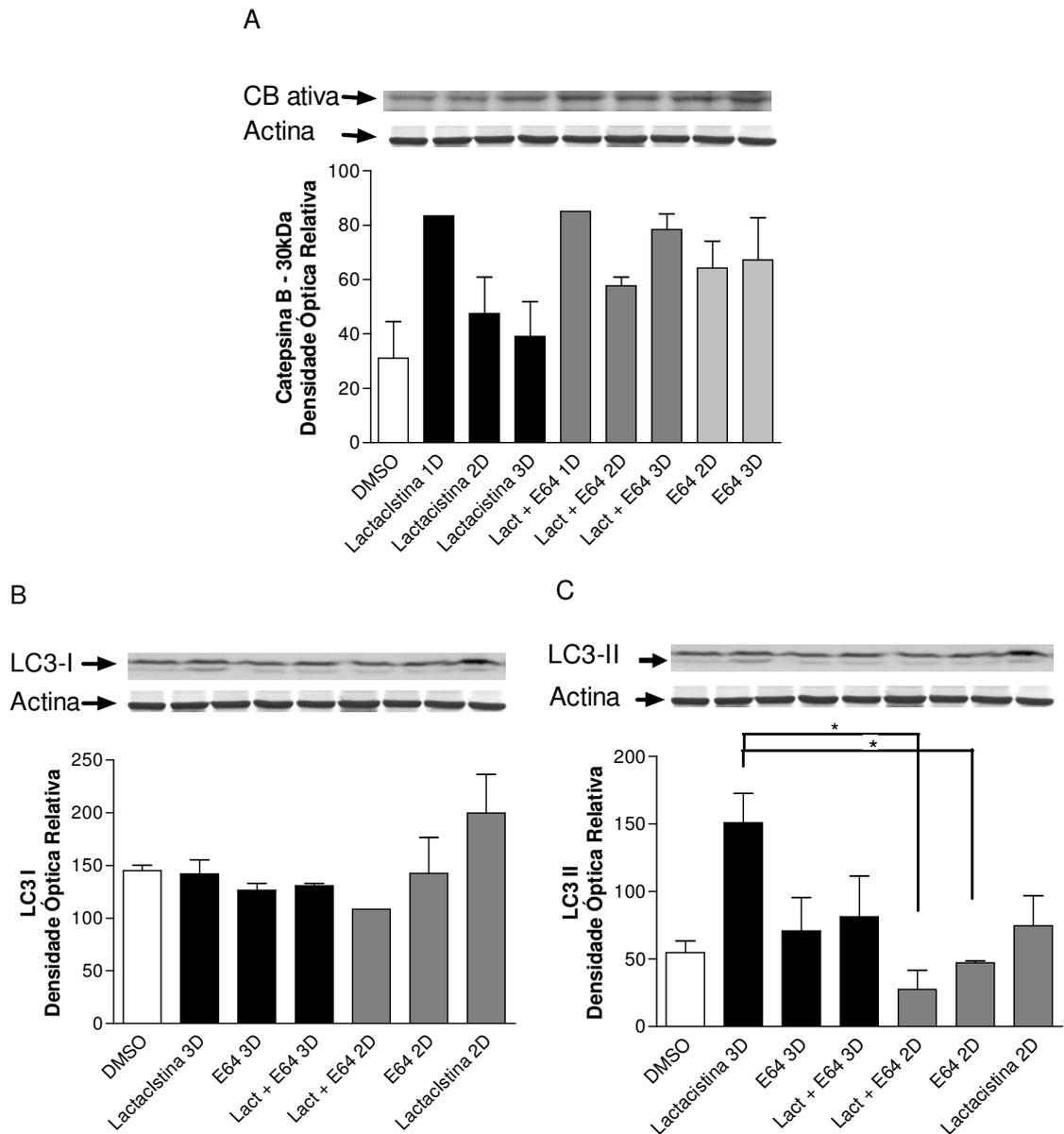


Figura 21. Níveis de proteínas relacionadas com o compartimento lisossomal: Catepsina B (CB, **A**), LC3 I (banda superior, **B**) e LC3 II (banda inferior, **C**) em cultura de células organotípicas do hipocampo expostas a 5 μ M de Lactacistina e 10 μ M de E64 por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em densidade óptica relativa, * p <0,05 segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.9.2 Análise dos níveis da subunidade 20S do Proteassomo

O tratamento com inibidor lisossomal E64 juntamente com lactacistina durante 3 dias promoveu diminuição dos níveis da subunidade α do proteassomo 20S (Figura 22), ao passo que somente o tratamento com lactacistina não tem efeito sobre os níveis proteicos desta subunidade (FIGURA 22).

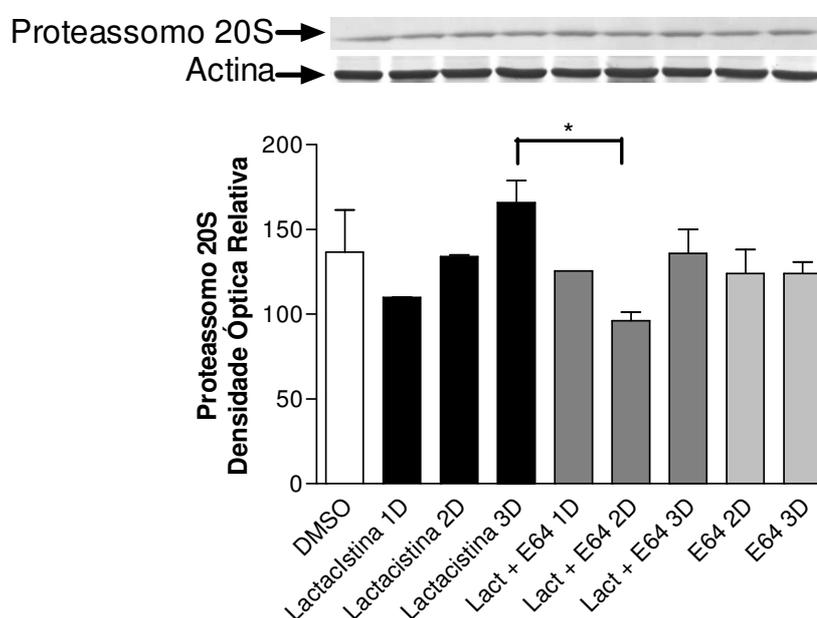


Figura 22. Nível da subunidade 20S do proteassomo em cultura organotípica do hipocampo expostas a 5 μ M de Lactacistina e 10 μ M de E64 por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Experimento feito em duplicata, N=3. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em densidade óptica relativa, *p<0,05 segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.9.3. Atividade lisossomal e proteossomal

A lactacistina diminuiu a atividade proteossomal como esperado para um inibidor proteossomal (FIGURA 23A). Além disso, a exposição das culturas organotípicas ao PADK ou E64 (moduladores lisossomais), isoladamente, não interferiu na atividade proteossomal (FIGURA 23B). Combinado com lactacistina, os moduladores lisossomais não potencializaram ou reverteram a resposta à lactacistina (FIGURA 23B).

Por outro lado, inibição proteossomal com lactacistina promoveu aumento da atividade lisossomal, medida pela atividade da catepsina B (FIGURA 23C), tal efeito foi revertido pela presença do inibidor lisossomal (E64) (Figura 23D). O tratamento com PADK não alterou a atividade da catepsina B quando combinado com lactacistina (FIGURA 23D).

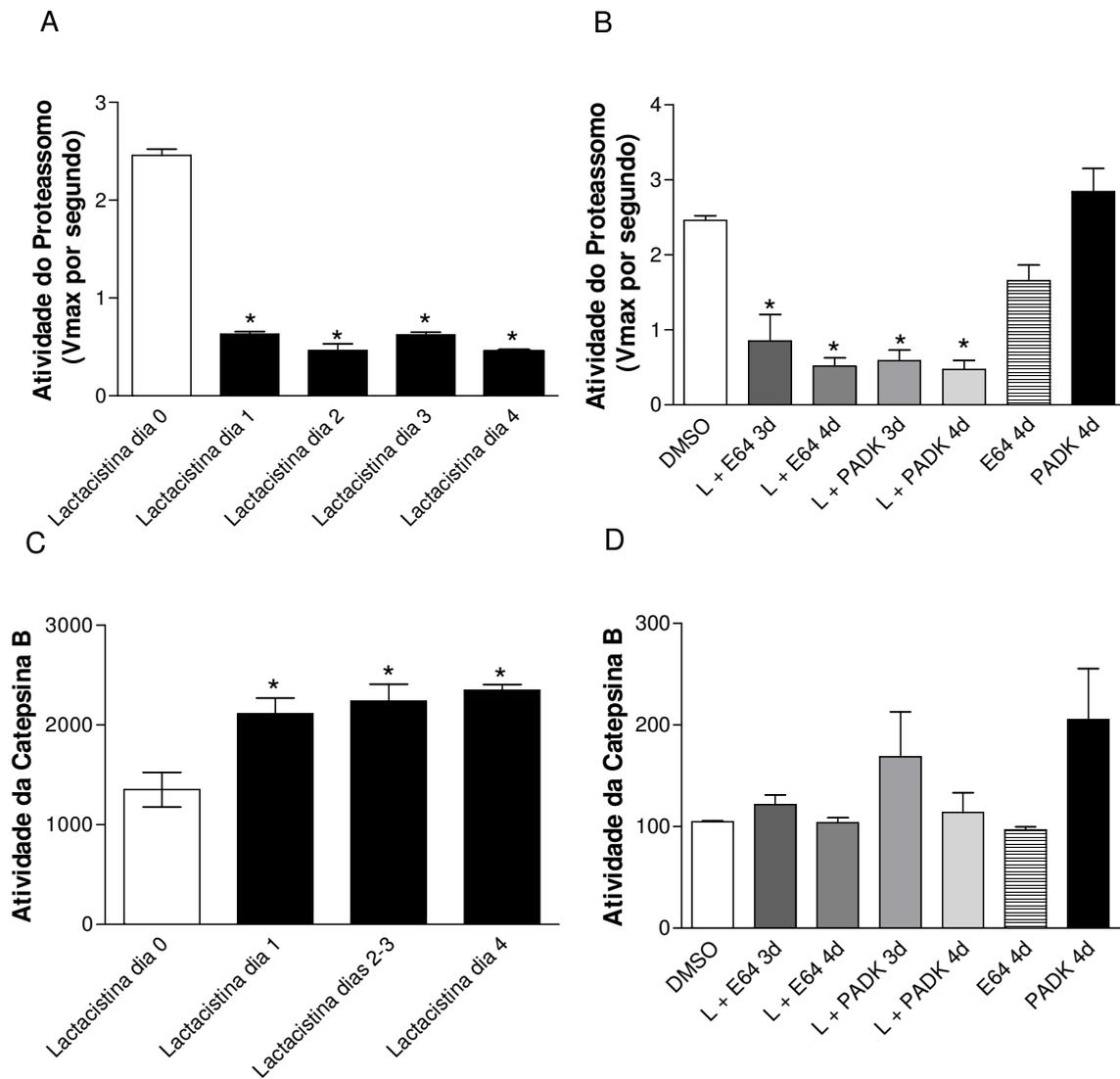


Figura 23. Atividade do proteassoma e da Catepsina B em culturas organotípicas do hipocampo expostas a: **(A e C)** 5 μ M de Lactacistina por 24 horas, 48 horas e 72 horas; **(B e D)** 5 μ M de Lactacistina, 10 μ M de E64 por 24 horas, 48 horas e 72 horas e 3 μ M de PADK por 96 horas. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem do controle para a atividade da Catepsina B e a média do VMax por segundo para atividade do proteassoma, *p<0,05 quando comparado com seu respectivo controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.9.4. Inibição dos sistemas de degradação não altera os marcadores sinápticos

O tratamento com inibidores do proteossomo e lisossomo não influenciou os níveis proteicos dos marcadores sinápticos sinapsina II (FIGURA 24A) e da subunidade GluR1 do receptor de glutamato (AMPA) (FIGURA 24B).

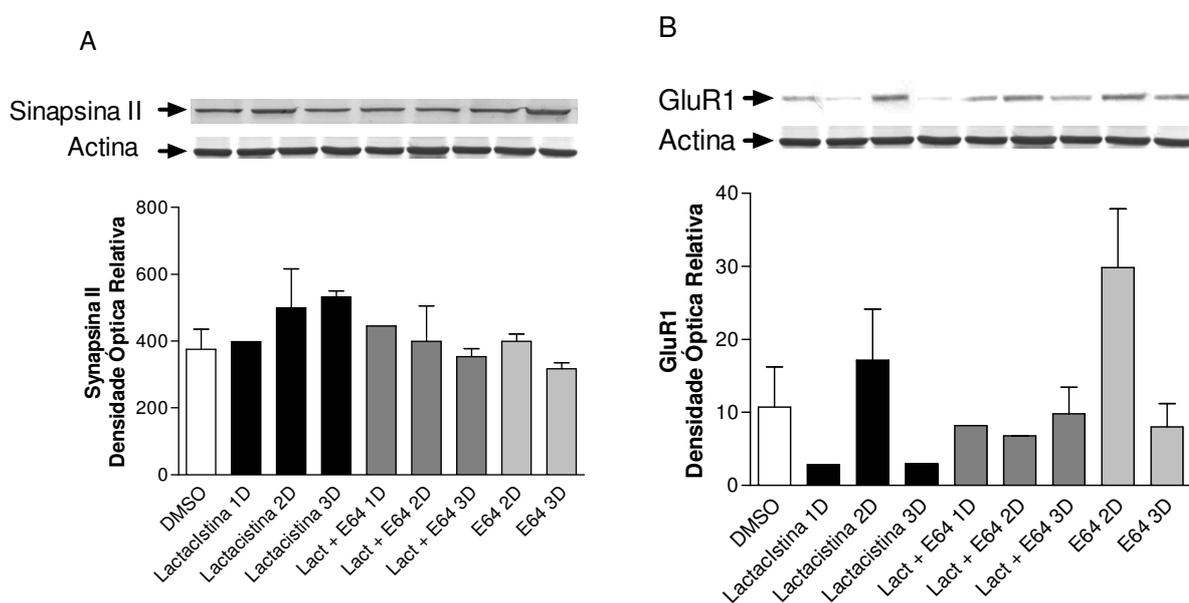


Figura 24. Níveis proteicos da Sinapsina II (A) e GluR1 (B) em cultura organotípica do hipocampo expostas a: 5 μ M de Lactacistina e 10 μ M de E64 por 24 horas, 48 horas e 72 horas. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em densidade óptica relativa, * p <0,05 segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.10. Efeito do peptídeo A β 1-42 sobre os níveis de p-Tau e integridade sináptica

Os níveis da proteína p-Tau de 70kDa e 40kDa não se alteraram após o tratamento com A β e de A β combinado com PADK, Lactacistina ou E64 por 4 dias (FIGURA 25A e B), apesar de haver uma tendência de aumento com o peptídeo A β . O marcador sináptico GluR1 também não teve seus níveis alterados em nenhuma das condições de tratamentos citados anteriormente (FIGURA 25C).

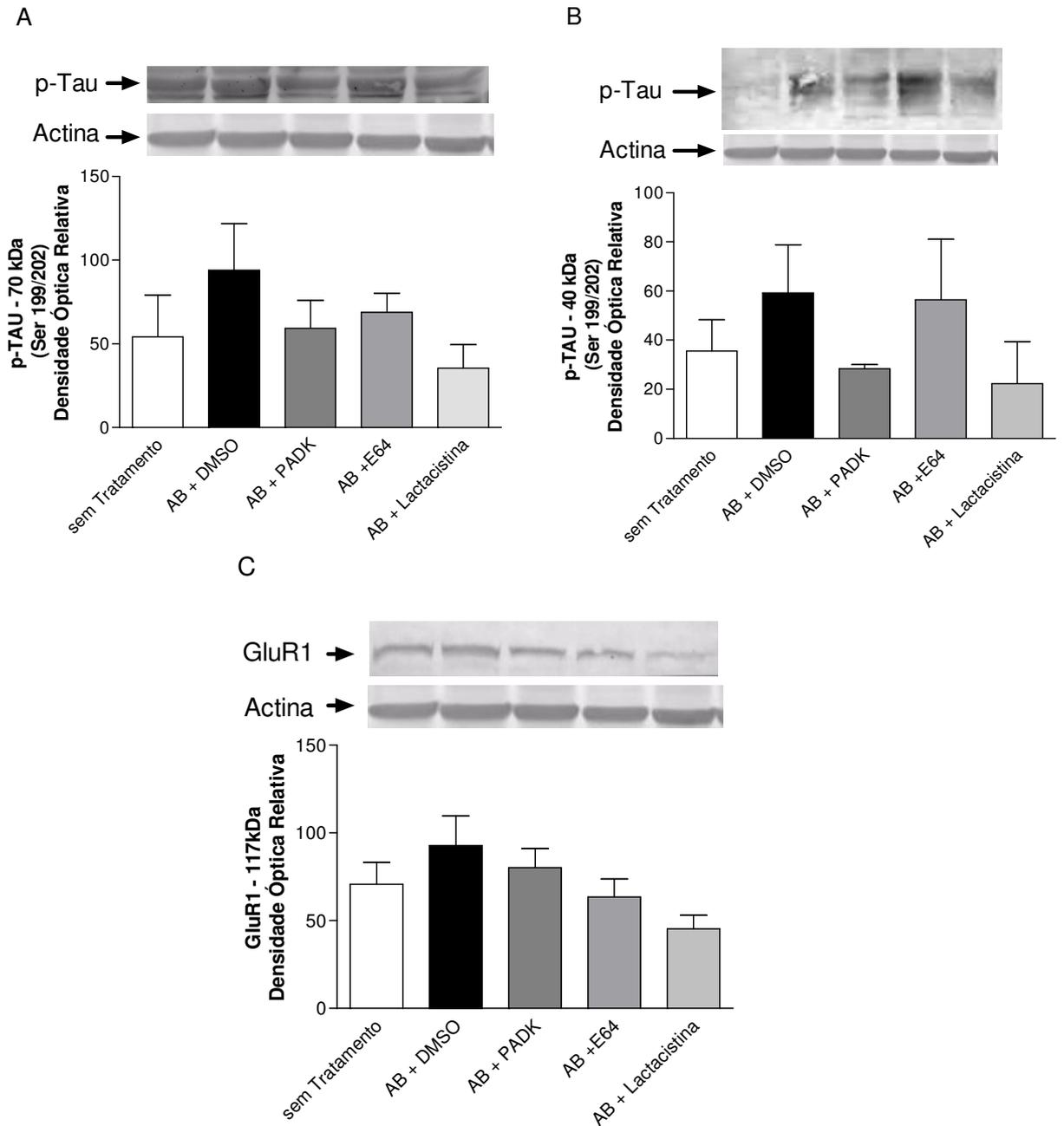


Figura 25. Níveis da proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) de 70kDa e 40kDa em cultura organotípica do hipocampo expostas a 1,5 μ M peptídeo beta-amiloide 1-42 (A β), combinado ou não com 5 μ M de Lactacistina, 20 μ M de E64 ou 3 μ M de PADK por 4 dias. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em densidade óptica relativa, * p <0,05 segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.12. Efeito do peptídeo A β 1-42 sobre os níveis das proteínas relacionadas com as vias de degradação

Foi observado aumento significativo dos níveis de catepsina B quando após tratamento concomitante A β + PADK comparado com as culturas organotípicas tratadas apenas com A β + DMSO, sem tratamento e A β + Lactacistina (FIGURA 26A). Já a subunidade 20S proteassomal não se alterou em nenhuma das condições de tratamento citadas (FIGURA 26B).

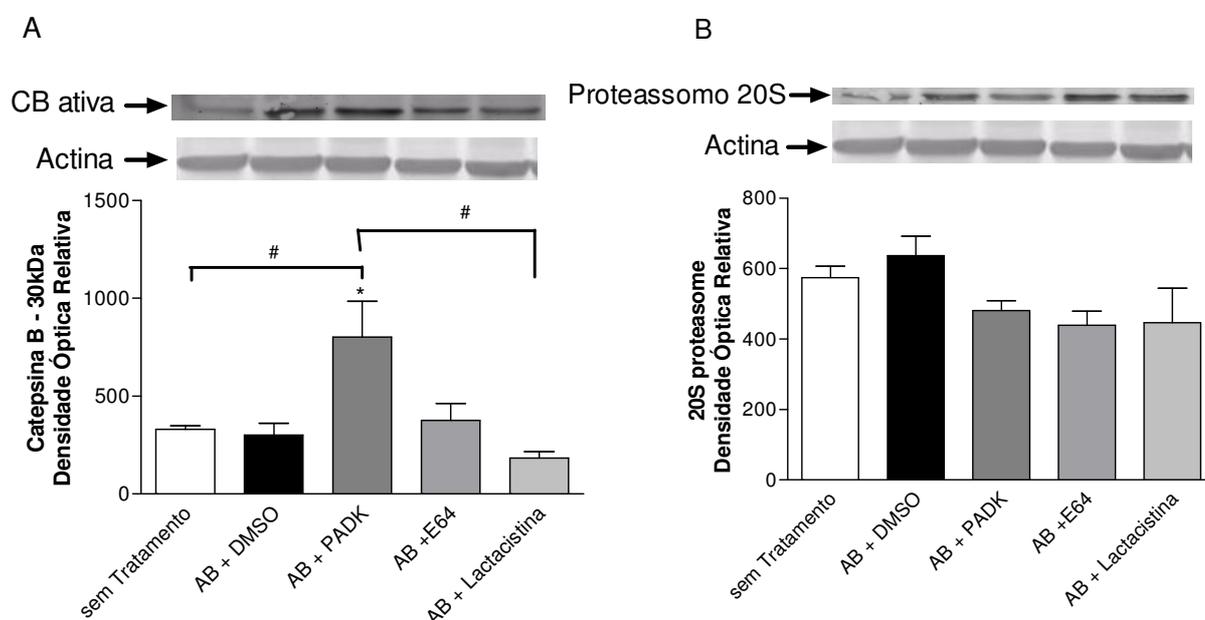


Figura 26. Níveis de Catepsina B (CB) (A) e do proteassomo 20S (B) em cultura organotípica do hipocampo expostas a 1,5 μ M peptídeo beta-amiloide 1-42 (A β) e/ou 5 μ M de Lactacistina, 20 μ M de E64 e 3 μ M de PADK por 4 dias. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão em densidade óptica relativa, * p <0,05 comparado com o controle; # p <0,05 nas comparações indicadas, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

4.13. Atividade do proteassomo após tratamento com A β e moduladores de degradação celular

A análise da atividade proteassomal foi feita pela mensuração da atividade do sítio catalítico 20S após o tratamento com A β ou A β com Lactacistina, concomitante, por 4 dias. As amostras também foram submetidas a 2 dias de tratamento com A β , sendo adicionado no segundo dia Lactacistina, PADK e/ou E64 por mais 2 dias, totalizando 4 dias de tratamento. Observou-se diminuição significativa da atividade do proteassoma na presença de A β combinado com o inibidor de proteassoma (Lactacistina) (FIGURA 27). A presença de PADK parece inibir sutilmente a atividade do proteassomo na presença de A β , além disso, o PADK ter revertido em parte essa inibição proteassomal quando analisado o grupo exposto ao A β com lactacistina e PADK (FIGURA 27).

A atividade proteassomal foi realizada também após 6 dias de tratamento com A β (A β 6d) na presença de lactacistina e PADK. Foi observada uma redução significativa após o tratamento com A β sozinho e na presença de lactacistina (FIGURA 28). O tratamento com o ativador lisossomal PADK reverteu a inibição do proteassomo na presença de A β (FIGURA 28).

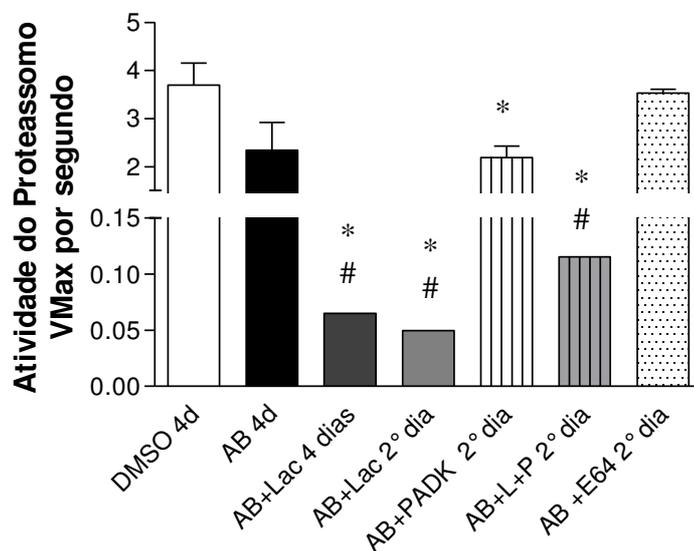


Figura 27. Atividade do proteassomo em cultura organotípica do hipocampo exposta A β (1,5 μ M) com e sem Lactacistina (L, 5 μ M) por 4 dias ou 2 dias, bem como na presença de 20 μ M de E64 ou 3 μ M de PADK (P) adicionados nos últimos 2 dias, totalizando 4 dias de tratamento. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão, *p<0,05 comparado com DMSO 4d; # p<0,05 comparado com A β 4d, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

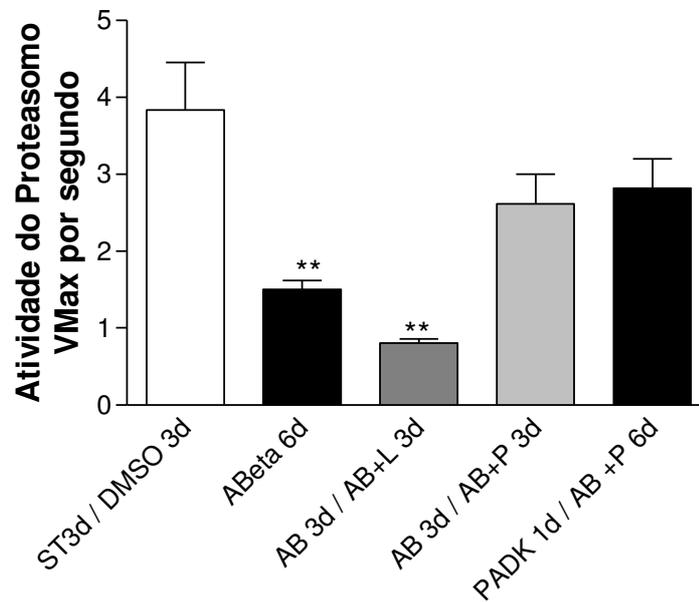


Figura 28. Atividade do proteassoma em cultura organotípica do hipocampo exposta a $1,5\mu\text{M}$ $\text{A}\beta$ durante 6 dias na presença e ausência de lactacistina (L, $5\mu\text{M}$) ou $3\mu\text{M}$ de PADK (P) adicionados nos 3 últimos 3 dias de tratamento ou concomitante ao $\text{A}\beta$. O controle foi feito incubando-se as fatias com meio padrão (ST) por 3 dias seguido de adição do DMSO (diluyente da lactacistina e PADK) por mais 3 dias. Experimento feito em duplicata, $N=3$. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão, ** $p<0,01$ comparado com o controle (ST3d/DMSO3d), segundo a análise de variância(ANOVA) de uma via.

4.14. Efeito do tratamento com peptídeo A β 1-42 sobre a atividade dos compartimentos de degradação variando o tempo

A atividade do proteassoma reduziu após 6 dias de exposição ao peptídeo A β quando comparada com seu respectivo controle. Os resultados para a atividade do proteassoma com 4 dias e 6 dias foram colocados num mesmo eixo para permitir uma análise estatística considerando a variação do tempo de tratamento (FIGURA 29A). Esses resultados já foram apresentados anteriormente de forma separadas.

O tratamento da cultura organotípica com o peptídeo A β durante 6 dias aumentou a atividade da catepsina B quando comparada com 4 dias de tratamento e com seu respectivo controle (FIGURA 29B). Os níveis de Rab-7 apresentaram o mesmo padrão de resposta da catepsina B (FIGURA 29C).

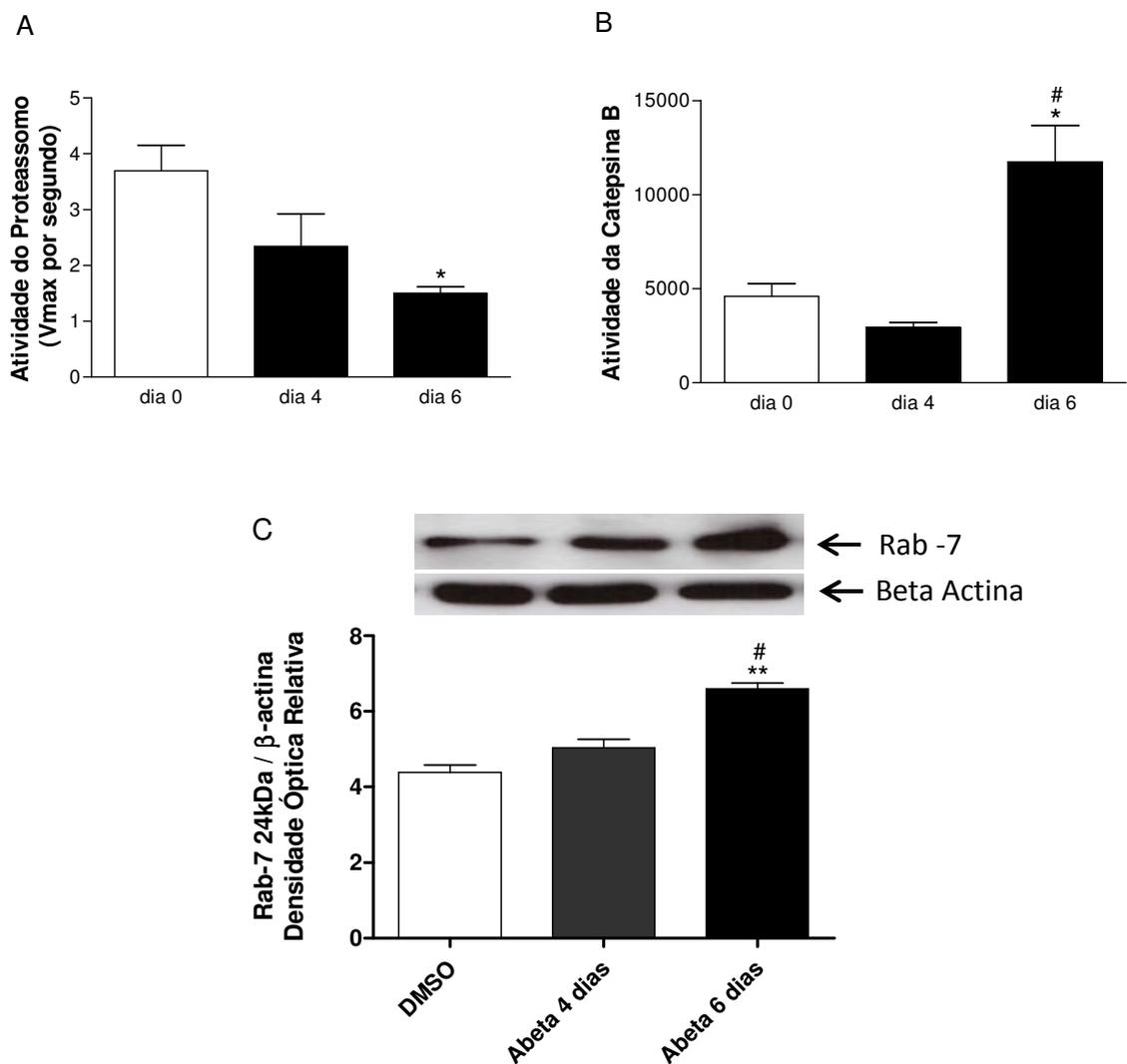


Figura 29. Atividade do proteossomo (**A**), da catepsina B (**B**) e níveis proteicos da Rab-7 (**C**) em cultura organotípica do hipocampo expostas a 1,5 μ M de A β durante 4 dias e 6 dias. Experimento feito em duplicata, N=3. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do VMax por Segundo e densidade óptica relativa. * p <0,05 e ** p <0,01 quando comparado com DMSO ou dia 0; # p <0,01 comparado com 4 dias, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via.

5. Discussão

5.1. Agregação proteica

A utilização de cultura mista faz com que nosso modelo experimental mantenha a interação neurônio/glia essencial para o desenvolvimento das sinapses, se aproximando, mesmo que parcialmente, das condições em que os neurônios *in situ* estão expostos.

Ressalta-se que o modelo de agregados de proteína constitutivas através da adição de rotenona está bem estabelecido na literatura (Schmidt e Alam, 2006; Chaves *et al.*, 2010). O modelo tem vantagem sobre os modelos de mutação genética ou transfectados, pois pode ser relacionado às doenças neurodegenerativas esporádicas.

No presente estudo foi confirmado que o tratamento com rotenona eleva os níveis de p-Tau de forma dependente da concentração e do tempo.

A rotenona induz agregação proteica pela disfunção mitocondrial e inibição do proteassoma, os quais são características comuns encontradas durante o envelhecimento (Boveris e Navarro, 2008). A rotenona age também diretamente sobre os microtúbulos (Cartelli *et al.*, 2010), favorecendo os mecanismos associados com sua desestabilização. Hongo e colaboradores (2012) demonstraram que a rotenona induz a desestabilização do microtúbulo em linhagem de células SH-SY5Y e que a inibição da via GSK3 β atenuou esse efeito. Sugere-se que o efeito da inibição da via GSK3 β , esteja relacionado com a fosforilação de Tau e seu efeito sobre os microtúbulos.

Além disso, há uma relação positiva entre os níveis de Tau hiperfosforilada e o aumento dos níveis de A β (Terwel *et al.*, 2008), favorecendo o quadro de neurodegenerativo

O efeito do peptídeo A β em aumentar os níveis de p-Tau também é bem claros (Rhein *et al.*, 2009; Chabrier *et al.*, 2012). Mais do que isso, Miller e colaboradores (2011) sugerem que A β tenha uma interação preferencial com o sítio de fosforilação R2 de Tau. Foi demonstrado que uma mutação neste sítio é capaz de levar a formação de agregados por diminuir a afinidade de Tau pelo microtúbulo (Barghorn *et al.*, 2000; Von Bergen *et al.*, 2001). Desta forma, o rompimento da função neuronal está associada à presença de A β e p-Tau.

Nossos resultados obtidos com o tratamento de A β mostraram uma tendência de aumento nos níveis de p-Tau, o que deve ser confirmado com análises complementares futuras.

De maneira geral, a agregação de proteína é um fator que colabora com o processo de neurodegeneração, bem como pode culminar na morte celular. Considerando as importantes alterações causadas por ela, este déficit celular observado poderia ser controlado pelos sistemas de proteólise, os quais encontram-se prejudicados durante o processo neurodegenerativo (Yen, 2011). A compreensão das alterações, regulação e efeito das vias de degradação pode trazer resultados interessantes, visando à degradação e prevenção da formação dos agregados como um possível alvo terapêutico.

5.2. Efeito da Bag-2 sobre a degradação de p-Tau

Os níveis de p-Tau diminuíram significativamente após a superexpressão da cochaperona Bag-2 nas células expostas às diferentes concentrações de rotenona após 48h de tratamento. É interessante observar que a Bag-2 promoveu um efeito tênue em 72h, o que sugere o auge de seu efeito combinado com a rotenona em 48h. Isso pode ser justificado por modificações tanto na superexpressão de Bag-2 exógena quanto na ação da rotenona no decorrer do tempo.

Os experimentos de 24 horas mostraram aumento da p-Tau e t-Tau na presença de Bag-2, o que deverá ser melhor investigado já que neste período a expressão da Bag-2 exógena não está em seu auge, bem como não há outros fatores a que a célula estivesse submetida. Já após o tratamento com rotenona há uma clara diminuição da p-Tau, evidenciando a resposta protetora da associação da Bag-2 com a rotenona.

A cochaperona Bag-2 é regulada pelo micro-RNA miR-128a. Carrettiero e colaboradores (2009), mostraram que o tratamento com miR-128a leva a uma diminuição do RNAm da Bag2 e que, conseqüentemente, leva a aumento das formas de Tau hiperfosforilada. Além disso, miR-128a parece estar superregulada na doença de Alzheimer e a diminuição nos níveis de Bag-2 conferiria um risco para neurodegeneração.

Em linhagem celular, utilizando modelo de agregados com aumento de Tau exógena e de Tau mutante, foi visto que a superexpressão da Bag-2 degradou p-Tau majoritariamente via sistema proteassomal, através da

subunidade 20S, pois após inibição do proteassoma com Lactacistina houve aumento nos níveis de p-Tau (Carrettiero *et al.*, 2009).

A Bag-2 tem se mostrado eficiente em degradar preferencialmente as formas hiperfosforiladas de Tau, desempenhando, portanto, um efeito neuroprotetor e interessante.

A expressão do RNAm para a Bag-2 mostrada nos presentes resultados confirma que a transfecção utilizando o vetor plasmideal aumentou os níveis gênicos de Bag-2 validando o modelo experimental de transfecção. Observou-se também que a rotenona parece não influenciar a expressão endógena e exógena de Bag-2.

Os resultados encontrados no experimento de prevenção dos agregados pela Bag-2 houve significativa redução nos níveis de p-Tau quando superexpressada 48h anterior ao início do tratamento com rotenona, em todas as concentrações. O interessante é que os níveis de p-Tau na presença de Bag-2 se equiparam aos do controle DMSO na ausência de Bag-2 exógena, sugerindo que o aumento intracelular de Bag-2 anterior ao início do estímulo de agregados de proteína, poderia prevenir o aumento de p-Tau pela rotenona.

Tanto na doença de Alzheimer quanto no modelo experimental utilizando rotenona há inibição proteassomal (Boveris e Navarro, 2008). A atividade proteassomal será avaliada no modelo em etapas futuras.

A Bag-2 é uma molécula moduladora da chaperona Hsp70 (Xu *et al.*, 2008), a qual, juntamente com a Hsp90 (Dou e Goldfarb, 2002) favorecerem

a ligação da proteína Tau aos microtúbulos, o que seria mais um fator que preveniria a agregação.

Outra ação da Bag-2 poderia ser de modulação do sistema lisossomal, uma vez que os sistemas de degradação celular podem interagir entre si, conforme já mencionado. Os experimentos realizados durante o estágio na Universidade da Carolina do Norte contemplam, em outro modelo experimental, as interações entre estes dois sistemas sob diferentes condições, o que será detalhado adiante.

5.3. Associação da Bag-2 com a expressão de Rab7 e Rab24

Os níveis proteicos de Rab7 após o tratamento com rotenona não apresentaram grandes alterações mesmo após o aumento de p-Tau observado anteriormente. A superexpressão da co-chaperona Bag2 parece inibir a Rab7 na presença de rotenona, o que pode levar ao prejuízo na degradação pela via autofágica, cujo destino final é o lisossomo, e uma das moléculas que mediará essa resposta é a Rab7.

Rab7 é uma molécula chave no tráfego endocítico entre o endossomo primário e o endossomo tardio, é essencial para a manutenção do lisossomo, estando diretamente envolvida no recrutamento, na fusão de vesículas e funcionamento do lisossomo (Press *et al.*, 1998; Bucci *et al.*, 2000).

O RNAm da Rab-7 não sofreu modificações significativas relacionadas com nenhuma das condições, seja após o tratamento com rotenona ou a influência da superexpressão da co-chaperona Bag-2

sugerindo que as modificações observadas são provavelmente pós traducionais.

Adicionalmente, a hiperfosforilação da proteína Tau parece interferir na ligação das proteínas motoras, prejudicando o transporte axonal (Tatebayashi *et al.*, 2004) e a entrega das vesículas pela Rab7 que é dependente do complexo motor dineína/dinactina, podendo então as variações de Tau interferem na expressão da Rab7 paralelamente ao efeito da Bag-2.

A disfunção da via endossomal é uma característica que aparece nos estágios iniciais das doenças neurodegenerativas. Os endossomos parecem estar mais vulneráveis e largos em algumas regiões cerebrais relacionadas com a doença de Alzheimer (Cataldo *et al.*, 1997; Nixon *et al.*, 2000). Apesar de nossos resultados não mostrarem alteração da Rab7, pacientes com doença de Alzheimer apresentam aumento na expressão desta Rab no hipocampo (Ginsberg *et al.*, 2010).

Estas GTPases têm papel relevante também no tráfego retrógrado de neurotrofinas e seus receptores, sendo estes fatores chaves na progressão da doença de Alzheimer (Bronfman *et al.*, 2007; Mufson *et al.*, 2007). A Rab7, especificamente, também controla o tráfego do receptor TrkA (Saxena *et al.*, 2005).

Os resultados observados para a Rab24 mostraram, após o tratamento com rotenona, um aumento considerável de seus níveis no período de pós-agregação e uma redução no período pré-agregado.

Parece que o recrutamento da Rab24 culmina com a ampla presença dos agregados proteicos, sendo coerente com o acionamento do mecanismo celular de degradação via complexo autofago-lisossomal, uma vez que esta GTPase está presente na formação dos autofagossomos, e sua interação com a Rab7 encaminha os conteúdos para o lisossomo. Maltese e colaboradores (2002) mostraram que a proteína Rab24 está co-localizada com a LC3-II, uma proteína marcadora da maturação dos autofagossomos também estudada neste projeto em cultura organotípica. Munafo e colaboradores (2002) também demonstraram que a Rab24 está amplamente presente em vacúolos autofágicos, além de sua disfunção ter sido identificada em indivíduos com doença de Alzheimer (Nixon, 2005).

A presença da co-chaperona Bag2, diminui os níveis de Rab24 no período pós-agregado. Por outro lado, há aumento nos níveis de Rab24 em células expostas a 0,5nM de rotenona na presença de Bag-2. Assim, os mecanismos de degradação da p-Tau podem variar entre proteassomo e lisossomo dependendo do estágio de agregação.

A superexpressão de Bag-2, sozinha, não altera os níveis proteicos de Rab-24. Os resultados para expressão gênica da Rab-24 indicam que essas variações são pós-traducionais.

Embora esse dado isolado não represente necessariamente o favorecimento da via lisossomal por Bag-2 um dado interessante é que a inibição do proteassomo, leva ao aumento nos níveis da Rab-24 (Egami *et al.*, 2005). Este dado é um indicativo de que estudar a interação entre Bag-2

e Rab-24, paralelamente à inibição do proteassomo pode ser interessante para o futuro.

De fato, alguns componentes que envolvem a degradação via lisossomo estão alterados na fase inicial e progressiva da doença de Alzheimer, como, por exemplo, as catepsinas (Mathews, Jiang, *et al.*, 2002) e a Rab7 (Ginsberg *et al.*, 2010), como já mencionado. Evidências mostram que alterações na via endocítica se iniciam antes mesmo das características claras da doença de Alzheimer (Cataldo *et al.*, 2000; Mathews, Guerra, *et al.*, 2002). No entanto, a associação das vias de degradação mediada pelas proteínas Bag-2, Rab7 e Rab24 ainda são alvo de investigação.

Para melhor compreensão da interrelação entre os sistemas de degradação, propôs-se o projeto em colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Ben A. Bahr, da Universidade da Carolina do Norte em que se utilizaram ativadores e inibidores de componentes destes sistemas.

5.4. Interrelação entre as rotas de degradação

O tratamento com o peptídeo A β induziu a uma tendência de aumento nos níveis de p-Tau, como já discutido anteriormente. Essa tendência no aumento de p-Tau veio acompanhada de uma redução de seus níveis após o tratamento com o ativador lisossomal PADK. Este resultado pode ser atribuído a um favorecimento da via lisossomal, uma vez que as doses utilizadas do PADK são eficientes em aumentar os níveis de catepsina B.

Quando avaliadas as respostas para a catepsina B após o tratamento com o PADK, foram encontradas respostas que corroboram tanto na análise

dos níveis de proteínas quanto para o ensaio de sua atividade. É importante destacar que independentemente de haver quaisquer condições adversas na célula, como, por exemplo, um estímulo estressor com o peptídeo A β que influenciou os níveis de Tau, o fato de aumentar os níveis de catepsina B foi suficiente para encontrar uma resposta benéfica.

A Catepsina B é uma importante protease na quebra do peptídeo amiloide e com funções neuroprotetoras (Mueller-Steiner *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2011), Butler e colaboradores (2011) mostraram uma relação de aumento de catepsina B promovida pela infusão de PADK sistemicamente, com a redução de A β 1-42 no encéfalo de camundongos modelo de doença de Alzheimer, além da diminuição na atividade da β -secretase, enzima que faz a clivagem de A β , que, no caso da doença de Alzheimer, parece estar alterada e ser um elemento responsável no aumento de β -amiloide.

Interessantemente, o PADK tem sido descrito por aumentar a eficiência do compartimento lisossomal, uma vez que ele aumenta a capacidade de degradação das proteínas patogênicas sem significativas alterações celulares, como, por exemplo, nas proteínas sinapsina II, GluR1 e beta actina (Bahr, 2009). A resposta inversa, ou seja, uma inibição, está em sinergia com os efeitos mencionados, como mostraram Lee e colaboradores (2013), que verificaram que a inibição da catepsina B levaria ao acúmulo de α -sinucleína, relacionado com a doença de Parkinson, afetando de maneira significativa a degradação de proteínas. Além disso, a deficiência nas catepsinas B e catepsina L levariam à axonopatia e perda neuronal subsequente (Felbor *et al.*, 2002).

Diferentemente do proteassoma, que depende do desdobramento das proteínas para passar no estreito poro catalítico, o sistema autofagolisossomal é capaz de degradar substratos como proteínas funcionais e mal dobradas, agregados e oligômeros. No entanto, diferentemente do sistema proteassomal, a degradação via lisossomo ocorre somente no corpo celular (Korolchuk, Menzies e Rubinsztein, 2010).

O sistema lisossomal degrada ainda as organelas celulares, como as mitocôndrias, os ribossomos e as subunidades proteassomais, dentre outros (Cuervo *et al.*, 1995). Este resultado provê a possibilidade de que o sistema autofagolisossomal poderia afetar a atividade proteassomal.

Os resultados após tratamento com PADK, A β , lactacistina e E64 mostraram não alterarem os marcadores de funcionalidade neuronal: GluR1 e sinapsina II, sendo este um resultado importante uma vez que os tratamentos propostos visavam estudar os mecanismos de alteração durante o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, com intuito de promover um estímulo estressor e não perturbações celulares irreversíveis.

As proteínas sinápticas são caracterizadas como marcadores de integridade de função, uma vez que distúrbios em sua expressão são observados em pacientes com demência, desordem cerebral progressiva e perda neuronal (Stokin *et al.*, 2005). Segundo Kanaan e colaboradores (2013), neurônios afetados na doença de Alzheimer seguem um padrão de degeneração em que anormalidades na função sináptica e na conectividade axonal precedem a morte das células somáticas. Além disso, também já foi demonstrado que perturbações lisossomais induzidas experimentalmente

promovem déficits na integridade sináptica (Bahr, Wisniewski e Butler, 2012).

A participação dos compartimentos de degradação, tanto na prevenção quanto no tratamento das desordens neurodegenerativas, está associada ao acúmulo de proteínas. Nossos resultados mostraram que, além de uma regulação positiva, como melhora do “*clearance*” lisossomal pelo aumento de Catepsina B, a interrelação entre os 2 sistemas de proteólise seria um ponto chave para se compreender os mecanismos fisiopatológicos durante o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas.

O ensaio do proteassomo após a utilização do PADK e do E64, componentes seletivos para o lisossomo, mostrou que, independentemente de haver uma ativação ou inibição do sistema lisossomal, a atividade do proteassomo não se altera. Uma revisão feita por Korolchuk e colaboradores (2010) postula ainda que uma inibição na autofagia possa inibir o sistema ubiquitina-proteassoma.

Em nossos resultados a combinação da lactacistina (inibidor proteassomal) com PADK (ativador lisossomal) ou o E64 (inibidor lisossomal) não promoveu alteração na atividade proteassomal, que estava reduzida pela lactacistina. Isso sugere que os moduladores lisossomais não influenciam a atividade do proteassomo. Por outro lado, a inibição proteassomal elevou os níveis de LC3II (marcador de atividade lisossomal).

Os resultados das amostras tratadas com o peptídeo A β mostraram que o efeito do peptídeo sobre a atividade do proteassoma (diminuição)

acontece somente após 6 dias de incubação, o que pode estar relacionado já à presença dos agregados proteicos. Por outro lado, o tratamento com PADK restaurou a atividade proteassomal na presença de A β .

A atividade da catepsina B aumentou depois da exposição a A β por 6 dias, assim como aumentaram os níveis de Rab-7. Aparentemente dentro desta proposta experimental a rota de degradação está sendo desviada para o sistema lisossomal. Estes dados ficam claros tanto quando analisamos a presença de A β como um fator de perturbação celular em adição à inibição proteassomal pela lactacistina.

Pacientes com doença de Alzheimer apresentam um aumento da catepsina B no plasma quando comparados com pacientes normais (Sundelof *et al.*, 2010). Em linhagem celular e em tecido cerebral após a exposição a A β também foram observados níveis elevados desta protease (Bendiske e Bahr, 2003; Mueller-Steiner *et al.*, 2006). Essas evidências mostram que o sistema lisossomal está responsivo às mudanças que ocorrem na célula perante o desenvolvimento da neurodegeneração.

Prejuízo no sistema ubiquitina proteassoma levaria a um aumento na função autofágica, sendo considerado como um mecanismo compensatório (Korolchuk, Menzies e Rubinsztein, 2010). Mais do que isso, uma superregulação do sistema de autofagia através da rapamicina preveniu a morte celular provocada pela disfunção do proteassomo (Pan *et al.*, 2008).

Uma das explicações propostas e revisada por Hoyer-Hansen e Jaattela (2007) é que a compensação do sistema lisossomal mediante aos

déficits encontrados na via ubiquitina-proteassoma seria uma resposta ao estresse do retículo endoplasmático.

A combinação da solução de pré-agregado com o componente PADK levou a uma resposta protetora do PADK, já que a lactacistina, por si só, leva a uma redução drástica na atividade proteassomal que culmina em prejuízos para a célula.

A participação dos compartimentos de degradação para equilíbrio da síntese e degradação de proteínas pode ser uma peça chave no âmbito das doenças neurodegenerativas, uma vez que estas compartilham um aspecto comum, o acúmulo proteico patogênico.

A manutenção nos níveis de Tau pelos sistemas de degradação mostra-se ser determinante para a prevenção da formação dos agregados e para a homeostase celular. Sendo assim, não só a funcionalidade dos sistemas de proteólise como a inter-relação entre eles levaria a compreensão acerca do desenvolvimento das patologias associadas ao acúmulo de proteínas seria causado por uma deficiência primária em um dos sistemas de degradação, podendo levar a importantes mudanças, sendo elas de ordem primária ou secundária na outra via.

Em conclusão, com base nos resultados apresentados, sugere-se que a interrelação entre os sistemas de degradação seja importante para a degradação de agregados de proteínas, cada qual em momentos distintos. A análise das rotas de degradação contribui no âmbito das doenças neurodegenerativas e as colocam como alvos terapêuticos interessantes.

6. Conclusões

- Os modelos utilizados são interessantes para o estudo das vias de degradação celular e inclusão protéica, pois mimetizam as alterações encontradas nas doenças neurodegenerativas.
- A superexpressão da cochaperona Bag-2 foi eficiente na prevenção e degradação da proteína p-Tau, após a indução de agregados de proteína através do tratamento com rotenona.
- A Rab7 parece ser parcialmente inibida na presença da superexpressão de Bag2, sugerindo menor ativação lisossomal antes da formação dos agregados na presença de Bag-2.
- A Rab24 tem seus níveis diminuídos no período pré-agregado e aumentados no período pós-agregado após a indução de agregados pelo tratamento com rotenona, e a superexpressão de Bag-2 parece favorecer a via proteassomal antes da formação dos agregados e a via lisossomal após estabelecidos os agregados proteicos.
- A ativação lisossomal foi eficaz em diminuir os níveis de p-Tau.
- A inibição no proteassoma levou a um efeito compensatório pelo lisossomo, mas os moduladores lisossomais não interferiram na atividade proteassomal.
- Os sistemas de degradação atuam em períodos distintos durante a agregação proteica.

7. Referências Bibliográficas

AGHOLME, L. et al. Amyloid-beta secretion, generation, and lysosomal sequestration in response to proteasome inhibition: involvement of autophagy. **J Alzheimers Dis**, v. 31, n. 2, p. 343-58, 2012.

ALTMAN, J.; BAYER, S. A. **Atlas of prenatal rat brain development**. CRC Press, 1995. 664.

Alzheimer's Association. Facts and Figures 2007.

Alzheimer's Association. Facts and Figures 2012.

Alzheimer's disease international. World Alzheimer Report 2009.

ARNDT, V. et al. BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 12, p. 5891-900, 2005.

BABBITT, S. E. et al. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. **Cell**, v. 121, n. 4, p. 553-65, 2005.

BAHR, B. A. Lysosomal modulatory drugs for a broad strategy against protein accumulation disorders. **Curr Alzheimer Res**, v. 6, n. 5, p. 438-45, 2009.

BAHR, B. A. et al. Amyloid beta protein is internalized selectively by hippocampal field CA1 and causes neurons to accumulate amyloidogenic carboxyterminal fragments of the amyloid precursor protein. **J Comp Neurol**, v. 397, n. 1, p. 139-47, 1998.

BAHR, B. A.; WISNIEWSKI, M. L.; BUTLER, D. Positive lysosomal modulation as a unique strategy to treat age-related protein accumulation diseases. **Rejuvenation Res**, v. 15, n. 2, p. 189-97, 2012.

BARGHORN, S. et al. Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. **Biochemistry**, v. 39, n. 38, p. 11714-21, 2000.

BENCE, N. F.; SAMPAT, R. M.; KOPITO, R. R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. **Science**, v. 292, n. 5521, p. 1552-5, 2001.

BENDISKE, J.; BAHR, B. A. Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis - an approach for slowing Alzheimer disease? **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 5, p. 451-63, 2003.

BENDISKE, J. et al. Intracellular deposition, microtubule destabilization, and transport failure: an "early" pathogenic cascade leading to synaptic decline. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 61, n. 7, p. 640-50, 2002.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. **IUBMB Life**, v. 60, n. 5, p. 308-14, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRONFMAN, F. C. et al. Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. **Dev Neurobiol**, v. 67, n. 9, p. 1183-203, 2007.

BUCCI, C. et al. Rab7: a key to lysosome biogenesis. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 2, p. 467-80, 2000.

BUEE, L. et al. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 33, n. 1, p. 95-130, 2000.

BUTLER, D. et al. Protective effects of positive lysosomal modulation in Alzheimer's disease transgenic mouse models. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20501, 2011.

CARRETTIERO, D. C. et al. The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament- insoluble tau from the microtubule. **J Neurosci**, v. 29, n. 7, p. 2151-61, 2009.

CARTELLI, D. et al. Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺ -induced neurodegeneration. **J Neurochem**, v. 115, n. 1, p. 247-58, 2010.

CATALDO, A. M. et al. Abnormalities of the endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease: relationship to disease pathogenesis. **Adv Exp Med Biol**, v. 389, p. 271-80, 1996.

CATALDO, A. M. et al. Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 370-84, 2008.

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

CHABRIER, M. A. et al. Soluble abeta promotes wild-type tau pathology in vivo. **J Neurosci**, v. 32, n. 48, p. 17345-50, 2012.

CHAVES, R. S. et al. Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. **BMC Neurosci**, v. 11, p. 144, 2010.

CHESSER, A. S.; PRITCHARD, S. M.; JOHNSON, G. V. Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. **Front Neurol**, v. 4, p. 122, 2013.

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

CIPRIANI, G. et al. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurol Sci**, v. 32, n. 2, p. 275-9, 2011.

CLAGUE, M. J.; URBE, S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 682-5, 2010.

CUERVO, A. M. et al. Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. **Eur J Biochem**, v. 227, n. 3, p. 792-800, 1995.

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

DE KIMPE, L. et al. Intracellular accumulation of aggregated pyroglutamate amyloid beta: convergence of aging and Abeta pathology at the lysosome. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 3, p. 673-87, 2013.

DE VRIJ, F. M. et al. Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. **Prog Neurobiol**, v. 74, n. 5, p. 249-70, 2004.

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

DEINHARDT, K. et al. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. **Neuron**, v. 52, n. 2, p. 293-305, 2006.

DELOBEL, P. et al. Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. **FEBS Lett**, v. 579, n. 1, p. 1-5, 2005.

DERMAUT, B. et al. Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in Drosophila benchwarmer. **J Cell Biol**, v. 170, n. 1, p. 127-39, 2005.

- DIKIC, I.; JOHANSEN, T.; KIRKIN, V. Selective autophagy in cancer development and therapy. **Cancer Res**, v. 70, n. 9, p. 3431-4, 2010.
- DITARANTO, K.; TEKIRIAN, T. L.; YANG, A. J. Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 8, n. 1, p. 19-31, 2001.
- DIXIT, R. et al. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1086-9, 2008.
- DOU, Q. P.; GOLDFARB, R. H. Bortezomib (millennium pharmaceuticals). **IDrugs**, v. 5, n. 8, p. 828-34, 2002.
- DUKES, A. A.; KORWEK, K. M.; HASTINGS, T. G. The effect of endogenous dopamine in rotenone-induced toxicity in PC12 cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 630-8, 2005.
- EGAMI, Y. et al. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 337, n. 4, p. 1206-13, 2005.
- ELLIOTT, E.; TSVETKOV, P.; GINZBURG, I. BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. **J Biol Chem**, v. 282, n. 51, p. 37276-84, 2007.
- FELBOR, U. et al. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 7883-8, 2002.
- FENG, Y. et al. Expression and properties of Rab7 in endosome function. **Methods Enzymol**, v. 329, p. 175-87, 2001.
- FENTEANY, G. et al. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 726-31, 1995.
- FORTUN, J. et al. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. **J Neurosci**, v. 23, n. 33, p. 10672-80, 2003.
- FULGA, T. A. et al. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 139-48, 2007.
- GACZYNSKA, M.; OSMULSKI, P. A. Characterization of noncompetitive regulators of proteasome activity. **Methods Enzymol**, v. 398, p. 425-38, 2005.

GESCHWIND, D. H. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? **Neuron**, v. 40, n. 3, p. 457-60, 2003.

GIBB, W. R.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 745-52, 1988.

GINSBERG, S. D. et al. Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 22, n. 2, p. 631-9, 2010.

GLABE, C. G. Structural classification of toxic amyloid oligomers. **J Biol Chem**, v. 283, n. 44, p. 29639-43, 2008.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOEDERT, M. et al. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. **J Neurochem**, v. 65, n. 6, p. 2804-7, 1995.

GOEDERT, M. et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. **EMBO J**, v. 8, n. 2, p. 393-9, 1989.

GONG, C. X.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. **Neuroscience**, v. 61, n. 4, p. 765-72, 1994.

_____. Targeting tau protein in Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v. 27, n. 5, p. 351-65, 2010.

GONG, C. X. et al. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. **J Neurochem**, v. 61, n. 3, p. 921-7, 1993.

GOTZ, J. et al. Dissecting toxicity of tau and beta-amyloid. **Neurodegener Dis**, v. 7, n. 1-3, p. 10-2, 2010.

GRAEBER, M. B. et al. Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. **Neurogenetics**, v. 1, n. 3, p. 223-8, 1998.

GUTIERREZ, M. G. et al. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 13, p. 2687-97, 2004.

HAASS, C. et al. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. **Nature**, v. 357, n. 6378, p. 500-3, 1992.

HAASS, N. K. et al. The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 1, p. 230-9, 2008.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, 2002.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; NITRINI, R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo, Brazil. . **Rev Psiquiatr Clin**, v. 25, p. 70-73, 1998.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 519-26, 1998.

HONGO, H. et al. Glycogen synthase kinase-3beta activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule destabilization. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 426, n. 1, p. 94-9, 2012.

HOYER-HANSEN, M.; JAATTELA, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1576-82, 2007.

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

JIN, M. et al. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 14, p. 5819-24, 2011.

JORDENS, I. et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. **Curr Biol**, v. 11, n. 21, p. 1680-5, 2001.

JOURNET, A. et al. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 1026-40, 2002.

JUNG, J. E. et al. Functional ubiquitin conjugates with lysine-epsilon-amino-specific linkage by thioether ligation of cysteinyl-ubiquitin peptide building blocks. **Bioconjug Chem**, v. 20, n. 6, p. 1152-62, 2009.

- KANAAN, N. M. et al. Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. **Exp Neurol**, v. 246, p. 44-53, 2013.
- KHATOON, S.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. **FEBS Lett**, v. 351, n. 1, p. 80-4, 1994.
- KIRCHER, T.; WORMSTALL, H. Origin of Alois Alzheimer's interest in neurohistology. **Am J Psychiatry**, v. 153, n. 10, p. 1369-70, 1996.
- KIVELL, B. M.; MCDONALD, F. J.; MILLER, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 6, n. 3, p. 91-9, 2001.
- KOPKE, E. et al. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. **J Biol Chem**, v. 268, n. 32, p. 24374-84, 1993.
- KOROLCHUK, V. I. et al. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. **Mol Cell**, v. 33, n. 4, p. 517-27, 2009.
- KOROLCHUK, V. I.; MENZIES, F. M.; RUBINSZTEIN, D. C. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1393-8, 2010.
- LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 499-509, 2007.
- LAI, Y. et al. Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, n. 3, p. 540-50, 2008.
- LASAGNA-REEVES, C. A. et al. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. **Sci Rep**, v. 2, p. 700, 2012.
- LEE, J. A.; GAO, F. B. Neuronal Functions of ESCRTs. **Exp Neurobiol**, v. 21, n. 1, p. 9-15, 2012.
- LEE, M. J.; LEE, J. H.; RUBINSZTEIN, D. C. Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. **Prog Neurobiol**, v. 105, p. 49-59, 2013.

LESORT, M.; JOHNSON, G. V. Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. **Neuroscience**, v. 99, n. 2, p. 305-16, 2000.

LESORT, M.; JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. **J Neurochem**, v. 72, n. 2, p. 576-84, 1999.

LIM, A.; KRAUT, R. The Drosophila BEACH family protein, blue cheese, links lysosomal axon transport with motor neuron degeneration. **J Neurosci**, v. 29, n. 4, p. 951-63, 2009.

LIU, F. et al. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 1790-6, 2005.

LORING, J. F. et al. A gene expression profile of Alzheimer's disease. **DNA Cell Biol**, v. 20, n. 11, p. 683-95, 2001.

LUZIO, J. P.; BRIGHT, N. A.; PRYOR, P. R. The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1088-91, 2007.

MA, Q. L. et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. **J Neurosci**, v. 29, n. 28, p. 9078-89, 2009.

MAH, V. H. et al. In situ hybridization of calcium/calmodulin dependent protein kinase II and tau mRNAs; species differences and relative preservation in Alzheimer's disease. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 12, n. 1-3, p. 85-94, 1992.

MALTESE, W. A. et al. Mutant Rab24 GTPase is targeted to nuclear inclusions. **BMC Cell Biol**, v. 3, p. 25, 2002.

MANDELKOW, E. M. et al. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 8, p. 1079-85, 2003.

MARTIN, L. J. 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**, v. 18, n. 2, p. 115-36, 2007.

MATHEWS, P. M. et al. Alzheimer's disease-related overexpression of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor increases Abeta secretion: role for altered lysosomal hydrolase distribution in beta-amyloidogenesis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 5299-307, 2002.

- MATHEWS, P. M. et al. Calpain activity regulates the cell surface distribution of amyloid precursor protein. Inhibition of calpains enhances endosomal generation of beta-cleaved C-terminal APP fragments. **J Biol Chem**, v. 277, n. 39, p. 36415-24, 2002.
- MAYER, R. J. et al. Ubiquitin and dementia. **Nature**, v. 340, n. 6230, p. 193, 1989.
- MELO, T. Q. et al. Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to neurodegenerative diseases. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 3, p. 327-35, 2013.
- MERKER, K.; GRUNE, T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. **Exp Gerontol**, v. 35, n. 6-7, p. 779-86, 2000.
- MESKE, V.; ALBERT, F.; OHM, T. G. Coupling of mammalian target of rapamycin with phosphoinositide 3-kinase signaling pathway regulates protein phosphatase 2A- and glycogen synthase kinase-3 -dependent phosphorylation of Tau. **J Biol Chem**, v. 283, n. 1, p. 100-9, 2008.
- MILLER, Y.; MA, B.; NUSSINOV, R. Synergistic interactions between repeats in tau protein and Abeta amyloids may be responsible for accelerated aggregation via polymorphic states. **Biochemistry**, v. 50, n. 23, p. 5172-81, 2011.
- MUELLER-STEINER, S. et al. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 703-14, 2006.
- MUFSON, E. J. et al. Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. **Curr Alzheimer Res**, v. 4, n. 4, p. 340-50, 2007.
- MUNAFO, D. B.; COLOMBO, M. I. Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. **Traffic**, v. 3, n. 7, p. 472-82, 2002.
- NIXON, R. A. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 3, p. 373-82, 2005.
- NIXON, R. A.; YANG, D. S.; LEE, J. H. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 590-9, 2008.

OLKKONEN, V. M. et al. Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. **J Cell Sci**, v. 106 (Pt 4), p. 1249-61, 1993.

OTT, A. et al. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1392-7, 1996.

PAN, T. et al. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. **Neurobiol Dis**, v. 32, n. 1, p. 16-25, 2008.

PETRUCCELLI, G. A. et al. TS-FF-AAS and multivariate calibration: A proposition for sewage sludge slurry sample analyses. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 620-6, 2007.

POPPEK, D. et al. Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. **Biochem J**, v. 400, n. 3, p. 511-20, 2006.

PRESS, B. et al. Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. **J Cell Biol**, v. 140, n. 5, p. 1075-89, 1998.

RAPOPORT, M. et al. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6364-9, 2002.

RAVIKUMAR, B.; SARKAR, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Clearance of mutant aggregate-prone proteins by autophagy. **Methods Mol Biol**, v. 445, p. 195-211, 2008.

RHEIN, V. et al. Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 47, p. 20057-62, 2009.

ROBERSON, E. D. et al. Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 31, n. 2, p. 700-11, 2011.

ROBERSON, E. D. et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. **Science**, v. 316, n. 5825, p. 750-4, 2007.

ROYCHAUDHURI, R. et al. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. **J Biol Chem**, v. 284, n. 8, p. 4749-53, 2009.

SARDIELLO, M.; BALLABIO, A. Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs. **Cell Cycle**, v. 8, n. 24, p. 4021-2, 2009.

SARDIELLO, M. et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. **Science**, v. 325, n. 5939, p. 473-7, 2009.

SASAKI, N. et al. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. **Brain Res**, v. 888, n. 2, p. 256-262, 2001.

SAXENA, S. et al. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. **J Neurosci**, v. 25, n. 47, p. 10930-40, 2005.

SCHEPER, W. et al. Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 33, n. 5, p. 523-32, 2007.

SCHMIDT, W. J.; ALAM, M. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). **J Neural Transm Suppl**, n. 70, p. 273-6, 2006.

SCHUBERT, D.; SOUCEK, T.; BLOUW, B. The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 7, p. 1323-34, 2009.

SEKI, Y. et al. Degenerative and protective reactions of the rat trigeminal motor nucleus after removal of the masseter and temporal muscles. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 10, p. 777-84, 2009.

SELKOE, D. J. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. **Annu Rev Neurosci**, v. 12, p. 463-90, 1989.

SHERER, T. B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 23, n. 34, p. 10756-64, 2003.

SHIPTON, O. A. et al. Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. **J Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 1688-92, 2011.

SOTO, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 1, p. 49-60, 2003.

STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 8, p. 513-25, 2009.

STOKIN, G. B. et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1282-8, 2005.

SUNDELOF, J. et al. Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls. **J Alzheimers Dis**, v. 22, n. 4, p. 1223-30, 2010.

TANAHASHI, N. et al. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14336-45, 2000.

TATEBAYASHI, Y. et al. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 9, p. 1653-63, 2004.

TERWEL, D. et al. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. **Am J Pathol**, v. 172, n. 3, p. 786-98, 2008.

TOKUTAKE, T. et al. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 287, n. 42, p. 35222-33, 2012.

TUXWORTH, R. I.; TITUS, M. A. Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. **Traffic**, v. 1, n. 1, p. 11-8, 2000.

United Nations. World Population Ageing 2009.

VALE, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 467-80, 2003.

VERHOEVEN, K. et al. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. **Am J Hum Genet**, v. 72, n. 3, p. 722-7, 2003.

VOGELSBERG-RAGAGLIA, V. et al. PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. **Exp Neurol**, v. 168, n. 2, p. 402-12, 2001.

VON BERGEN, M. et al. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. **J Biol Chem**, v. 276, n. 51, p. 48165-74, 2001.

WARD, S. M. et al. Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 4, p. 667-71, 2012.

WONG, E. S. et al. Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 16, p. 2570-82, 2008.

WOOTEN, M. W. et al. Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. **J Biol Chem**, v. 283, n. 11, p. 6783-9, 2008.

XU, Z. et al. Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the Hsp70 cochaperone Bag2. **Nat Struct Mol Biol**, v. 15, n. 12, p. 1309-17, 2008.

YEN, S. S. Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer's disease. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 4, p. 385-402, 2011.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

ZEMPEL, H. et al. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. **J Neurosci**, v. 30, n. 36, p. 11938-50, 2010.

ZHENG, J. et al. Involvement of lysosomes in the early stages of axon degeneration. **Neurochem Int**, v. 56, n. 3, p. 516-21, 2010.

ZHU, G. D. et al. SPE-39 family proteins interact with the HOPS complex and function in lysosomal delivery. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 4, p. 1223-40, 2009.

8. Anexos

8.1. Aprovação do comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.08.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **168/10** intitulado: **"ESTUDO DA DEGENERAÇÃO DA PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA POR VIAS INDEPENDENTES DO PROTEOSSOMA, EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEURODEGENERAÇÃO"** e seus anexos, **que utilizará 200 rattus norvegicus, linhagem de Lewis**, apresentado pelo Programa de Fisiopatologia Experimental.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Merari F.R. Ferrari

Pesquisador (a) Executante : Karen L.G. Farizatto

CEP-FMUSP, 18 de agosto de 2010.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8.2. Aprovação do comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEUA/IB/039/2011
Ref. 2011.1.756.41.8

São Paulo, 10 de agosto 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 no dia 08/08/2011, **APROVOU** o Projeto “Estudo da degradação da proteína TAU Hiperfosforilada por vias independentes do proteassoma, em modelo experimental de neurodegeneração” – **Protocolo 136/2011**, de sua responsabilidade.

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.