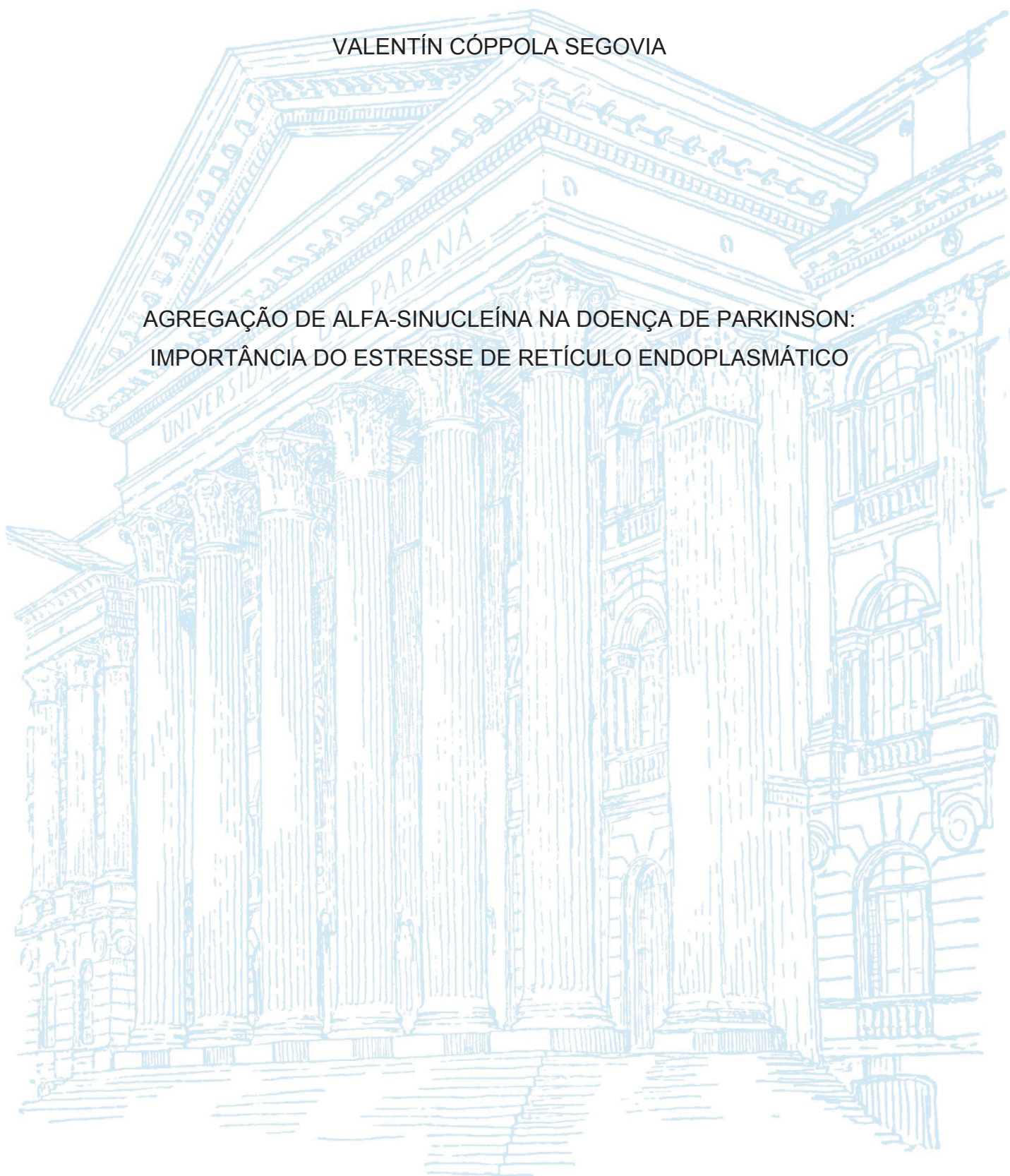


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALENTÍN CÓPPOLA SEGOVIA

AGREGAÇÃO DE ALFA-SINUCLÉINA NA DOENÇA DE PARKINSON:  
IMPORTÂNCIA DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO



CURITIBA

2018

VALENTÍN CÓPPOLA SEGOVIA

AGREGAÇÃO DE ALFA -SINUCLÉINA NA DOENÇA DE PARKINSON:  
IMPORTÂNCIA DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção de título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Cóppola-Segovia, Valentín

Agregação de alfa-Sinucleína na Doença de Parkinson: importância do estresse de retículo endoplasmático. / Valentín Cópola Segovia. – Curitiba, 2018.

85 p.: il.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Estresse do retículo endoplasmático 2. Tunicamicina 3. Alfa-Sinucleína 4. Sistema nervoso – Degeneração I. Título II. Zanata, Silvio Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.833



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VALENTIN COPPOLA SEGOVIA** intitulada: **AGREGAÇÃO DE ALFA-SINUCLEINA NA DOENÇA DE PARKINSON: IMPORTÂNCIA DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Outubro de 2018.

SILVIO MARQUES ZANATA  
Presidente da Banca Examinadora

FLAVIA REGINA DE SOUZA LIMA  
Avaliador Externo

NILSON IVO TONIN ZANCHIN  
Avaliador Interno

CLAUDIO DA CUNHA  
Avaliador Externo

TÁRCIO TEODORO BRAGA  
Avaliador Externo

## AGRADECIMENTOS

- *Ao povo brasileiro, CAPES e CNPq que fizeram possível realizar este trabalho.*
- *PPG em Biologia Celular e Molecular e a Universidade Federal do Paraná.*
- *Aos professores Flávia Lima, Cláudio da Cunha, Tércio Braga e Nilson Zanchin por aceitarem o convite para a avaliação deste trabalho.*
- *Aos chefes do laboratório de Neurobiologia, Silvio, Lia e Adriana por terem me dado o espaço para trabalhar no laboratório deles, e disponibilizar todo o material possível para fazer este trabalho.*
- *Ao pessoal do biotério que, sempre que foi possível, simplificou o trabalho para desenvolver esse projeto.*
- *Aos colegas que acreditaram e aceitaram fazer parte deste projeto: Evellyn, Eric, Juliano, Fernanda, Karime, Clarissa e Flavia.*
- *À Esther, Rubén, Lluís, Maurizio, Júlia, Neus, Diana, Vero, Helena, Mireia, María, Letícia, Anna, Pau, Noemí, Analía e Paco, por terem feito dos 6 meses de doutorado sanduíche em Barcelona uma experiência incrível a nível pessoal e profissional.*
- *Ao Professor Marcelo Lima e à Professora Maria Vital que contribuíram muito na minha formação como profissional.*
- *Eric, Meyra e Taysa que além de me facilitar o acesso ao espaço físico, também colaboraram com o as operações feitas para completar esse trabalho, é com eles que realmente aprendi a fazer operações.*
- *Colegas/amigos(as) do laboratório: Evellyn, Karime, Soraia, Silvia, Ingrid, Pierina, Sze, Juliano, Ricardo, Natalia, Juliana, Tassiana, Sabrina, Gustavo, Gissele, Giovana, por fazer o melhor ambiente de trabalho que alguém pode pedir... e logicamente pela paciência e por aguentar minhas loucuras todos os dias.*
- *Ao Professor Silvio Zanata pela orientação, por me dar a liberdade para conseguir fazer esse trabalho e pela confiança depositada em mim. Sem dúvidas ele é um dos principais responsáveis pelo meu crescimento como pesquisador.*

- *Minha Família, que mesmo estando longe e fazendo falta, igualmente dá força o tempo todo para continuar este caminho. Sem dúvidas esse logro é tanto deles quanto meu.*
- *Aos que de alguma forma me acompanharam nesse trajeto...*

*A todos eles, meu mais sincero agradecimento!*

*“... lo imposible cuesta un poco más, y derrotados sólo son los que bajan los brazos y se entregan”  
Don José “Pepe” Mujica (Ex-Presidente de Uruguay).*

*“O camino é a recompensa”  
Frase Budista.*

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos da *Substância Nigra* (SN) *pars compacta*, levando à concomitante redução de dopamina liberada no Corpo Estriado (CE), verdadeiro causador da rigidez, bradicinesia e tremor, principais anormalidades clínicas que caracterizam esta doença. Embora a etiologia desta doença seja desconhecida, a oligomerização/agregação da proteína  $\alpha$ -sinucleína desempenha um papel central na patogênese e desenvolvimento do Parkinsonismo, sendo associado ao estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático (RE), e disfunção da degradação proteica. No presente trabalho, animais injetados intranigralmente com Tunicamicina (TM) ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA) apresentaram uma redução no número de células imunomarcadas com Tirosina Hidroxilasa (TH), assim como um aumento na reatividade glial. Ambos modelos também apresentaram aumento de expressão de chaperonas do RE, demonstrando assim que ambos tratamentos induzem o estresse de RE. Quando analisados os níveis de expressão de  $\alpha$ -sinucleína monomérica, nossos dados indicaram que não existem diferenças na expressão desta proteína entre os grupos. No entanto, nossos resultados demonstraram que só o estresse de RE induzido pela TM é suficiente para a formação de agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína endógena em animais sem nenhum tipo de manipulação genética. Quando avaliadas as modificações pós-traducionais (MPT) associadas com agregação proteica, unicamente no modelo da TM, encontramos um aumento de fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína no resíduo de serina 129 (S129), aumento de carbonilação de proteínas totais e de  $\alpha$ -sinucleína na SN e no CE, mas não foram encontradas diferenças nos níveis de nitração de proteínas totais nem de  $\alpha$ -sinucleína tanto na SN quanto no CE. Desta maneira, concluímos que o estresse de RE induzido por TM foi capaz de induzir a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína assim como a fosforilação da S129 e carbonilação da  $\alpha$ -sinucleína, MPT associadas com sua agregação.

**Palavras chave:** Estresse de Retículo Endoplasmático, Tunicamicina,  $\alpha$ -sinucleína, neurodegeneração, agregação de proteínas, Modificações Pós-Traducionais

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive death of dopaminergic neurons of the Substantia Nigra (SN) *pars compacta*, leading to the concomitant reduction in dopamine released into the Striatum (CE), which causes stiffness, bradykinesia and tremor, major clinical abnormalities that characterize this disease. Although the etiology of this disease is unknown, oligomerization/aggregation of  $\alpha$ -synuclein play a central role in the pathogenesis and development of Parkinsonism, being associated with oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, and dysfunction of protein degradation. In the present study, animals injected intranigally with Tunicamycin (TM) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) showed a reduction in the number of Tyrosine Hydroxylase (TH) positive cells, as well as an increase in glial reactivity. Both models also showed increased expression of ER resident chaperones, thus demonstrating that both treatments induced ER-stress. When analyzed the monomeric  $\alpha$ -synuclein expression levels, our data indicated that there are no differences in expression of this protein between groups. However, our results demonstrated that only ER-stress induced by TM induced the aggregation of endogenous  $\alpha$ -synuclein protein aggregates in animals without any genetic manipulation. When evaluating the post-translational modifications (PTM) associated with protein aggregation, only in the TM model, we found an increase in  $\alpha$ -synuclein phosphorylation at the serine residue 129 (S129), increased carbonylation of total proteins and  $\alpha$ -synuclein in SN and Striatum, but no differences were found in total protein nitration levels or  $\alpha$ -synuclein in both SN and Striatum. Thus, we conclude that TM-induced ER stress was able to induce the formation of  $\alpha$ -synuclein rich protein aggregates as well as phosphorylation of S129 and carbonylation of  $\alpha$ -synuclein, PTM associated with its aggregation.

**Key words:** Endoplasmic Reticulum Stress, Tunicamycin,  $\alpha$ -synuclein, neurodegeneration, protein aggregation, Post-Translational Modifications

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxi dopamina
AMM	Alta Massa Molecular
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CE	Corpo Estriado
DA	Doença De Alzheimer
DAPI	dihidrocloreto de 4',6-Diamida-2'-fenilindol
DH	Doença de Huntington
DNPH	2,4-Di-Nitrofenilhidrazina
DP	Doença de Parkinson
DTT	Ditiotreitol
ECL	Eletroquimioluminescência
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPDA	<i>European Parkinson's Disease Association</i>
ERAD	Degradação associada ao Reticulo Endoplasmático
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
HRP	Peroxidase de Rábano Silvestre
MPT	Modificações Pós-traducionais
NAC	Componente no amiloide
NPF	<i>National Parkinson Foundation</i>
p-S129- $\alpha$ -sinucleína	$\alpha$ -sinucleína fosforilada no residuo Serina 129
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDF	<i>Parkinson Disease Foundation</i>
RE	Reticulo Endoplasmático
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SN	Substancia Nigra
SNpc	Substancia Nigra <i>pars compacta</i>
TBS	Tampão Tris Salino
TH	Tirosina Hidroxilase
TM	Tunicamicina
TMB	3,3', 5,5'-TetraMetilBenzidina
TUDCA	Ácido TauroUrso DeoxiCólico
TX-100	Tritón X-100
UPR	Resposta às Proteínas mal Dobradas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico dos componentes motores dos núcleos da base..	20
Figura 2. Esquema representativo das principais vias regulatórias do estresse de RE.....	22
Figura 3. TM induz a formação intracitoplasmática de agregados proteicos ricos em $\alpha$ -sinucleína.....	51
Figura 4. O estresse de RE induzido por TM aumenta os níveis de fosforilação na S129 da $\alpha$ -sinucleína na SN.....	53
Figura 5. O estresse de RE induzido por TM na SN aumenta os níveis de fosforilação na S129 da $\alpha$ -sinucleína no CE.....	54
Figura 6.- O estresse de RE induzido por TM aumenta os níveis de carbonilas em proteínas totais em SN.....	55
Figura 7.- O estresse de RE induzido por TM na SN aumenta os níveis de carbonilas em proteínas totais no CE.....	56
Figura 8.- Aumento nos níveis de carbonilação de $\alpha$ -sinucleína em SN induzido por TM.....	57
Figura 9.- Aumento nos níveis de carbonilação de $\alpha$ -sinucleína em CE.....	58
Figura 10.-TM aumenta os níveis de nitrotirosina em proteínas totais em SN e CE.....	59
Figura 11.- TM não modifica os níveis de nitrotirosina em $\alpha$ -sinucleína em SN e CE.....	61

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Neurodegeneração.....	12
1.2. Doença de Parkinson .....	13
1.3. $\alpha$ -sinucleína.....	18
1.4. Retículo endoplasmático e dobramento de proteínas.....	20
1.5. Agregação de proteínas, modificações post-traducional e neurodegeneração .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1. Objetivo Geral .....	26
2.2. Objetivos Específicos .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Cirurgia esterotáxica.....	27
3.2. Obtenção de amostras biológicas .....	27
3.3. Obtenção do encéfalo para análise por imunohistoquímica.....	27
3.4. Obtenção de amostras para western blot e ELISA.....	30
3.5. Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford.....	30
3.6. Dosagem de proteínas pelo método do BCA.....	30
3.7. Análise da fosforilação na serina 129 da $\alpha$ -sinucleína.....	31
3.8. Dosagem de proteínas carboniladas.....	32
3.9. Análise de carbonilação de $\alpha$ -sinucleína.....	33
3.10. Análise de nitração proteica – Dot blot.....	34
3.11. Análise de nitração de $\alpha$ -sinucleína.....	34
3.12. Extração de agregados proteicos de $\alpha$ -sinucleína.....	35
3.13. Western blot.....	35
3.13.1. Western blot I - Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida... 36	
3.13.2. Western blot II - Transferência para Membranas de Nitrocelulose..... 37	
3.13.3. Western blot III - Bloqueio da membrana e incubação com anticorpos37	
3.13.4. Western blot IV -Detecção.....	38
3.14. Análise estatística.....	39

<b>4. RESULTADOS</b> .....	40
4.1. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DO MODELO.....	41
4.2. CAPITULO II- AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS- TRADUCIONAIS ASSOCIADAS À AGREGAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLÉINA.....	50
4.2.1. Avaliação da agregação de $\alpha$ -sinucleína.....	51
4.2.2. Modificações Pós-Traducionais.....	52
4.2.2.1. Fosforilação de $\alpha$ -sinucleína .....	52
4.2.2.2. Carbonilação .....	54
4.2.2.3. Nitração .....	59
<b>5. DISCUSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas são um grupo heterogêneo e complexo de doenças, de diversas etiologias, mas com manifestações clínicas que se sobrepõem. A fisiopatologia subjacente comum de todas as doenças neurodegenerativas é a disfunção e morte dos neurônios no cérebro e/ou medula espinal, associadas com o envelhecimento, levando em última instância a problemas motores, cognitivos e/ou demência. Segundo reportes das Nações Unidas (WHO, [http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf)), nos próximos 35 anos, a população mundial maior de 60 anos atingirá aproximadamente 2.1 bilhões de pessoas (mais do que o dobro de hoje em dia). Considerando que o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas é o envelhecimento, doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), Parkinson (DP), Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) representaram um problema emergente para a saúde pública a nível mundial nas próximas décadas. As doenças neurodegenerativas são doenças crônicas de progressão lenta, caracterizadas pela morte progressiva de neurônios do sistema nervoso central ou periférico, afetando funções motoras e cognitivas, acompanhadas de mudanças comportamentais e no funcionamento do organismo. De patogênese amplamente desconhecida, as doenças neurodegenerativas apresentam fatores genéticos e ambientais que contribuem para a sua origem e desenvolvimento (FORMAN et al., 2005). Embora sejam um grupo heterogêneo, a morte dos neurônios, reativação glial, ativação de um processo neuro-inflamatório e agregação de proteínas são algumas das características em comum que reúnem diferentes doenças dentro do grupo de doenças neurodegenerativas. A maioria das doenças neurodegenerativas são caracterizadas pelo acúmulo de agregados proteicos, os quais interferem com os processos celulares normais. A morte neuronal em doenças neurodegenerativas associadas a formas

familiares ou esporádicas é acompanhada do mal dobramento e agregação de proteínas (BERKE, PAULSON, 2003; SELKEO, 2003).

## 1.2 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença de progressão crônica, considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois da doença de Alzheimer, afetando 1-2% da população maior de 65 anos, e 4-5% acima de 85 anos, segundo dados da EPDA, NPF, PDF (*European Parkinson's Disease Association – National Parkinson Foundation – Parkinson Disease Foundation*), estimando-se que existam aproximadamente 6.3 milhões de pessoas afetadas no mundo, segundo a EPDA (European Parkinson's Disease Association). A DP é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da Substância Nigra *pars compacta* (SNpc), resultando na concomitante perda de liberação de dopamina no corpo estriado (CE), alterando o controle na geração dos movimentos voluntários, resultando em problemas locomotores tais como tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (Figura 1) (SPILLANTINI et al., 1998; BRAA, BRAAK 2000; EMBORG, 2004). Além da morte neuronal dopaminérgica, as características neuropatológicas de DP são a formação de agregados proteicos insolúveis ricos em  $\alpha$ -sinucleína (chamados corpos de Lewy), aumento da reatividade glial e de processos neuro-inflamatórios (DAUER, PRZEDBORSKI 2003; ZHANG et al., 2005; TIEU, 2011), sendo fortemente correlacionados com a consequente degeneração dos neurônios dopaminérgicos (MCGEER et al., 1988; FORNO et al., 1992; ZHANG et al., 2005). Embora a etiologia desta doença permaneça desconhecida, a formação de agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína parece ter um papel muito relevante na patogenicidade da DP (OUESLATI et al., 2016; STEFANIS, 2012; STUENDEL et al., 2015).

Embora a etiologia da DP seja desconhecida, 90-95% dos casos são esporádicos (sem uma etiologia claramente associada) e os restantes 5-10% são casos familiares associados a uma origem genética. O único fator de risco que parece ter uma relevância importante no estabelecimento desta doença (tanto

em casos esporádicos como genéticos) é o envelhecimento (SIMUNI, 2007). Dentro dos casos esporádicos existe uma importante variedade de fatores que são reconhecidos por aumentar o risco de desenvolver DP como: fatores ambientais (pesticidas e toxinas), infecções do SNC, trauma craniano e o estilo de vida, entre outros (CHADE et al., 2006; SHERER et al., 2007; BOVÉ, PERIER 2012).

Na tentativa de entender a fisiopatologia da DP e com a intenção de desenvolver terapias novas e mais eficientes, têm sido utilizados diferentes modelos animais (roedores ou primatas não humanos) e celulares, os quais utilizam neurotoxinas ambientais, sintéticas ou expressão de genes mutantes vinculados ao desenvolvimento da DP em humanos. A seguir descrevem-se alguns dos modelos mais utilizados.

Dentro dos mecanismos envolvidos na propagação da DP, o estresse oxidativo e a consequente formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem um papel bem conhecido. O neurotransmissor dopamina é utilizado pelos neurônios da SNpc na comunicação neuronal com o córtex frontal e com o corpo estriado. Esse neurotransmissor é uma molécula muito reativa que pode ser oxidada facilmente e reagir com componentes celulares (TSANG, CHUNG 2009) motivo pelo qual tem sido hipotetizado que o potencial oxidativo da dopamina pode servir como explicação para a suscetibilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (JENNER 2007; TSANG, CHUNG 2009) frente ao estresse oxidativo. Além disso, a disfunção mitocondrial contribui com a formação das EROs que são geradas por uma perda de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, resultando na redução parcial da molécula de oxigênio em superóxido, que junto com a suscetibilidade da molécula de dopamina, contribuem com a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Acredita-se que a redução na atividade do complexo I mitocondrial na PD, deriva parcialmente da acumulação de mutações no DNA mitocondrial (DNA<sub>mt</sub>). Além disso, mutações de várias proteínas mitocondriais que têm sido associadas com formas familiares de PD, como PINK1, Parkin,  $\alpha$ -synucleína o LRRK2, têm sido reportado que interagem (e potencialmente prejudicam) o transporte

mediado por microtúbulos, condição que possivelmente esteja ligada à acumulação de mitocôndrias anormais no citoplasma em neurônios afetados em modelos animais e amostras post mortem de pacientes com PD (MATSUI et al., 2012).

Nesse sentido, nos primeiros modelos desenvolvidos para estudar a DP, foram utilizadas neurotoxinas específicas do sistema monoaminérgico: 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP). A 6-OHDA é um análogo hidroxilado da dopamina que compartilha características estruturais com a DA e Noradrenalina, apresentando assim uma alta afinidade por vários transportadores catecolaminérgico como o transportador de DA e transportadores de norepinefrina (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003). Embora a estrutura da 6-OHDA seja similar à da DA, a presença do grupo hidroxila aumenta a toxicidade da molécula. Como esta toxina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, é necessária a injeção intracerebral da mesma por estereotaxia diretamente na SNpc, Corpo Estriado ou feixe medial do procencéfalo para obter uma lesão desejada (COSTA et al., 2001; DEUMENS et al., 2002; BOVÉ et al., 2005). É aceito que a 6-OHDA destrói neurônios catecolaminérgicos pelo efeito combinado de espécies reativas de oxigênio e quinonas (produto de sua própria degradação) (BLESA et al., 2012). A magnitude da lesão depende da quantidade de 6-OHDA injetada, o local de injeção e a espécie animal utilizada. Esse modelo consegue levar à morte células dopaminérgicas, diminuir a quantidade de DA e modificar o comportamento animal. No entanto, nas características clínicas da DP em humanos outras estruturas encefálicas podem estar lesionadas, como *Locus Coeruleus* ou estruturas olfatórias, e nesse modelo animal não se observam tais alterações (BOVÉ, PERIER 2012). 6-OHDA é considerada como uma possível toxina endógena, responsável pela iniciação dos processos neurodegenerativos da DP, como resultado do ataque de radicais hidroxila na presença de DA (BLESA et al., 2012). Porém, a 6-OHDA não interage com  $\alpha$ -sinucleína e não induz a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína (BLESA et al., 2012; BOVÉ, PERIER 2012).

Em 1982, o MPTP foi acidentalmente descoberto, como um subproduto da síntese ilegal da desmetilprodina. Após o consumo via intravenosa, viciados em drogas desenvolveram uma síndrome parkinsoniana idiopática associada ao consumo de drogas ilícitas. Depois de investigar a etiologia dessa condição, foi descoberto que o MPTP era o contaminante neurotóxico responsável pelos efeitos parkinsonianos. O MPTP é administrado sistemicamente, e rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica, é captado pelos astrocitos e transformado em MPP<sup>+</sup> (seu metabolito tóxico), via monoamino oxidasa-B. MPP<sup>+</sup> é liberada para o espaço extracelular e captada por neurônios dopaminérgicos via DAT. Uma vez dentro dos neurônios, exerce um efeito tóxico inibindo o complexo mitocondrial I, resultando na liberação de EROs e na redução da síntese de ATP. Por outro lado, a Rotenona (um herbicida e inseticida muito utilizado na indústria agrícola) também inibe o complexo mitocondrial I, e reproduz a DP quando administrado cronicamente em animais. O uso de rotenona como modelo experimental é devido à capacidade para reproduzir várias das características do PD como: aumento do estresse oxidativo, inibição da atividade proteossomal, degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos e formação de agregados proteicos, de tipo LBs, ricos em  $\alpha$ -synucleína (WANG et al., 2006; OLANOW 2007; SHERER et al., 2007). A importância da rotenona como modelo de DP, é devido à capacidade dessa droga em formar agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -synucleína. Isso pode ser favorecido pelo aumento de EROs que podem ajudar a oxidar e agregar esta proteína, assim como o fato da rotenona ter a capacidade de unir-se a esta proteína e formar agregados (SILVA et al., 2013).

Em 1996, o mapeamento e identificação de mutações responsáveis pela DP demonstraram pela primeira vez que a DP podia ter causas hereditárias (POLYMERPOULOS et al., 1996, 1997). Entretanto, dois anos depois, outras alterações cromossômicas foram relacionadas a essa doença, assim como a exclusão dos genes inicialmente identificados para certos casos de doenças familiares (MUÑOZ et al., 1997; SCOTT et al., 1997; 1999; FARRER et al., 1998). Na atual nomenclatura genética, há 18 locus cromossomais, denominados PARK, relacionados às formas dominantes ou recessivas da DP. A identificação

das mutações gênicas que podem estar diretamente relacionados com esta doença, permitiu a geração de modelos animais transgênicos, knock-out e induzidos por sobre-expressão de genes associados com DP (por exemplo de  $\alpha$ -sinucleína) por adenovírus ou lentivirus. Esses modelos genéticos que reproduzem os casos familiares apresentam um valor importante para ajudar no entendimento de outras formas mais comuns da DP, com o fim de desenvolver novos alvos terapêuticos, além de permitir estudar os sintomas iniciais da DP, antes que os déficits motores apareçam. Os modelos genéticos knock-out utilizados para estudar a DP são aqueles associados a mutações nos genes que codificam para as proteínas Parkina, DJ-1 e PINK1, que são conhecidas por induzir a perda de função destas proteínas. No caso de mutações que induzem o ganho de função de  $\alpha$ -sinucleína ou LRRK2, modelos animais transgênicos que sobre-expressam essas proteínas (mutadas ou selvagens) ou pela sobre-expressão induzida por adenovírus, foram criados com cópias extras do gene estudado. Especificamente para o estudo da  $\alpha$ -sinucleína, modelos animais com cópias extras do gene da  $\alpha$ -sinucleína humana mutada ou selvagem são utilizados. As principais mutações expressas em esse tipo de animais são pontuais: A30P e A53T (RICHFIELD et al., 2002). Apesar de normalmente não apresentar morte neuronal, nesses modelos foi detectada uma redução na liberação de dopamina no corpo estriado, bem como distúrbios motores. No entanto, outras proteínas podem interferir no mecanismo de degradação e autofagia das células. Quando fosforilada, PINK1 recruta Parkina nas mitocôndrias danificadas para serem degradadas, no entanto mutações em PINK1 ou Parkina (responsáveis pela maioria dos casos autossômicos recessivos), impedem a mitofagia, causando acúmulo de dano mitocondrial e iniciando apoptose (NIXON, 2013; OMURA et al., 2013). Por outro lado, a proteína Parkina parece estar relacionada ao sistema de ubiquitina-proteassoma, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial; dado que animais *knockout* para Parkina apresentam aumento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (PESAH et al., 2004). Esses dados sugerem que fatores que diretamente ou indiretamente modulem as funções mitocondriais, comprometem a sobrevivência neuronal e podem apresentar importante papel no desenvolvimento da DP. Com o aumento de estudos nesse sentido, tem se

tornado cada vez mais claro que o dano oxidativo e disfunções mitocondriais apresentam papel central nessa patogênese, sendo responsáveis tanto pelo desenvolvimento da DP esporádica como familiar.

No entanto, nenhum modelo transgênico caracterizado até o momento representa um modelo fidedigno para o estudo da DP, principalmente pela ausência da perda de neurônios dopaminérgicos (MAGEN, CHESSELET 2010).

### 1.3 $\alpha$ -sinucleína

Nas últimas décadas, o termo “doenças neurodegenerativas” continua em vigor, no entanto, este grupo de doenças entrou em uma categoria ainda maior de doenças conhecidas como “doenças conformacionais”, as quais apresentam a característica do mal dobramento de proteínas (específicas para cada doença). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína de aproximadamente 15KDa, 140 aminoácidos, codificada por um gene com 5 exons, localizado no braço longo do cromossomo 4 na posição 22.1. Várias mutações afetando diferentes genes e proteínas foram identificadas como causantes da DP (KLEIN, WESTENBERGER, 2012; STEFANIS, 2012). Essas mutações são as responsáveis pela forma de início precoce da DP. O gene da  $\alpha$ -sinucleína foi o primeiro a ser associado com casos familiares de DP (POLYMEROPOULOS et al., 1997). Neste estudo foi mapeado o defeito responsável pela DP em uma família de Contursi, no sul da Itália, mudando assim a ideia da não existência de um componente genético na DP (FARRER, 2006).

Interessantemente, o neurologista Friederich Lewy descreveu as inclusões características da DP no ano 1912, as quais, posteriormente receberam o nome de Corpos de Lewy em homenagem ao seu descobridor. Apesar destas estruturas terem sido descritas no começo do século XX, o conteúdo das mesmas só foi identificado, parcialmente, no fim do século XX (SPILLANTINI et al., 1997). Curiosamente, no mesmo ano em que foi identificada a  $\alpha$ -sinucleína como o principal componente dos corpos de Lewy, a primeira mutação associada com a DP foi identificada no gene SCNA (POLYMEROPOULOS et al., 1997). A

$\alpha$ -sinucleína é uma proteína formada por 140 aminoácidos e dividida em 3 regiões: (1) amino-terminal que contém motivos de união a lipídeos, (2) região central hidrofóbica (também conhecida como NAC, do inglês *Non-Amyloid Component*), e (3) carboxilo terminal carregada negativamente (STEFANIS, 2012).

A região NAC está composta principalmente por resíduos hidrófobos, e resulta essencial para a estabilização dos corpos de Lewy (OUESLATI et al., 2010; STEFANIS, 2012). Por outro lado, a região C-terminal é a porção solúvel da proteína, que existe numa conformação desorganizada, e acredita-se que é responsável pela interação com outras proteínas, neurotransmissores e é a porção da proteína onde acontece a maioria das modificações pós-traducionais (MPT) da  $\alpha$ -sinucleína (OUESLATI et al., 2010). No entanto, as mutações responsáveis pelos casos hereditários da DP acontecem na região N-terminal da proteína, alterando assim a estrutura secundária e terciária da mesma, impedindo assim sua união a lipídeos de membrana, favorecendo assim sua localização nuclear e citoplasmática e sua consequente agregação (EMAMZADEH 2016). É uma proteína presente em pré-sinapses e núcleos (*sinapse + núcleo*: sinucleína) (STEFANIS, 2012), interagindo com diferentes grupos de proteínas assim como lipídeos de membrana (UVERSKY, 2007). Apresentando uma expressão exclusivamente neuronal, e alcançando aproximadamente 1% das proteínas citoplasmáticas, a  $\alpha$ -sinucleína é localizada principalmente na pré-sinapse, regulando a liberação sináptica de dopamina (ABELIOVICH et al., 2000). No entanto, no mesmo estudo realizado em animais *knockout* para o gene da  $\alpha$ -sinucleína, sugere-se que a  $\alpha$ -sinucleína não é um componente estrutural importante das pré-sinapses (ABELIOVICH et al., 2000).



Figura 1 - Esquema básico dos componentes motores dos núcleos da base. Os símbolos (+) indicam sinapses excitatórias, e (-) indicam sinapses inibitórias

Fonte: Purves, 2004

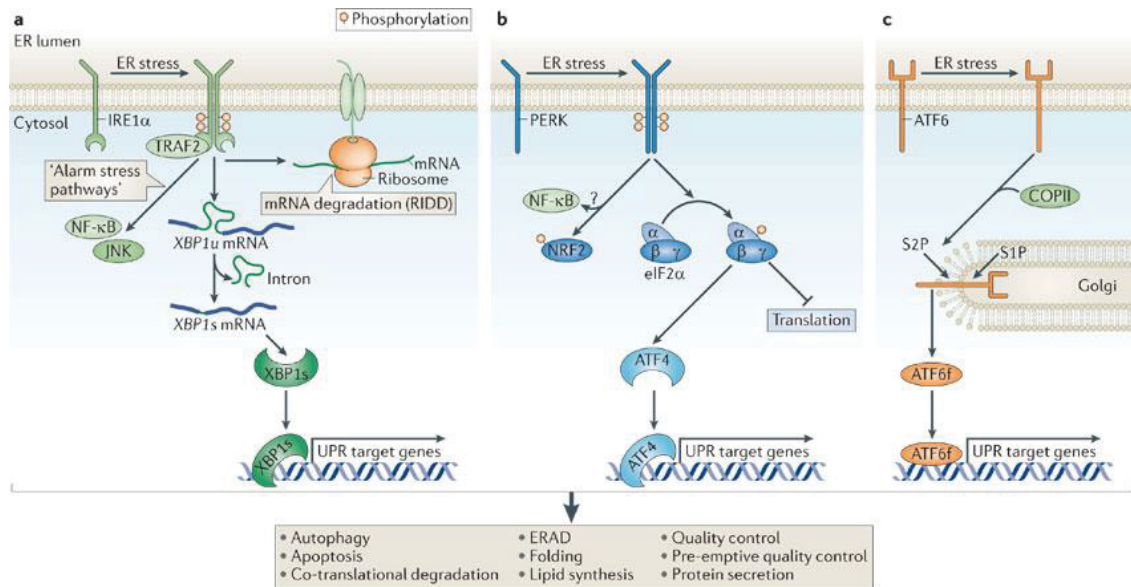
#### 1.4 Retículo endoplasmático e dobramento de proteínas

O retículo endoplasmático (RE) é o principal compartimento subcelular encarregado da síntese, dobramento e maturação de aproximadamente um terço das proteínas celulares (MARCINIAK, RON 2006). As células de mamíferos fazem a importação das proteínas para o lumen do RE enquanto ocorre a síntese

da cadeia polipeptídica, transformando a importação das proteínas num processo co-traducional (MARCINIAK, RON 2006). Para saber se a proteína deve ser sintetizada no RE, a cadeia polipeptídica nascente apresenta uma sequência sinal rica em metioninas, reconhecida pela Partícula Sinal de Reconhecimento (PSR), que redirige o polipeptídeo nascente e a maquinaria de tradução para a membrana do RE, para que a proteína que está sendo sintetizada nasça dentro do lúmen do RE. As proteínas que são sintetizadas dentro do RE entram como cadeias polipeptídicas em estado desdobrado, que logo ao atravessar a membrana do RE são assistidas por chaperonas para evitar o mal dobramento da proteína, e assistir no dobramento da mesma. Algumas proteínas requerem da N-glicosilação para o seu correto dobramento dentro do RE (MARCINIAK, RON, 2006; HETZ, 2012).

Sob certas condições de estresse celular, o dobramento de proteínas é alterado, e proteínas mal dobradas podem se acumular no lúmen do RE desencadeando uma resposta de sinalização adaptativa conhecida como UPR (do inglês, *Unfolded Protein Response*) (KIM et al., 2008; HETZ, 2012), mecanismo regulado pela chaperona GRP78 (do inglês, *Glucose-Regulated Protein-78*), normalmente unida a três proteínas sinal presentes na membrana do RE no lúmen do RE: PERK (do inglês, *Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), IRE1 (do inglês, *Inositol Requiring Enzyme-1*), e ATF6 (do inglês, *Activating Transcription Factor-6*) (HETZ, 2012). Durante condições de estresse, GRP78 é desacoplado das proteínas de sinalização, provocando a ativação de PERK e IRE1 por auto-fosforilação e ATF6 por clivagem e translocação até o aparelho de Golgi, e deste último até o núcleo (CHEN et al., 2002; SHEN et al., 2002) (Figura 2). Uma vez ativadas, IRE1 processa o mRNA de um fator de transcrição (XBP1) que gera a superexpressão de genes que codificam mediadores da ERAD, biogêneses de organelas e controle de qualidade de proteínas. PERK reduz a sínteses geral de proteínas via fosforilação do fator eIF2a, que induz a síntese de ATF4, um fator de transcrição que ativa a expressão de genes envolvidos em apoptoses, autofagia e resposta antioxidante. ATF6 é transportado até o aparato de Golgi onde é clivado, e o domínio citoplasmático é transportado até o núcleo, onde induz a expressão de chaperonas, proteínas envolvidas na biogêneses de organelas, e de genes

relacionados à resposta ERAD (MARCINIAK & RON, 2006; YOSHIDA et al., 2007; HETZ, 2012).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 2 - Esquema representativo das principais vias regulatórias do estresse de RE

Fonte: Hetz, 2012

O objetivo inicial da UPR é restaurar a homeostase e aliviar o estresse de RE por meio de: atenuação traducional da maioria das proteínas, favorecimento da expressão de chaperonas para assistir no correto dobramento das proteínas, expansão do lúmen do RE e ativação da degradação associada ao RE, ERAD (do inglês, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) (BOYCE, YUAN, 2006; YOSHIDA, 2007; KIM et al., 2008; HETZ, 2012). No entanto, se a homeostase não for restaurada e a ativação da UPR persiste, uma resposta apoptótica é ativada. Diferentes estudos têm sugerido que a participação inicial da UPR nas doenças neurodegenerativas provavelmente tenha função citoprotetora e restauradora da homeostase do RE (RUTKOWSKI et al., 2006; YOSHIDA, 2007). No entanto, quando a UPR é ativada por um longo período de tempo, e as células são incapazes de resolver o estresse, as vias apoptóticas são ativadas, o que agrava e possivelmente esteja associado com a patogêneses de várias doenças neurodegenerativas (DAWSON, DAWSON 2003; BERNALES et al., 2012; LINDHOLM et al., 2006; MATSUI et al., 2012;

CASTRO-CALDAS et al., 2012). Vários estudos sugerem que uma diminuição progressiva no funcionamento do sistema de chaperonas pode ser associada com o mal funcionamento celular e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (NAIDOO et al., 2008; BROWN, NAIDOO 2012; MORAWE et al., 2012). Durante o processo do envelhecimento, existe uma diminuição na atividade e na resposta das chaperonas frente ao estresse de RE (NAIDOO, 2009), aumentando a vulnerabilidade das pessoas idosas no processo do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento como Alzheimer, Parkinson ou Demência.

Especificamente na DP, tem sido demonstrado que as neurotoxinas 6-OHDA, MPTP, Rotenona e Paraquato ativam vários genes envolvidos na UPR, incluindo chaperonas, IRE1 e PERK (RYU e cols., 2002; HOLTZ, O'MALLEY, 2003; BOVÉ, PERIER 2012). Além disso, estudos de tecido *pós-mortem* evidenciaram a ativação da UPR junto com acumulação de proteínas poli-ubiquitinadas (HOOZEMANS et al., 2007). Por outro lado, foi demonstrado o efeito protetor do uso de chaperonas químicas que aliviam o estresse de RE (TUDCA) sobre neurônios da SNpc, num modelo *in vivo* de DP (CASTRO-CALDAS et al., 2012), sugerindo assim que estresse de RE possa ter um papel fundamental na DP.

Diferentes substâncias são utilizadas para estudar o estresse de RE, as quais atuam sobre diferentes alvos celulares, como: Thapsigargina (inibe bomba SERCA no RE), Tunicamicina (inibe a N-glicosilação das proteínas durante sua síntese), DTT (ditiotreitól) (quebra os enlaces disulfeto das proteínas já sintetizadas), e Befeldrina A (bloqueia a formação de vesículas COPI, inibindo o transporte retrógrado, o qual seletivamente recicla proteínas do Golgi até o RE) (LEAVER et al., 1988; ORCI et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 2006; CHATTOPADHYAY, VALENTINE 2009). A Tunicamicina é produzida por bactérias do gênero *streptomyces*, um antibiótico que foi utilizado no tratamento do câncer mas que, devido à alta toxicidade e à falta de seletividade para afetar só as células cancerígenas e não o tecido saudável, foi eliminado como possível tratamento para esse conjunto de doenças. No entanto, a importância deste

composto na indução do estresse de RE tem demonstrado o poder da Tunicamicina, um inibidor da N-glicosilação das proteínas, na indução do estresse de RE e ativação da UPR em modelos *in vitro* e *in vivo* (LEAVER et al., 1988; RUTKOWSKI et al., 2006; MATSUI et al., 2010).

### **1.5 Agregação de proteínas, modificações pós-traducionais e neurodegeneração**

A agregação de proteínas mal dobradas é um processo característico que acontece em todas as doenças neurodegenerativas (BERKE, PAULSON 2003; HOOZEMANS, SCHEPER 2012). Considerando que os corpos de Lewy são acúmulos de proteínas mal dobradas, e que mais de 90% dos casos de DP são esporádicos, implicando que as modificações genéticas não são suficientes para explicar o início da agregação proteica, uma das mais intrigantes questões que a era da genômica não conseguiu responder é a compreensão das doenças conformacionais. Talvez seja esse o motivo pelo qual, nas últimas duas décadas, os estudos para avaliar as MPT têm aumentado (DUAN, WALTHER, 2015; SANTOS, LINDNER 2017; UVERSKY, 2017). As MPTs regulam a função de uma proteína, expressão, estabilidade, localização e associação com outras moléculas (OUESLATI, 2010; HUANG et al., 2016; SANTOS, LINDNER 2017). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína suscetível à fosforilação, sumoilação, O-glicosilação, clivagem, nitrosilação, ubiquitinação e oxidação entre vários tipos de MPT (OUESLATI et al., 2010; BARRET, GREENAMYRE 2015). Considera-se que a fosforilação, oxidação, clivagem e ubiquitinação da  $\alpha$ -sinucleína são as MPT mais associadas com a formação dos corpos de Lewy (OUESLATI et al., 2010; BARRET, GREENAMYRE 2015), enquanto a nitração com a estabilização dos estados oligoméricos (BARRET, GREENAMYRE 2015). Embora existam dados contraditórios sobre o papel que tem cada uma das MPTs na DP (TOFARIS et al., 2003; MISHIZEN-EBERZ et al., 2005; OUESLATI et al., 2010; MUNTANÉ et al., 2012; BARRET, GREENAMAYER 2015), a relação delas com a formação de agregados proteicos é notória.

Baseados no estresse de RE como possível fator gerador de DP, alguns

estudos sugerem que pesticidas como a Rotenona e Parquat (BOVÉ, PERIER 2012), poderiam contribuir para o desenvolvimento da DP, possivelmente pelos mecanismos de estresse de RE, assim como outros efeitos adversos. Além disso, foi demonstrado o efeito protetor de TUDCA, uma chaperona química capaz de aumentar a capacidade de dobramento de proteínas, sobre os neurônios da SNpc, num modelo *in vivo* de DP (CASTRO-CALDAS et al., 2012). Essas evidências sugerem que o estresse de RE possa ser um mecanismo comum na geração das características patológicas da DP. Até o momento, para estudar a relação do estresse de RE na DP, só foram realizados estudos *in vitro* em células que sobre-expressam  $\alpha$ -sinucleína mutante ou selvagem (COLLA et al., 2012) onde foi utilizado um modelo em vertebrados inferiores (Medaka Fish), estudando a importância do estresse de RE na geração das características patológicas da DP (MATSUI et al., 2010).

Considerando que a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína é a característica patognomônica da DP, e visto o papel relevante que tem as MPTs na agregação desta proteína, no presente trabalho pretende-se caracterizar um novo modelo de DP induzido por estresse de RE e avaliar a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína induzidos por estresse de RE, assim como avaliar as MPT envolvidas com a agregação desta proteína, no modelo *in vivo* e Tunicamicina (TM), desenvolvido no laboratório de Neurobiologia da UFPR.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar o estresse de RE como possível mecanismo molecular causador da DP através do mecanismo de agregação e modificação química de substratos proteicos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Quantificar a perda de neurônios dopaminérgicos nos modelos neurotoxicológicos induzidos com TM e 6-OHDA para o estudo da DP.
2. Analisar a reatividade glial na SNpc.
3. Avaliar o estresse de RE induzido por TM e 6-OHDA.
4. Avaliar a formação de agregados proteicos nos modelos neurotoxicológicos de TM e 6-OHDA para o estudo da DP.
5. Avaliar quantitativa e qualitativamente as modificações pós-traducionais envolvidas na formação de agregados proteicos na DP, tais como carbonilação, fosforilação e nitração.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cirurgia Estereotáxica

Ratos Wistar machos, de 280-320gr foram profundamente anestesiados com quetamina (i.p., 100 mg/Kg) e xilazina (i.p., 20 mg/kg). Os mesmos foram fixados no estereotáxico e a área sobre o crânio foi tricotomizada e limpa com álcool, antes de ser realizado o corte com bisturi. Após o corte, um orifício foi perfurado no crânio sobre a área de interesse, por onde se procedeu a inserir a agulha para a realização das microinjeções na SNpc com: veículo (PBS:DMSO, solução salina, do inglês *Phosphate Buffer Saline*); 1 µg de 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina), um análogo da dopamina que induz morte celular de neurônios dopaminérgicos pelo aumento de espécies reativas ao oxigênio e quinonas (BARNUM, TANSEI 2010) ou 0,1 µg TM (bloqueador da N-glicosilação das proteínas no RE) (LEAVER et al., 1988). O atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson foi utilizado para obter as coordenadas estereotáxicas. Após a cirurgia, os animais foram mantidos para recuperação da anestesia em sala com temperatura controlada (22± 2 °C), e tratados com analgésico meloxicam (i.p., 5 mg/kg) por 24 horas (em concordância com o CEUA N° 870).

#### 3.2 Obtenção de amostras biológicas

Após os animais serem injetados, os mesmos foram eutanaziados 7 dias pós injeção; e as amostras foram coletadas para ensaios bioquímicos, de imunohistoquímica, western blot e ELISA.

### 3.3 Obtenção do encéfalo para análise por imuno-histoquímica

Os animais foram profundamente anestesiados com quetamina (i.p., 100 mg/Kg) e xilazina (i.p., 20 mg/kg), e perfundidos por via transcardíaca. Uma vez profundamente anestesiados, colocou-se o animal em decúbito-dorsal sobre a mesa de perfusão, uma incisão abdominal abaixo da margem costal foi realizada, o diafragma foi cortado e as costelas foram cortadas, removendo o peitoral esternocostal, expondo o coração. O átrio direito foi cortado para deixar sair o sangue e líquidos perfundidos; no ventrículo esquerdo foi inserida uma seringa, a qual estava conectada com uma bomba de perfusão, em fluxo constante de 11 mL/minuto. Primeiro foi injetada solução de lavagem com solução salina complementada com anticoagulantes (NaCl 0,9% - Citrato de sódio 0,4% - Nitrito de Sódio 0,2%, pH 7,2), seguida por solução de fixação logo depois (paraformaldeído 4%). Os encéfalos foram removidos e incubados por 24 horas, a 4°C, em solução fixadora, e então imersos por mais 72 horas em solução tamponada de sacarose 30%, para criopreservação. Os encéfalos foram mantidos a -80°C até serem seccionados em cortes coronais de 30 µm de espessura em criostato Leica a -20°C. Os cortes foram coletados em solução *anti-freezing* (PBS 0,01M, 30% sacarose, 30% etilenoglicol) e armazenados a -20°C até o seu processamento para imuno-histoquímica.

Para o processamento de imuno-histoquímica, os cortes foram lavados três vezes de 10 minutos com PBS 0,1M, e em seguida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. diluída a 3% em PBS 0,1M. Após nova lavagem com PBS 0,1M por 10 min, os cortes foram colocados por 30 minutos em solução de bloqueio (5% soro fetal bovino, 0,1% tritón X-100 em PBS 0,1M). A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-TH (para o reconhecimento de neurônios dopaminérgicos) ou anti-GFAP (do inglês, *Glial Fibrillar Acidic Protein*) (para o reconhecimento de astrócitos) diluídos em solução de bloqueio *over-night* em câmara fria. No dia seguinte, os tecidos foram lavados três vezes de 10 minutos e incubados com anticorpo secundário biotilado por 2h, sempre incubando em agitação constante. Depois os tecidos foram incubados com *Avidina-Biotina Complex*, seguido da revelação com DAB (de acordo com o fabricante).

Seguidamente à reação, os cortes foram lavados 5 vezes de 10 min em PBS 0,1M desidratados em Álcool e Xilol, montados em lâminas e finalmente cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan® (Merk). Os tecidos foram visualizados em microscópio Zeiss Axio Observer acoplado ao software Axio Vision 4.8.2 ou microscópio Confocal Nikon A1R MP+.

Para o processamento de imuno-histoquímica, os cortes foram lavados três vezes de 10 minutos com PBS 0,1M, e em seguida com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. diluída a 3% em PBS 0,1M. Após nova lavagem com PBS 0,1M por 10 min, os cortes foram incubados por 30 minutos, em solução de bloqueio (5% soro fetal bovino, 0,1% tritón X-100 em PBS 0,1M). A seguir, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-TH (1:750, Sigma) ou anti-GFAP (1:600, Dako), diluídos em solução de bloqueio *over-night* em câmara fria. No dia seguinte, os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos e incubados com anticorpo secundário biotilado por 2h, sempre em agitação constante. Depois os tecidos foram incubados com *Avidina-Biotina Complex*, seguido da revelação com DAB (de acordo com instruções do fabricante). Após a reação, os cortes foram lavados 5 vezes por 10 min em PBS 0,1M desidratados em Álcool e Xilol, montados em lâminas e finalmente cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan® (Merk). Os tecidos foram visualizados em microscópio Carl Zeiss Axio Observer acoplado ao software Axio Vision 4.8.2. A nomenclatura e os limites das estruturas encefálicas foram definidos de acordo com Paxinos (PAXINOS & WATSON, 1997).

Para a visualização da  $\alpha$ -sinucleína, os cortes foram lavados três vezes de 10 minutos com PBS 0,1M e foram bloqueados com solução de bloqueio (5% soro fetal bovino, Tritón X-100 0,1% em PBS 0,1M) por 30 minutos em agitação. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo anti- $\alpha$ -sinucleína (1:1000, BD 610787) diluído em solução de bloqueio *over-nigth* em câmara fria. No dia seguinte, os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos e incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 cabra anti-camundongo por 2h, a temperatura ambiente em agitação, em escuridão. Após a incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram lavados 5 vezes por 10 min em PBS 0,1M

e montados em lâminas e cobertos com Glicero-DAPI (Solução 30% de glicerol, contendo 1 $\mu$ g/ml de DAPI). As lâminas foram visualizadas no microscópio Confocal Nikon A1R MP+ (Nikon, Tokyo, Japan).

### **3.4 Obtenção de amostras para análise por western-blot e ELISA**

Os animais foram sacrificados sem anestesia por decapitação. Após eutanásias, o cérebro foi retirado e colocado em PBS gelado. O cérebro foi dissecado manualmente utilizando lupa, os núcleos da base retirados e armazenados em microtubos a -80°C até serem analisados por ultracentrifugação.

### **3.5 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford**

A dosagem de proteínas Totais e solúveis em Tritón X-100 foi realizada pelo método de Bradford (#500-0006, BioRad), em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800). A curva padrão foi construída com diferentes concentrações (0-200  $\mu$ g/ml) de Albumina de soro Bovino (BSA) e as amostras foram diluídas para se aproximarem da região de linearidade da curva padrão. A leitura do resultado foi feita em 595 nm.

### **3.6 Dosagem de proteínas pelo método do BCA**

Devido a que o SDS interfere na quantificação pelo método de Bradford, as proteínas solúveis em SDS, foram quantificadas pelo método do BCA, utilizando Pierce BCA Protein Assay Kit (#23227, Thermo) em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800). A curva padrão foi construída com diferentes concentrações (20  $\mu$ g/mL – 2000  $\mu$ g/mL) de Albumina de soro Bovino (BSA) e as amostras foram diluídas para se aproximarem da região de linearidade da curva padrão. A leitura

do resultado foi feita em 562 nm.

### 3.7 Análise da fosforilação na serina 129 da $\alpha$ -sinucleína

A fosforilação da proteína  $\alpha$ -sinucleína é uma MPT, associada com a formação de agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína, próprios da DP. Essa proteína pode apresentar várias fosforilações, sendo a fosforilação no resíduo de serina 129 a alteração mais crítica no processo de agregação (OUESLATI, 2016). Para conseguir analisar o nível de fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína, um ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) semi-quantitativo foi realizado.

Brevemente, placas Nunc de 96 poços (Thermo) foram sensibilizadas com anticorpo anti- $\alpha$ -sinucleína (BD 610787) diluído em tampão carbonato (pH 9,6), 16-18 horas a 4°C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1% e posteriormente bloqueada com PBS-BSA 1%, a 37°C por 1 hora. Após a etapa de bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1% e foram adicionados, em cada poço, 20mg de proteínas solúveis em TX-100 e solúveis em SDS, a 37°C por 2 horas. A placa foi lavada novamente, e os poços foram incubados com anticorpo primário contra  $\alpha$ -sinucleína fosforilada (anti-Phospho- $\alpha$ -sinucleína S129, Abcam EP1536Y), a 37°C por 2 horas. Transcorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-coelho (1:4.000, SIGMA), conjugado com HRP por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada repetidas vezes com PBS-Tween 0,1%, e incubada 30 minutos a temperatura ambiente, com substrato TMB *single solution* (Life Technologies). Uma vez completado o tempo, a reação foi interrompida com Ácido Sulfúrico 1M. A absorbância foi aferida em leitor de placas, à 450 nm.

### 3.8 Dosagem de proteínas carboniladas

Reações oxidativas podem causar a formação de grupos carbonilas em proteínas. Esta é uma modificação típica, que favorece a agregação proteica, motivo pelo qual foi avaliada por (1) espectrofotometria e (2) ELISA direto (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) semi-quantitativo.

*Espectrofotometria:* o método utilizado é uma adaptação do método colorimétrico por dinitrofenil hidrazina (DNPH), descrito por Quinlan e Gutteridge (1999). Brevemente, 100 µg de extrato total de proteína, previamente quantificadas, foram incubadas com solução de 10 mM DNPH (em 2M HCl) (90 minutos, 37°C). Depois de incubadas com DNPH, as proteínas foram precipitadas com solução 20% de ácido tricloroacético em gelo, e centrifugadas a 6000rpm (10 minutos, 4°C), lavadas com solução de lavado (ácido acético:etanol 1:1) e resuspendidas em hidrocloreto de guanidina 6M. O branco da reação consistiu na reação completa feita na ausência de proteínas. As absorbâncias foram determinadas em 360 nm.

*ELISA:* o método utilizado foi de acordo com Alamdari e colaboradores (2005), com algumas modificações. Para isto, 200ng as amostras foram adsorvidas uma placa Nunc de 96 poços (Thermo) com tampão carbonato (pH 9,6) durante 16-18hs a 4°C, lavados 3 vezes com PBS e incubados (45 minutos a temperatura ambiente) com solução de DNPH (0,05M, pH 6,2). Logo depois do período de derivatização com DNPH, as amostras foram lavadas 5 vezes com PBS:etanol (1:1), e bloqueadas durante 90 minutos com solução de bloqueio (5% leite em 0,1% PBS-Tween 20) à temperatura ambiente, e lavadas 5 vezes com PBS-Tween. As amostras foram incubadas com anti-DNPH (1:2.000) (1 hora a 37°C) e depois lavadas 5 vezes com PBS-Tween. Logo foram incubados com anticorpo secundário anti-coelho (1:4.000, SIGMA) conjugado com enzima HRP (do inglês, *Horse Radish Peroxidase*) por 1 hora a 37°C e lavados 5 vezes com PBS-Tween. Transcorridas as lavagens, foram adicionados 100µl de substrato TMB *single solution* (Life Technologies) e a reação foi detida com 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi medida a 450nm em leitor de placas de ELISA.

### 3.9 Análise de carbonilação de $\alpha$ -sinucleína

Para avaliar a carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína, as amostras foram avaliadas por ELISA sanduíche semi-quantitativo, seguindo o protocolo de Colombo e colaboradores (2015). Brevemente, 200 $\mu$ g de proteínas foram derivatizadas com solução de DNPH 10mM (1 hora a temperatura ambiente na escuridão, com vortex a cada 15 minutos). As proteínas foram precipitadas por adição de 1 volume de solução de ácido tricloroacético 20% (incubadas em gelo). As amostras foram centrifugadas a 10.000xg (5 minutos, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 1 vez com 20% de ácido tricloroacético, centrifugados a 10.000xg (5 minutos, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol:acetato de etila (1:1) (os passos de lavado com ácido tricloroacético e etanol:acetato de etila foram repetidos 6 vezes). As amostras foram centrifugadas novamente a 10.000xg (5 minutos, 4°C). O pellet foi resuspendido por sonicado em tampão 20mM Tris-HCl (pH 6.8) suplementado com 1% de Tritón X-100 e 0,2% de SDS, e as amostras foram quantificadas por Bradford. Por outro lado, uma placa Nunc de 96 poços (Thermo) foi sensibilizada com anticorpo anti- $\alpha$ -sinucleína em tampão carbonato (pH 9,6) durante 16-18hs a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,1% bloqueadas com solução de bloqueio (leite 5% diluído em PBS-Tween 0,1%) 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS-Tween 0,1%, e 20 $\mu$ g de proteínas foram incubados 2 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS-Tween 0,1%, e incubadas com anticorpo anti-DNPH (1:2.000). Transcorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-coelho (1:4.000, SIGMA), conjugado com HRP por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada repetidas vezes com PBS-Tween 0,1%, e incubada 30 minutos à temperatura ambiente, com 100 $\mu$ l de substrato TMB *single solution* (Life Technologies). Uma vez completado o tempo, a reação foi interrompida com 50 $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi aferida em leitor de placas, a 450 nm.

### 3.10 Análise de nitração proteica – Dot blot

A nitração de proteínas nos resíduos de tirosina é uma MPT que revela a perturbação da sinalização e metabolismo do óxido nítrico em direção a processos oxidantes. Deste modo, 3-nitrotirosina tem sido estabelecida como bio-marcador do estresse nitro-oxidativo celular e sistêmico. Para a detecção de resíduos de nitrotirosina em proteínas, foi utilizado o método de dot-blot. Para isso, 2 $\mu$ g de proteínas solúveis em TX-100 e SDS foram imobilizadas sobre uma membrana de nitrocelulose. A mesma foi bloqueada com BSA 2% (solução de bloqueio) por 12-18 horas com anticorpo anti-nitrotirosina a 4°C em agitação. Passado o tempo de incubação do anticorpo, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween 0,1%, e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (1:4.000, SIGMA) conjugado com enzima HRP por 1 hora a temperatura ambiente, em solução de bloqueio, lavada novamente com TBS-Tween 0,1% 3 vezes, e revelado com ECL.

Como controle do teste, um duplicado das membranas foi incubado com 10mM de Dithiothreitol (DTT). Depois da imobilização das proteínas na membrana, as mesmas foram tratadas com DTT, lavadas exaustivamente com TBS-Tween 0,1%, e foi utilizado o mesmo procedimento anterior desde a etapa de bloqueio. Neste caso, o DTT reduz a nitro-tirosina em amino-tirosina, e serve como controle de especificidade do anticorpo primário.

### 3.11 Análise de nitração de $\alpha$ -sinucleína

Brevemente, placas Nunc de 96 poços (Thermo) foram sensibilizadas com anticorpo anti- $\alpha$ -sinucleína (Abcam 1903) diluído em tampão carbonato (pH 9,6), 16-18 horas a 4°C. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1% e posteriormente bloqueada com PBS-Leite 2%, a 37°C por 1 hora. Após a etapa de bloqueio, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1% e foram adicionados em cada poço, 20  $\mu$ g de extrato total de proteínas solúveis em TX-100 e solúveis em SDS, a 37°C por 2 horas. A placa foi lavada novamente, e os

poços foram incubados com anticorpo primário contra nitrotirosina (anti-nitrotirosina), a 37°C por 2 horas. Transcorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-ovelha (1:3.000, SIGMA), conjugado com HRP por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada repetidas vezes com PBS-Tween 0,1%, e incubada 30 minutos a temperatura ambiente, com substrato TMB *single solution* (Life Technologies). Uma vez completado o tempo, a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância foi aferida em leitor de placas, a 450 nm.

### **3.12 Extração de agregados proteicos de $\alpha$ -sinucleína**

A extração dos agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína em concordância com protocolos publicados em trabalhos recentes (MAO et al., 2016; Tanase e cols., 2016). Brevemente, os tecidos foram homogeneizados por sonicação em tampão de lise (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% Triton X-100, complementado com inibidores de proteases e fosfatases), e centrifugados a 12.000Xg, 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado como fração solúvel em Triton X-100 (TX-100). O pellet resultante foi resuspeso por sonicação no mesmo tampão de lise suplementado com 2% SDS, e logo centrifugado a 22.000xg por 30 minutos a 18°C. O sobrenadante foi armazenado como fração solúvel em SDS. A concentração de proteínas dos sobrenadantes foram quantificadas pelo método de Bradford para a fração proteica solúvel em TX-100 ou Ácido Bicinconínico (BCA) para a fração solúvel em SDS.

### **3.13 Western blot**

Esta é uma técnica de rotina nos laboratórios de pesquisa biológica, que permite o estudo da expressão de proteínas em uma amostra biológica, permitindo examinar a expressão semi-quantitativa de uma proteína específica numa amostra e assim comparar os níveis de proteínas entre várias amostras.

Para isso, com base no tamanho, as proteínas são separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida. A electroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, foi descrita originalmente em 1970 por Laemmli. Nesta técnica, as proteínas são separadas em função da massa molecular. Para migrar no gel de poliacrilamida, as proteínas são desnaturadas e expostas ao dodecil sulfato de sódio (SDS) para ser carregadas negativamente. Os complexos SDS-proteína adotam uma conformação desdobrada, e um valor carga/massa constante que permite que as proteínas possuam uma carga similar em relação à massa molecular permitindo a separação das proteínas em função da massa molecular. Quando aplicado um campo elétrico, as proteínas migram pelo gel desde o cátodo até o ânodo, ficando as mesmas divididas em bandas separadas em base à massa molecular.

### 3.13.1 Western blot I.- Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida

Para a separação de proteínas por eletroforese foram construídos mini-géis de poliacrilamida 10%. Os géis estão formados por 2 partes: gel separador e gel concentrador. A função do gel concentrador é concentrar as proteínas e permitir que a entrada no gel separador das proteínas aconteça no mesmo momento para todas as amostras.

Os géis foram colocados no suporte dentro da cuba de eletroforese (BioRad) e foi adicionado tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0.1% SDS; pH 8,4). Utilizando seringa Hamilton, foi adicionado 2  $\mu$ l de marcador de peso molecular, e nos restantes poços foi carregado um volume determinado para 5-20  $\mu$ g de proteínas totais das amostras analisadas, dependendo da proteína a ser analisada. A corrida de eletroforese foi realizada a 50 mA e voltagem livre.

### 3.13.2 Western blot II.- Transferência para Membranas de Nitrocelulose

As proteínas precisam ser acessíveis para o reconhecimento por anticorpos.

Para isso, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Esse processo utiliza o mesmo princípio da eletroforese, mas nesse caso a corrente elétrica é aplicada em paralelo à posição do gel, dessa forma, as proteínas migram do gel até a membrana. O 'sanduíche' para a transferência foi armado submerso em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% Metanol) aplicando os componentes na seguinte ordem (do polo negativo ou cátodo, até o positivo ou ânodo): esponja, 3 folhas de papel filtro, gel, membrana, 3 folhas de papel filtro e outra esponja. As proteínas são transferidas desde o polo positivo até o negativo, ficando aderidas na membrana de nitrocelulose. O 'sanduíche' é colocado na cuba de transferência, submerso em tampão de transferência. Como o processo leva ao aquecimento da solução, o dispositivo foi refrigerado circulando o tampão com agitador magnético. A transferência durante 1 hora em frio, a 3mA.hora/cm<sup>2</sup>, com voltagem livre. Uma vez finalizada, a membrana foi retirada e corada com Vermelho Ponceau (0,2% vermelho Ponceau e 3% ácido tricloroacético em H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) durante 2 minutos, com intenção de comprovar a transferência das proteínas desde o gel até a membrana. O vermelho Ponceau cora de forma inespecífica todas as proteínas da amostra, e pode ser removido da membrana ao lavar com TBS-Tween 0,1%.

### 3.13.3 Western Blot III.- Bloqueio da membrana e incubação com anticorpos

O bloqueio da membrana é importante no Western blot para reduzir a união inespecífica dos anticorpos na membrana, evitando dessa forma, a observação de falsos positivos. Para isso, uma vez que as proteínas foram transferidas, a membrana foi bloqueada 1 hora à temperatura ambiente (TA) em uma solução de leite desnatada ou BSA (albumina de soro bovino) 5% em TBS-Tween 0,1% com agitação leve. Uma vez terminado o tempo, a membrana foi incubada a 4°C *over-night* (de 16h a 20h) em solução de bloqueio com anticorpos monoclonais anti-β-actina (1:4.000, Sigma), anti-GAPDH (1:3.000, Sigma), anti-α-sinucleína (1:3.000, BD 610787), anti-KDEL (1:2.000, Enzo Life Science) e anti-CHOP (1:1.000, Thermo Scientific).

Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,1% (3 X 5 minutos). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos secundários: anti-IgG camundongo-HRP o anti-IgG coelho-HRP (1:5000, SIGMA) durante 1 hora a TA. Uma vez transcorrido o tempo, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,1% (3 X 5 minutos), e o processo de revelado foi iniciado.

#### 3.13.4 Western Blot IV.- Detecção

Para a detecção das proteínas presentes na membrana, foi utilizado o sistema ECL (ECL #32106 Pierce, Thermo Scientific), devido à sua alta sensibilidade. Este sistema também tem a capacidade de gerar um contraste excelente dos sinais gerados. Para o revelado foram utilizados anticorpos conjugados com enzima HRP (peroxidase de rabanete). A reação quimioluminescente ocorre quando a energia de uma reação química é emitida como luz. A peroxidase conjugada ao anticorpo secundário é utilizada para catalisar a oxidação do luminol (ECL reagente de detecção 2) na presença de  $H_2O_2$  (ECL reagente de detecção 1). Após a oxidação, o luminol está num estado excitado, e passa para um estado basal, onde emite luz. Quando a reação ocorre sobre um filme autorradiográfico, é obtida uma impressão porque a luz impressiona os grãos de prata do filme.

A membrana foi incubada com ambas soluções ECL em quarto escuro por 1 minuto. O excedente do ECL foi removido, e a membrana foi exposta a um filme autorradiográfico (Fujifilm) em um cassete próprio por 5 minutos e revelado com soluções reveladoras e fixadoras comerciais (Kodak).

#### 3.14 Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism

(versão 6.0), e avaliados por ANOVA de 1 ou 2 vias, seguido por análise pós-hoc Tukey, tomando como significativo  $p \leq 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Capítulo I- Caracterização do modelo**



## ER Stress Induced by Tunicamycin Triggers $\alpha$ -Synuclein Oligomerization, Dopaminergic Neurons Death and Locomotor Impairment: a New Model of Parkinson's Disease

Valentín Cópola-Segovia<sup>1</sup> & Clarissa Cavarsan<sup>1</sup> & Flavia G Maia<sup>1</sup> & Anete C Ferraz<sup>2</sup> & Lia S Nakao<sup>1</sup> & Marcelo M S Lima<sup>2</sup> & Silvio M Zanata<sup>1</sup>

Received: 22 February 2016 / Accepted: 9 September 2016  
# Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive death of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc), leading to the major clinical abnormalities that characterize this disease. Although PD's etiology is unknown,  $\alpha$ -synuclein aggregation plays a pivotal role in PD pathogenesis, which could be associated to some pathological processes such as oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, impaired protein degradation, and mitochondrial dysfunction. Increasing experimental evidence indicates that ER stress is involved in PD, however most of the described results employed cultured cell lines and genetically modified animal models. In this study, we developed a new ER stress rat model employing the well-known ER stressor tunicamycin (Tm). To evaluate if ER stress was able to induce PD features, we performed an intranigral injection of Tm (0.1  $\mu$ g/cerebral hemisphere) and animals (male Wistar rats) were analyzed 7 days post injection. The classical 6-OHDA neurotoxin model (1  $\mu$ g/cerebral hemisphere) was used as an established positive control for PD. We show that Tm injection induced locomotor impairment, dopaminergic neurons death, and activation of astroglia. In addition, we observed an extensive  $\alpha$ -synuclein oligomerization in SNpc of Tm-injected animals when compared with DMSO-injected controls. Finally, both Tm and 6-OHDA

treated animals presented increased levels of ER stress markers. Taken together, these findings show for the first time that the ER stressor Tm recapitulates some of the phenotypic characteristics observed in rodent models of PD, reinforcing the concept that ER stress could be an important contributor to the pathophysiology of PD. Therefore, we propose the intranigral Tm injection as a new ER stress-based model for the study of PD in vivo.

**Keywords** Parkinson's disease · ER-stress · Tunicamycin ·  $\alpha$ -Synuclein oligomerization

### Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, caused by selective degeneration of dopaminergic neurons of the Substantia Nigra pars compacta (SNpc) [1, 2]. Dopaminergic deficit results in motor disabilities, such as rest tremor, bradykinesia, rigidity of movement, and postural instability [3]. Despite the existence of specific genetic causes, PD is primarily a sporadic disorder. Although the etiology of PD remains unknown, environmental or genetic factors might contribute to the pathogenesis of PD, leading to an increase of oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, and impairing mitochondrial function [4–7]. Besides dopaminergic neuronal death, neuropathological hallmarks of PD include glial reactivity, inflammation, and intracellular proteinaceous inclusions called Lewy bodies (LB), which are mainly constituted by  $\alpha$ -synuclein aggregates [4, 6].

Genetic and transgenic animal models support the idea that the accumulation of fibrillar  $\alpha$ -synuclein plays a relevant role in the pathogenesis of PD [8]. However, mounting evidence [9] indicates that soluble pre-aggregate oligomers are responsible for neurodegeneration, having aggregates a clearance

\* Silvio M Zanata  
smzanata@ufpr.br

<sup>1</sup> Laboratory of Neurobiology and Redox Pathology, Department of Basic Pathology, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Av. Francisco H. dos Santos, s/n, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

function since they could immobilize the oligomeric  $\alpha$ -synuclein, avoiding its toxic availability.

Abnormal forms of  $\alpha$ -synuclein and oligomers lead to cellular homeostasis imbalance that includes alterations of calcium signaling [10, 11], mitochondrial dysfunction [12], oxidative and nitrosative damage [13], changes in cytoskeletal integrity [14], and neuroinflammation [15].

Despite the ubiquitous presence of  $\alpha$ -synuclein in LB [16] and its relevance in the development of PD [8], the molecular mechanism mediating the neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein remains unclear and still in debate [17].

Cytosolic and membrane bound levels of  $\alpha$ -synuclein are regulated by their synthesis, degradation, and secretion rates and a proteostasis imbalance has been shown to be involved in aggregates formation. The ubiquitin-proteasomal system dysfunction contributes to inclusions formation and toxicity [18, 19]. Furthermore, post-translationally modified  $\alpha$ -synuclein is impaired to be degraded by the autophagy-lysosome pathway [20], indicating that disturbance of the two main routes responsible for protein degradation triggers  $\alpha$ -synuclein accumulation in the cell, leading to ER stress.

Approximately, one third of cellular proteins are synthesized in the ER where they are folded and undergo post-translational modifications, and transit to membrane compartments or are secreted [21]. However, under certain conditions of cellular stress, protein folding is altered, and misfolded substrates accumulate in the lumen of ER triggering an adaptive signaling pathway called unfolded protein response (UPR) [21, 22]. This mechanism is regulated by the ER resident chaperone glucose-regulated protein-78 (GRP78) that mediates the activation of three major stress sensors: protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), inositol requiring enzyme-1 (IRE1), and activating transcription factor-6 (ATF6) [21]. The initial role of UPR is to restore homeostasis and alleviate ER stress through attenuation of protein translation, increase folding capacity, ER membrane expansion and activation of ER-associated degradation (ERAD pathway) [21–24].

Endoplasmic reticulum (ER) stress has recently acquired great attention in the field of neurodegenerative diseases [25, 26], particularly with respect to PD [27]. In fact, post-mortem analysis has demonstrated that substantia nigra of PD cases present activation of the PERK pathway, which is correlated with increased levels of  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons [28]. Additionally, the C/EBP-homologous protein (CHOP), a downstream member of the PERK pathway [21], is up-regulated in the 6-OHDA neurotoxin-induced cell death both in vitro [29] and in vivo [30], corroborating the findings that CHOP knockout mice dopaminergic neurons are protected from cell death after 6-OHDA challenge [31]. Besides PERK, the IRE1 and ATF6 branches of the UPR have also been implicated in PD [27], however most of the experimental data were obtained employing cultured cell lines or neurons

[32, 33] and transgenic animals [34, 35]. These data collectively suggest that the UPR is activated in PD and that UPR activation is closely associated with the accumulation and aggregation of  $\alpha$ -synuclein and dopaminergic cell death.

Because increasing evidences point to the pivotal role the ER stress and UPR in PD and there is lacking of in vivo ER stress models that use only non-genetically manipulated animals, we developed a new ER stress rodent model employing an intranigral injection of the well-known ER stressor tunicamycin (Tm) [36]. First, we found that Tm injection induced locomotor impairment, dopaminergic neurons death, and activation of astroglia. In addition, we observed an extensive  $\alpha$ -synuclein oligomerization in SNpc of Tm-injected animals when compared with control. In this context, the classical 6-OHDA neurotoxin-based model was employed as an established positive control for PD [31, 37, 38]. Finally, animals challenged with Tm presented increased levels of ER stress markers, indicating that the UPR signaling was activated in this new animal model, which in turn recapitulates several features of PD. Therefore, we propose the intranigral Tm injection as a new ER stress-based model for the study of PD in vivo.

## Materials and Methods

### Animals

Experimental procedures were performed in accordance with the Ethics Committee for Research on Animals UFPR (protocol #778). Fifty-eight adult male Wistar rats 9 weeks old, weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. Animals were housed in groups of five, in polypropylene cages and maintained under standard conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C) and illumination (12/12 h light/dark cycle). The animals had free access to water and food throughout the experiments.

### Surgical Procedures

Animals were anesthetized using ketamine/xilazine (100 mg/kg; 20 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil) intraperitoneally, and placed in a stereotaxic frame. The following coordinates were used to the bilateral injury, bregma as a reference: SNpc (AP) = -5.3 mm, (ML) =  $\pm$  2.1 mm e (DV) = -7.8 mm (Paxinos and Watson, 2005). 5 mg/ml stock solution of Tm (Sigma) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma). Needles were guided to the region of interest for a bilateral infusion of 0.5  $\mu$ L of Tm prepared at a final concentration of 0.2 mg/mL diluted in PBS (1:25 dilution from the stock solution). As a positive control of the lesion, 1  $\mu$ L of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Sigma) dissolved in PBS at a final concentration of 1 mg/mL, supplemented with

0.2 % of ascorbic acid was injected. Also, the sham procedure (control group) received 1  $\mu$ L of the vehicle (PBS:DMSO, 1:25). The infusions were performed with an electronic pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) at a flow rate of 0.33  $\mu$ L/min. After each infusion the needle was kept in the injection site for additional 2 min to avoid reflux.

### Footprint Analysis

One week after surgery, animals were evaluated for motor coordination and balance [39]. A 100-cm long, 10-cm wide runway (with 35-cm high walls) was used for footprint test. Before collecting footprints, each animal was able to explore the runway for 5 min. After recognition, animal's paws were painted with water-based nontoxic paint (using different color for hindpaws and forepaws), and each animal was immediately placed at one end of the runway previously covered with a strip of paper as template. Data were collected when the animal was able to walk without interruption giving at least four steps in a straight line for each paw (initiation and finishing of the run were ignored) [40, 41]. The paper was removed for analysis and fore and hind step parameters were analyzed according to an established methodology [40].

### Western Blot Analysis

To determine ER stress within the *substantia nigra* (SN), 7 days after injection with 6-OHDA or Tm, animals were decapitated, their brains were rapidly ice-removed and SN was dissected. Until processed for analysis, tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in lysis buffer containing 50 mM NaCl, 50 mM Hepes, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, and complete protease inhibitor mixture EDTA-free (Roche). Samples were manually homogenized on ice using a micropestle (Eppendorf). After centrifugation (10 min  $12,000\times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ ), supernatant was collected. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Germany). Samples were subjected to SDS-PAGE and proteins transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membranes were then blocked in 5 % slime milk or BSA in TBS-T (blocking solution) for 1 h at room temperature and incubated 16 h with the desired antibody diluted in blocking solution. Employed antibodies were: mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (A5441, Sigma), anti- $\alpha$ -synuclein (610787 BD), anti-CHOP (MA1-250, Thermo Scientific), anti-KDEL (ADI-SPA-827, Enzo Life Science) and anti-GAPDH (#2118, Cell Signaling). After primary antibody incubation, membranes were extensively washed with TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Sigma) in blocking solution for 1 h at room temperature. Finally, membranes were washed again and immune complexes were detected using the ECL

chemiluminescent detection system (GE Healthcare Life Sciences, Brazil). The protein levels were quantified by densitometry using ImageJ v1.47 software (National Institutes of Health, USA).

### Immunohistochemistry

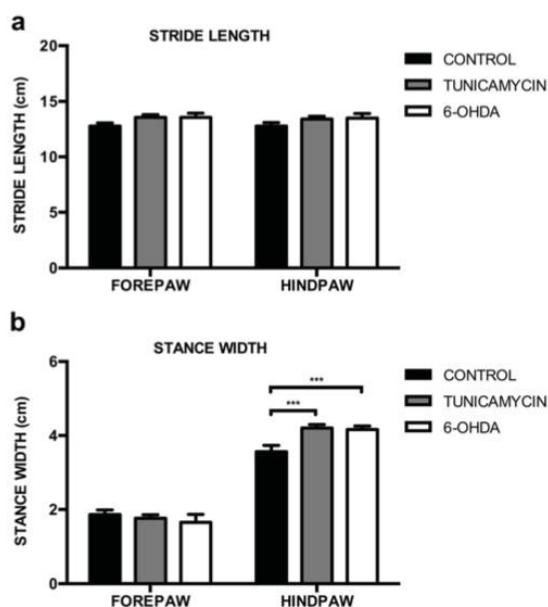
Animals were deeply anesthetized using ketamine/xilazine (100 mg/kg/20 mg/kg), and transcardially perfused with PBS, followed by 4 % paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) at a constant flow of 1 mL/min. Fixed brains were quickly removed and post-fixed by immersion in 4 % paraformaldehyde for 24 h. The brains were immersed in 30 % sucrose solution for cryoprotection, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until cryostat sectioning (Leica Lm 1850, Germany). Brains were sliced into 30- $\mu$ m coronal sections (Bregma:  $-5.16$  to  $-5.40$ ) and stored in anti freezing solution (30 % ethylene glycol, 30 % sucrose in PBS) at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Free-floating sections were permeabilized for 15 min at room temperature with 0.1 % Triton X-100 in PBS, treated with 0.3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 20 min, washed three times with PBS followed by blocking with 5 % BSA for 30 min and incubation overnight with mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) (T2928, Sigma) or rabbit anti-GFAP (Z0334, DAKO) antibody at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibodies were detected using HRP immunostaining kit (Diagnostic Biosystems). Tissues were dehydrated in aqueous graded ethanol solutions from 70 to 100 % and then immersed twice in xylene and mounted with Entellan New (Merck).

### Statistical Analysis

Differences between the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

### Results

We first examined whether the ER stressor Tm could induce locomotor disturbances in animals subjected to direct drug delivery into SNpc, as typically observed in other well-established animal model of PD [31, 37, 38]. Seven days after challenging rats with a single bilateral injection of Tm or 6-OHDA, footprint test was performed to assess locomotor performance. Quantitative analyzes showed absence of statistical differences in the stride length of hindpaw and forepaw between groups (Fig. 1a). While the stance width of the forepaws did not show difference between groups, hind paws instead was significantly broader in Tm- and 6-OHDA-injected ( $P < 0.01$ ) animals [ $F$  [2, 24]= 7.986;  $P = 0.0022$ ] (Fig. 1b) in comparison with the control group.



**Fig. 1** Footprints reveal gait abnormalities in animals challenged by Tm. **a** Stride lengths and **b** stride width for hind- and fore-paws measured with the footprint test. Data is represented as the mean  $\pm$  SEM (CONTROL  $n = 10$ ; TUNICAMYCIN  $n = 8$ ; 6-OHDA  $n = 9$ ), asterisks indicate statistical differences (\*\*\*)  $p \leq 0.01$  compared with the control group

After locomotor assessment, animals were sacrificed and brains evaluated for dopaminergic neuronal loss by TH immunostaining at SNpc level. Figure 2 shows representative images of coronal midbrain sections of TH-immunoreactive neurons for control (sham), Tm and 6-OHDA (positive control) groups (Fig. 2a–c, respectively). Quantification (Fig. 2d) of TH-immunopositive neurons in SNpc showed a decrease of 25 % ( $P < 0.05$ ) and 22 % ( $P < 0.05$ ) for Tm and 6-OHDA groups respectively, when compared to the control group [ $F [2, 10] = 6.497$ ;  $P = 0.0156$ ].

As a hallmark for neurodegeneration, reactive astrogliosis was examined with antibody against GFAP (Fig. 3) [42]. GFAP immunohistochemistry of coronal midbrain section from Tm and 6-OHDA injected animals showed  $\sim 2.6$  ( $P < 0.0001$ ) and  $\sim 2.9$  increasing fold ( $P < 0.0001$ ) of GFAP<sup>+</sup> astrocytes when compared to control animals [ $F [2, 10] = 33.11$ ;  $P < 0.0001$ ], respectively (Fig. 3d). In addition, astrocytes from Tm and 6-OHDA animals presented morphological changes [42] such as cellular hypertrophy and up-regulated expression of GFAP (Fig. 3b'–c', respectively), when compared to control animals (Fig. 3a').

Based on previous studies that associate ER stress to protein misfolding [43–45], and because  $\alpha$ -synuclein misfolding is a hallmark of PD [28, 46], we analyzed  $\alpha$ -synuclein expression and its oligomeric status by western blot after Tm treatment. Interestingly, analysis of  $\alpha$ -synuclein expression

showed no difference in monomeric  $\alpha$ -synuclein levels between groups ( $P = 0.4336$ ) (Fig. 4a, mid panel and Fig. 4b). However, Tm injected animals showed increased high molecular weight forms of  $\alpha$ -synuclein ( $P < 0.01$ ) [ $F [2, 11] = 9.633$ ;  $P = 0.0038$ ] (Fig. 4a, upper panel and Fig. 4c) indicating that the ER stressor Tm can induce in vivo one of the molecular features of PD.

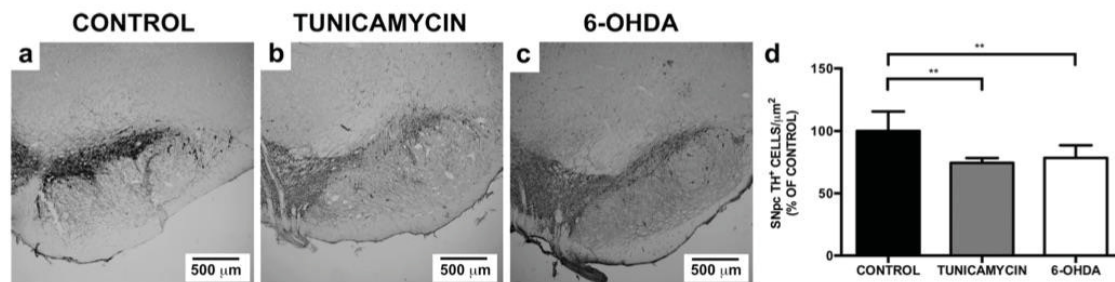
As a major consequence of ER stress, UPR activation triggers repression of translation and up-regulation of ER-resident chaperones after accumulation of misfolded proteins [47, 48]. In order to measure the intensity of ER stress observed after injury, ER-resident chaperones were evaluated by western blot with anti-KDEL tetrapeptide signal (Fig. 5a). Quantification of ER-resident chaperone levels presented an  $\sim 2.9$  and  $\sim 2.5$ -fold increase for GRP78 ( $P < 0.05$ ) [ $F [2, 12] = 6.411$ ;  $P = 0.0128$ ] (Fig. 5c), and  $\sim 9.4$  ( $P < 0.001$ ) and  $\sim 7.5$ -fold ( $P < 0.05$ ) increase for GRP94 for Tm- and 6-OHDA-treated animals, respectively [ $F [2, 12] = 8.695$ ;  $P = 0.0046$ ], when compared to control animals (Fig. 5b), indicating that both Tm and 6-OHDA challenges increase ER-resident chaperones.

Upon ER stress, GRP78/GRP94 luminal chaperones dissociate from ER-resident membrane proteins, which transmit downstream UPR activation signals to the cytoplasm [21, 49]. To clarify if the dopaminergic lesion (Fig. 2) was accompanied by PERK pathway signaling modulation, we performed western blot analysis of CHOP in SN samples (Fig. 6a). Despite the PERK-CHOP pathway has been described as the major UPR-associated pro-apoptotic branch [21, 50] we only observed a tendency to increase levels of CHOP in Tm group (Fig. 6b,  $P < 0.10$ ) when compared to the control group, suggesting that other UPR pathway could be involved in neuronal cell death. Confirming previously described results [30], animals presented increased expression of CHOP under 6-OHDA treatment (Fig. 6b,  $P < 0.05$ ) [ $F [2, 15] = 4.649$ ;  $P = 0.0268$ ], reinforcing the role of ER stress in these established animal PD model.

## Discussion

There are several factors that may be associated with the genesis of neurodegenerative diseases. Genetic causes, inflammation, ATP generation deficiency, increases in ROS production, mitochondrial dysfunction, ER stress and protein degradation pathways have been associated with neurodegenerative progression in PD both in animal models and humans [25, 51]. In the present study, we propose a novel in vivo model to the study of Parkinsonism induced by ER stress.

Increased expression of ER-resident chaperones, such as GRP78 and GRP94 is thought to be a response against ER stress, in order to increase protein-folding capacity and alleviate stress conditions [21, 48, 49]. In view of that, previous in vitro studies demonstrated that 6-OHDA, 1-methyl-4-



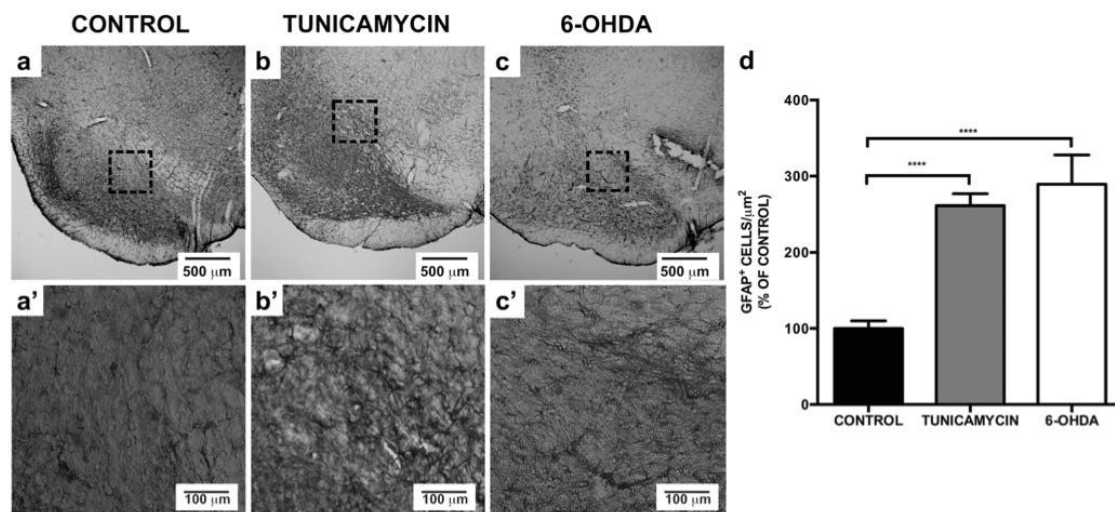
**Fig. 2** Dopaminergic cell loss induced by Tm. Representative microphotographs showing TH-immunoreactivity of midbrain coronal sections of **a** Control, **b** Tm and **c** 6-OHDA injected animals 7 days post-lesion. **d** Quantification of TH-positive cell number in SNpc. Data

are represented as the mean  $\pm$  SEM (*CONTROL*  $n = 5$ ; *TUNICAMYCIN*  $n = 4$ ; *6-OHDA*  $n = 4$ ). Asterisks indicate statistical differences (\*\*)  $p \leq 0.05$

phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) and rotenone induce activation of ER-stress pathways and promote cellular death in neuronal cultures [29, 32], indicating that known drugs that induce PD also induce ER stress. 6-OHDA is a classical neurotoxin that leads to PD by mechanisms of selective dopaminergic neuronal death by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and quinone generation [52]. The fact that cultured sympathetic neurons from PERK<sup>-/-</sup> knockout mice were more susceptible to die than wild-type neurons when exposed to 6-OHDA indicates the importance of ER stress in PD pathophysiology [32] and suggests that other UPR pathways may contribute to induce cell death. Moreover, mice with 6-OHDA intracerebroventricularly injected showed GRP78 increase in striatum [30]. Our data extend these findings as demonstrated by the increase in both GRP78 and GPR94 expression levels after 6-OHDA

treatment and reinforce the role of the ER stress in the 6-OHDA neurotoxicity rat model. In addition, the ER stressor employed in this study, Tm, also increased levels of GRP78 and GRP94 7 days after lesion (Fig. 5a–c), as similarly observed for GRP78 after ventricular administration of Tm and thapsigargin [53]. Although CHOP induction is classically associated to PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway, CHOP levels of Tm injected animals showed no statistical difference when compared to the control group (Fig. 6), suggesting that increased levels of GRP78/GRP94 after lesion (Fig. 5a–c) could be related to other ER-stress pathways, like ATF6 or IRE1 [54–57]. Taken together, these results suggest that ER stress is a common event in these models of PD.

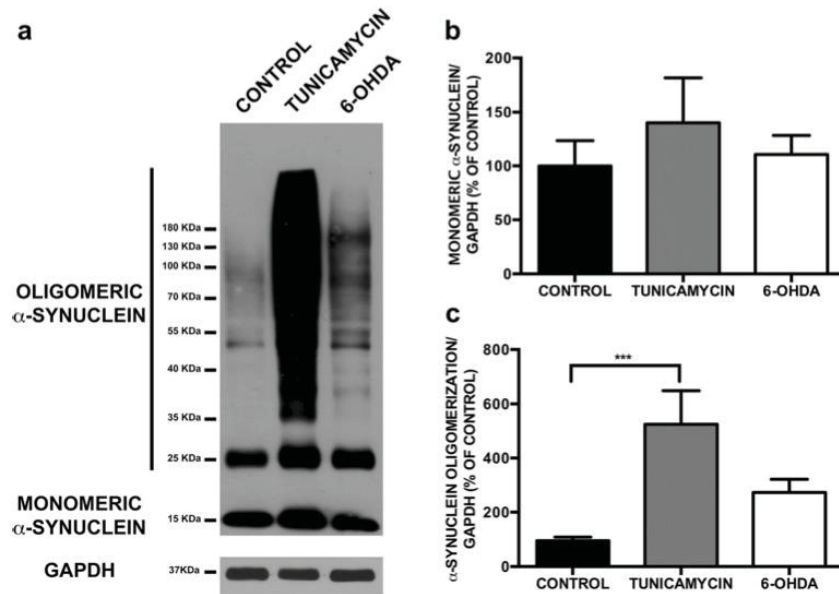
Under ER stress conditions, activation of PERK pathway leads to eIF2 $\alpha$  phosphorylation, activating transcription factor



**Fig. 3** Reactive astrogliosis in response to Tm lesion. Representative microphotographs showing GFAP-immunoreactivity in SN from **a** Control, **b** Tm and **c** 6-OHDA injected animals 7 days post-lesion. (**a'**–**c'**) Higher magnifications of the boxed areas in **a**–**c**, showing morphology of GFAP-positive cells for Control, Tm and 6-OHDA groups,

respectively. **d** Quantification of GFAP-positive cell number in SNpc. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (*CONTROL*  $n = 5$ ; *TUNICAMYCIN*  $n = 4$ ; *6-OHDA*  $n = 4$ ). Asterisks indicate statistical differences (\*\*\*\*)  $p \leq 0.0001$

**Fig. 4** Tunicamycin induces  $\alpha$ -synuclein oligomerization. **a** Tissue homogenates from SN were immunoblotted against  $\alpha$ -synuclein and GAPDH for Control, Tm and 6-OHDA 7 days after treatment. **b** Immunoblot quantification of monomeric  $\alpha$ -synuclein and **c** oligomeric  $\alpha$ -synuclein. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (CONTROL  $n = 5$ ; TUNICAMYCIN  $n = 4$ ; 6-OHDA  $n = 5$ ). Asterisks indicate statistical differences (\*\*\*)  $p \leq 0.01$

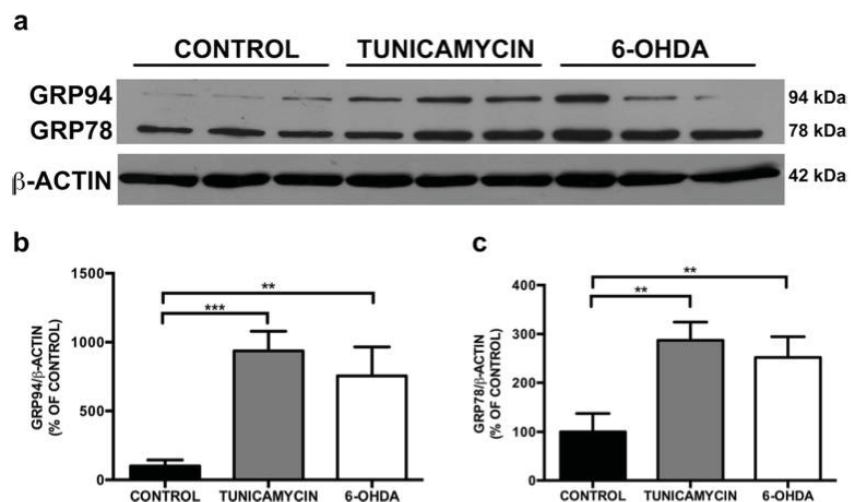


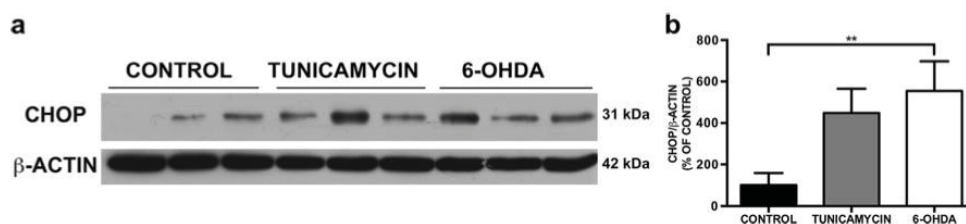
4 (ATF4), CHOP and apoptosis [21, 50]. Different studies demonstrated, in vivo and in vitro, that CHOP-knockout cells are less susceptible to ER stress induced apoptosis [58–60]. This was confirmed later by CHOP knockdown in neuronal cultures that present increased neuronal survival after Tm or thapsigargin exposure [61]. In fact, *chop*<sup>-/-</sup> mice show protection signs after injection of 6-OHDA in SNpc of adult mice [31], and wild-type mice intracerebroventricularly injected with the same neurotoxin showed an increase in CHOP expression (30). Surprisingly, Tm injected animals did not exhibit increased levels of CHOP when compared to 6-OHDA (Fig. 6), suggesting that neuronal loss induced by Tm

injection could be associated to other apoptotic pathways, different from CHOP.

In PD, protein misfolding and aggregation have become one of the central focuses of research. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein has been linked to progression of neurodegeneration in PD [62, 63], and different studies had related  $\alpha$ -synuclein oligomerization with ER-stress condition. Employing an *A53T*  $\alpha$ S transgenic mice model, Colla and collaborators showed that symptomatic animals presented increased levels of ER-chaperones and  $\alpha$ -synuclein ER accumulation in addition to the  $\alpha$ -synuclein oligomers formation and disease progression [45]. Remarkably, in vitro studies

**Fig. 5** Tunicamycin and 6-OHDA induce ER-stress in SN. **a** Tissue homogenates from SN were immunoblotted against KDEL (GRP78 and GRP94) and  $\beta$ -actin for control, Tm and 6-OHDA 7 days after treatment. **b–c** Quantification of GRP78 and GRP94 are represented as the mean  $\pm$  SEM (CONTROL  $n = 5$ ; TUNICAMYCIN  $n = 5$ ; 6-OHDA  $n = 5$ ). Asterisks indicate statistical differences (\*\*)  $p \leq 0.05$ , (\*\*\*)  $p \leq 0.01$





**Fig. 6** Activation level of the pro-apoptotic PERK pathway after Tm and 6-OHDA injections. **a** Tissue homogenates from SN were immunoblotted against CHOP and  $\beta$ -actin for protein loading control. **b** Quantification of

CHOP is represented as the mean  $\pm$  SEM (*CONTROL*  $n = 6$ ; *TUNICAMYCIN*  $n = 6$ ; *6-OHDA*  $n = 6$ ), asterisks indicate statistical differences (\*\*) $p \leq 0.05$

showed that increased levels of ER stress induce  $\alpha$ -synuclein oligomerization in cells overexpressing wild-type  $\alpha$ -synuclein [44, 64]. In the current study, we employed an in vivo pharmacological model of ER stress and showed that the endogenous  $\alpha$ -synuclein is extensively oligomerized (Fig. 4a, c) under a Tm challenge. Importantly, animals used in the experiments do not have any genetic manipulation (e.g.,  $\alpha$ -synuclein transgenic mice), indicating that endogenous levels of  $\alpha$ -synuclein are sufficient to produce oligomerized forms of the protein under ER-stress conditions. Interestingly, in accordance with previous results obtained with human neuroblastoma cell line and mice primary neuronal cultures [44, 64], monomeric  $\alpha$ -synuclein levels did not change after Tm treatment (Fig. 4a, b), suggesting that oligomerization is not caused by an increased  $\alpha$ -synuclein synthesis. In the present study, we observed that Tm treatment was more efficient to produce oligomerized forms of  $\alpha$ -synuclein, when compared to 6-OHDA-rat model (Fig. 4a, c). The observed difference in such oligomerization status between Tm- and 6-OHDA-injected animals could be a consequence of the activation of different UPR-associated pathways due to the nature of each ER stressor molecule. However, our results strongly suggest that not only Tm treatment produces  $\alpha$ -synuclein oligomers but also 6-OHDA. Unexpectedly, the status of  $\alpha$ -synuclein oligomerization has not been previously reported for animals administrated with 6-OHDA, in spite of being a well-established model of Parkinsonism. Further in vivo experiments will be conducted in order to clarify the differences between Tm- and 6-OHDA-induced ER stress and to establish 6-OHDA as a bona fide ER-stressor molecule.

Astrocytes are important players in supporting neurons homeostasis [42, 65]. However, glial reactivity is a major hallmark of every neurodegenerative disease, and because of its relationship with neurons, glial cells could promote the start and progression of neurodegeneration [65–67]. When compared to other CNS regions, SNpc presents the lowest amount of astrocytes [65]. Nevertheless, animal models and post-mortem analyses of patients with PD show increased levels of reactive astroglia in SNpc [68, 69], suggesting that when stressed, these astrocytes could contribute to neurodegenerative progress in PD [65]. In the present study we observed an

increase in GFAP<sup>+</sup> cell number in SNpc of animals treated with Tm and 6-OHDA, suggesting that ER stress could act as an inducer of astroglial reactivity. Reactive astroglia has previously been linked to ER stress induction in mice cortex by a liquid nitrogen lesion model [70]. Authors observed that penumbra area was predominantly dominated by reactive GFAP<sup>+</sup> cells which express high amounts of BiP and OASIS (Old Astrocyte Specific Induced Substance), two proteins involved with UPR signaling [70].

Tm and 6-OHDA lesions inflicted an increase of stance width for hindpaws (Fig. 1b), suggesting that the occurrence of a gait imbalance, since they presented respectively a 25 and 22 % reduction of dopaminergic neurons in SNpc (Fig. 2d). This data are in accordance with previous findings showing that after an intranigral injection of 6-OHDA in an hemiparkinsonian model of PD, footprint tasked animals presented increased distance between hindpaws as soon as 4 days after the lesion [38]. To our knowledge, this is the first demonstration that Tm was employed as an ER-stressor directly in SNpc. It was previously demonstrated that when medaka fish was injected with Tm into cerebrospinal fluid cavity animals presented movement disorder, a behavioral sign related to PD [71]. However, this model presents the limitation of inducing an overall ER-stress, including anatomical regions not directly involved with PD. Furthermore, Fouillet et al. (2012) showed that a chronic intraperitoneal administration of Tm, at low doses, produces a preconditioning with mild UPR that generates neuroprotection in the 6-OHDA mouse model of PD [72]. In contrast, our proposed model employed intranigral drug administration by stereotaxic surgery, which has the advantage to ensure an acute challenge only in a limited region of the CNS and precludes an undesired systemic drug delivery.

Overall, our data confirm that Tm induces in vivo functional and molecular PD conditions, similarly to those induced by 6-OHDA. Induction of UPR and ER stress led to several features of PD, such as  $\alpha$ -synuclein oligomerization, dopaminergic neurons death, and locomotor disabilities. Understanding the genesis of PD is necessary for early diagnosis and advances towards the development of new preventive therapies. We believe that future studies employing Tm lesion models and manipulation of UPR pathways will further characterize the role of the ER stress in the development of PD.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) 467566/2014-3, 456555/2014-5 and 483610/2012-7, CNPq-Redoxoma 573530/2008-4, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors also thank Victor Debbas and Francisco Laurindo from Inco-USP for kindly providing antibody against KDEL. FGM, LSN, MMSL, and SMZ are recipients of CNPq fellowship.

## References

- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1044–1053
- Shiba M, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA (2000) Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 15(4):669–677
- Lima MM, Andersen ML, Reksidler AB, Ferraz AC, Vital MA, Tufik S (2012) Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. *CNS & Neurol Disord Drug Targets* 11(4):359–368
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909
- Przedborski S (2010) Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. *Mov Disord* 25(1):S55–S57
- Tieu K (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1):a009316. doi:10.1101/cshperspect.a009316
- Perier C, Vila M (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(2):a009332
- Jellinger KA (2012) Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med* 16(6):1166–1183
- Dettmer U, Selkoe D, Bartels T (2016) New insights into cellular  $\alpha$ -synuclein homeostasis in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 36:15–22
- Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27(34):9220–9232
- Hettiarachchi NT, Parker A, Dallas ML, Pennington K, Hung CC, Pearson HA, Boyle JP, Robinson P, Peers C (2009)  $\alpha$ -Synuclein modulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem* 111(5):1192–1201
- Winklhofer KF, Haass C (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802(1):29–44
- Tsang AH, Chung KK (2009) Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792(7):643–650
- Chen L, Jin J, Davis J, Zhou Y, Wang Y, Liu J, Lockhart PJ, Zhang J (2007) Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* 356(3):548–553
- Qian L, Flood PM, Hong JS (2010) Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm* 117(8):971–979
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6469–6473
- Roberts HL, Brown DR (2015) Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric  $\alpha$ -synuclein. *Biomolecules* 5(2):282–305
- Kim YM, Jang WH, Quezado MM, Oh Y, Chung KC, Junn E, Mouradian MM (2011) Proteasome inhibition induces  $\alpha$ -synuclein SUMOylation and aggregate formation. *J Neurosci* 30(1–2):157–161
- Krumova P, Meulmeester E, Garrido M, Tirard M, Hsiao HH, Bossis G, Urlaub H, Zweckstetter M, Kügler S, Melchior F, Bähr M, Weishaupt JH (2011) Sumoylation inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation and toxicity. *J Cell Biol* 194(1):49–60
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, Hodara R, Fredenburg R, Wu DC, Follenzi A, Dauer W, Przedborski S, Ischiropoulos H, Lansbury PT, Sulzer D, Cuervo AM (2008) Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 118(2):777–788
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2):89–102
- Kim I, Xu W, Reed JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7(12):1013–1030
- Boyce M, Yuan J (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13(3):363–373
- Yoshida H (2007) ER stress and diseases. *FEBS J* 274(3):630–658
- Hoozemans JJM, Scheper W (2012) Endoplasmic reticulum: the unfolded protein response is tangled in neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 44(8):1295–1298
- Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15(4):233–249
- Mercado G, Castillo V, Soto P, Sidhu A (2016) ER stress and Parkinson's disease: pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Res*. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.042
- Hoozemans JJM, Van Haastert ES, Eikelenboom P, Vos D, R. al, Rozemuller JM, Scheper W (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 354(3):707–711
- Holtz WA, O'Malley KL (2003) Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278(21):19367–19377
- Tanaka K, Fukuoka S, Kawahara S, Kimoto N, Ogawa N (2013) Effect of cabergoline on increase of several ER stress-related molecules in 6-OHDA-lesioned mice. *Neurosci* 34(2):259–261
- Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-V, Ryu EJ, Lu PD, Marciniak SJ, Ron D, Przedborski S, Kholodilov N, Greene LA, Burke RE (2005) CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J Neurochem* 95(4):974–986
- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22(24):10690–10698
- Credle JJ, Forcelli PA, Delannoy M, Oaks AW, Permaul E, Berry DL, Duka V, Wills J, Sidhu A (2015) Alpha-synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease. *NeurobiolDis* 76:112–125
- Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 $\alpha$ , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem* 286(10):7947–7957
- Valdés P, Mercado G, Vidal RL, Molina C, Parsons G, Court FA, Martínez A, Galleguillos D, Armentano D, Schneider BL, Hetz C (2014) Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(18):6804–6809
- Leaver DD, Schneider KM, Rand MJ, Anderson RM, Gage PW, Malbon R (1988) The neurotoxicity of tunicamycin. *Toxicology* 49:179–187
- Ebert DA, Hann HJ, Bohn MC (2008) Progressive degeneration of dopamine neurons in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's

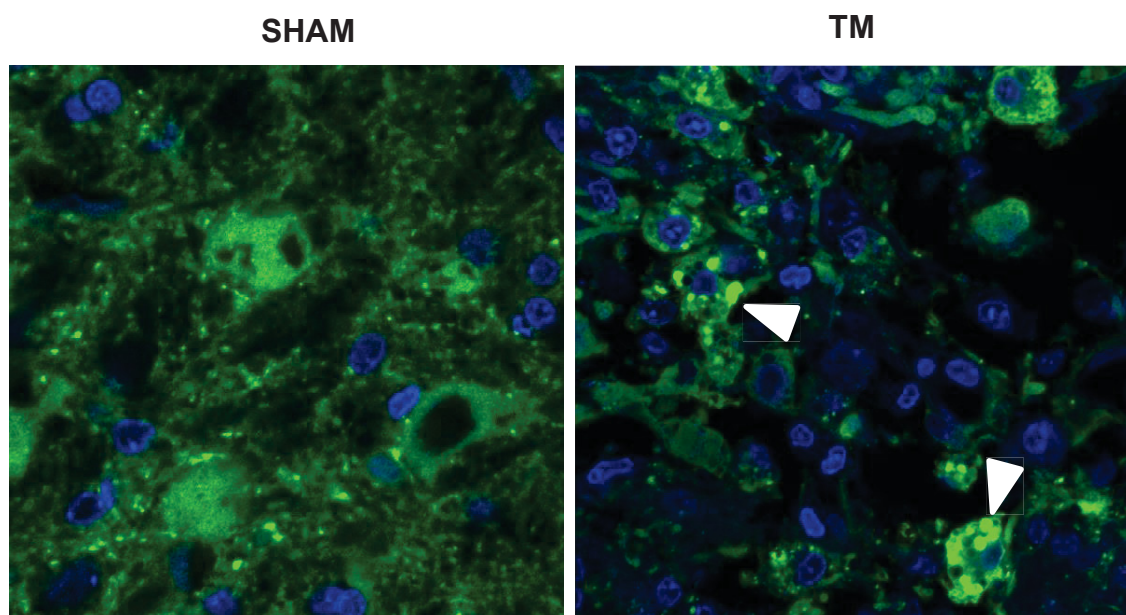
- disease does not involve activation of caspase-9 and caspase-3. *J Neurosci Res* 86:317–325
38. Hsieh T-H, Chen J-J, Chen L-H, Chiang P-T, Lee H-Y (2011) Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. *Behav Brain Res* 222(1):1–9
  39. Carter, R. J., Morton J., Dunnet, S. B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8: Unit 8.12. doi: 10.1002/0471142301.ns0812s15
  40. Pallier PN, Drew CJG, Morton AJ (2009) The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain Res Bull* 78(6):347–355
  41. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, et al. (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 19(8):3248–3257
  42. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1):7–35
  43. Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guégan C, Nagai M, Xu Z, Sosunov A a, et al. (2006) Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):6025–6030
  44. Jiang P, Gan M, Ebrahim AS, Lin W-L, Melrose HL, Yen S-HC (2010) ER stress response plays an important role in aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Mol Neurodegener* 5(1):56. doi:10.1186/1750-1326-5-56
  45. Colla E, Coume P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL, et al. (2012) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of  $\alpha$ -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32(10):3306–3320
  46. Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819–822
  47. Mori K (2000) Tripartite management of unfolded Proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101:451–454
  48. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519–529
  49. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(3):a013169
  50. Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13(3):184–190
  51. Hoozemans JJM, Van Haastert ES, Nijholt D a T, Rozemuller AJM, Scheper W (2012) Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 10(1–4):212–215
  52. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2(3):484–494
  53. Liu ZC, Fu ZQ, Song J, Zhang JY, Wei YP, Chu J, Han L, Qu N, Wang JZ, Tian Q (2012) Bip enhanced the association of GSK-3 $\beta$  with tau during ER stress both in vivo and in vitro. *J Alzheimers Disease* 29(4):727–740
  54. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366:585–594
  55. Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11(4):381–389
  56. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14(1):20–28
  57. Lu W, Hagiwara D, Morishita Y, Tochiya M, Azuma Y, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Oyadomari S, Mori K, Arima H (2016) Unfolded protein response in hypothalamic cultures of wild-type and ATF6 $\alpha$ -knockout mice. *Neurosci Lett* 612:199–203
  58. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, et al. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4(11):e374
  59. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982–995
  60. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, et al. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18(24):3066–3077
  61. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP (2010) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 30(50):16938–16948
  62. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19(6):533–542
  63. Winner B, Jappelli R, Maji S, K. D. P. A, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R (2011) In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10):4194–4199
  64. Jiang P, Gan M, Lin W-L, Yen S-HC (2014) Nutrient deprivation induces  $\alpha$ -synuclein aggregation through endoplasmic reticulum stress response and SREBP2 pathway. *Front Aging Neurosci* 6:268. doi:10.3389/fnagi.2014.00268
  65. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A (2010) Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 63(1–2):189–211
  66. Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ (2011) Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(43):17803–17808
  67. Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragnolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(44):18126–18131
  68. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46(4):598–605
  69. Damier P, Hirsch CE, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52(1):1–6
  70. Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, Ogata M, Kanemoto S, Otori K, Iseki K, et al. (2005) OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 7(2):186–194
  71. Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R (2010) Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induce Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. *J Neurochem* 115(5):1150–1160
  72. Foullet A, Levet C, Virgone A, Robin M, Dourlen P, Rieusset J, Belaidi E, Ovize M, Touret M, Nataf S, Mollereau B (2012) ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8(6):915–926

## **4.2 Capítulo II - Avaliação das modificações pós-traducionais associadas à agregação de $\alpha$ -sinucleína**

### 4.2.1 Avaliação da agregação de $\alpha$ -sinucleína

Uma vez evidenciada a agregação de  $\alpha$ -sinucleína na SN de animais injetados com TM, mas não em animais injetados com 6-OHDA por western blot, decidimos visualizar os agregados proteicos por imuno-histoquímica contra  $\alpha$ -sinucleína em animais injetados com TM (Figura 1).

Nossos resultados confirmaram a presença de agregados intracitoplasmáticos de  $\alpha$ -sinucleína na SN de animais injetados com TM, quando comparados com animais pertencentes ao grupo Sham, corroborando os resultados obtidos por western blot que sugeriram a agregação desta proteína após lesão (Figura 1).



**Figura 3.- TM induz a formação intracitoplasmática de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína.** Fotomicrografias de fatias transversais de encéfalos de animais pertencentes aos grupos SHAM e TM, imunomarcadas para  $\alpha$ -sinucleína (verde) e contra-marcadas com DAPI (azul). Flechas indicam agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína.

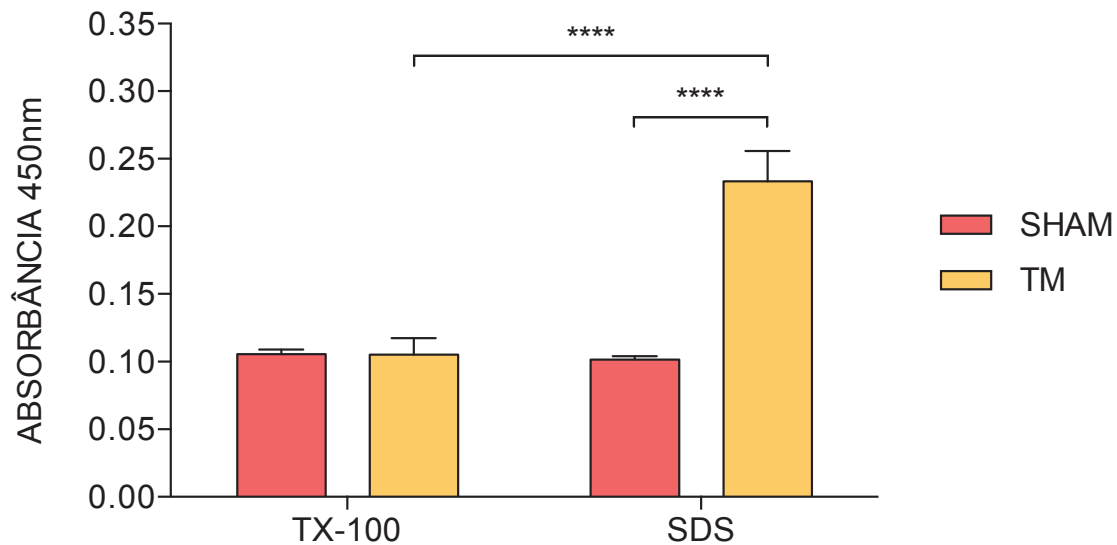
Embora a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína seja a característica principal da DP, o melhor entendimento sobre quais são os mecanismos biológicos e moleculares que favorecem a formação desses agregados durante a progressão da doença é importante para contribuir com o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico precoce e estratégias

terapêuticas inovadoras. Nesse sentido, no presente projeto procurou-se investigar se algumas das diferentes MPTs já detectadas nos agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína na DP (Oueslati e cols., 2010; Muntané e cols., 2012; Barret e Greenamyre, 2015), poderiam ser também encontradas no modelo de TM. Das MPTs já descritas como importantes na agregação da  $\alpha$ -sinucleína, as mais importantes nesse processo são: 1) fosforilação, 2) carbonilação, 3) clivagem, 4) cross-linking, 5) ubiquitinação e 6) nitração. Uma vez que a solubilidade das proteínas é modificada, como consequência das MPTs, as mesmas podem começar o processo de agregação (Oueslati e cols., 2010; Tanase e cols., 2016; Uversky, 2017). Para analisar as MPTs da  $\alpha$ -sinucleína no modelo utilizado neste trabalho, como detalhado na metodologia, primeiramente as proteínas foram separadas em 2 frações: (1) solúveis em Tritón X-100 (TX-100) e (2) solúveis em SDS (ou insolúveis em TX-100), e posteriormente avaliadas diferentes MPTs para ambas frações, em SN e CE.

## **4.2.2 Modificações Pós-Traducionais**

### **4.2.2.1 Fosforilação de $\alpha$ -sinucleína**

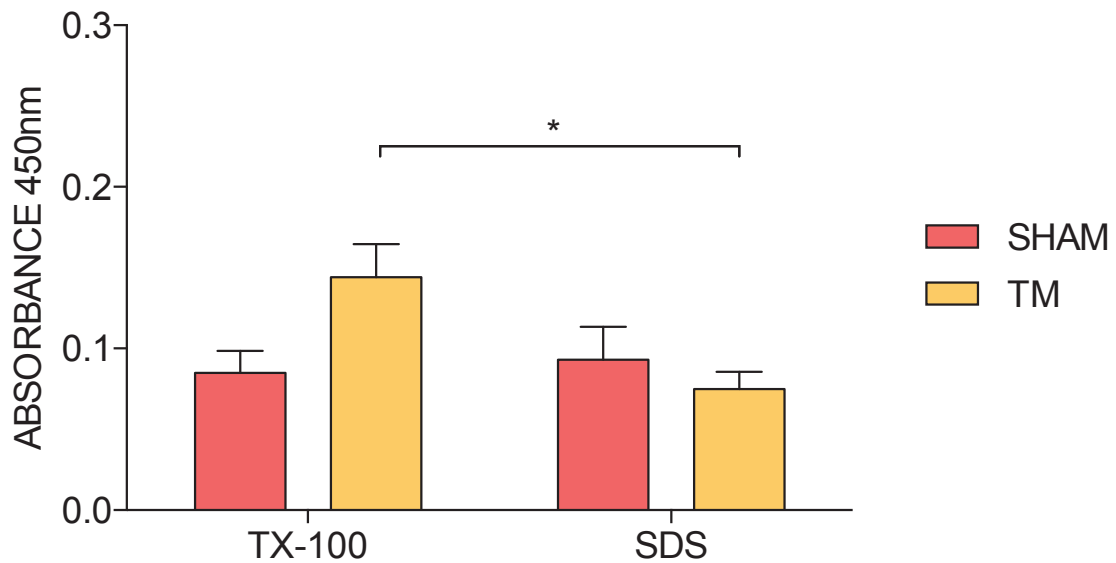
Análises em amostras *post-mortem* de diferentes sinucleopatias mostraram um aumento importante da insolubilidade e dos níveis de fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína em estágios avançados das doenças (Zhou e cols., 2011; Oueslati 2016). No presente trabalho, os níveis de fosforilação da  $\alpha$ -sinucleína no resíduo 129 de serina (S129) foram avaliados por ensaio de ELISA de captura, segundo o protocolo de Bétemps (2015). Os resultados obtidos para a análise da SN não mostraram diferenças nos níveis de p-S129- $\alpha$ -sinucleína na fração solúvel em TX-100 entre os grupos TM e SHAM (Figura 2).



**Figura 4.- O estresse de RE induzido por TM aumenta os níveis de fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína na SN.** Fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína foi avaliada nas frações proteicas solúveis em TX-100 e SDS por ELISA de captura. Resultados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 5; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

No entanto, quando analisada a fração de proteínas solúveis em SDS, o grupo injetado com TM apresentou maiores níveis de p-S129- $\alpha$ -sinucleína quando comparado com o grupo SHAM (Figura 2). Além disso, quando comparadas ambas frações de proteínas dentro do grupo injetado com TM, os níveis de p-S129- $\alpha$ -sinucleína mostraram um aumento significativo novamente na fração de proteínas solúvel em SDS (Figura 2).

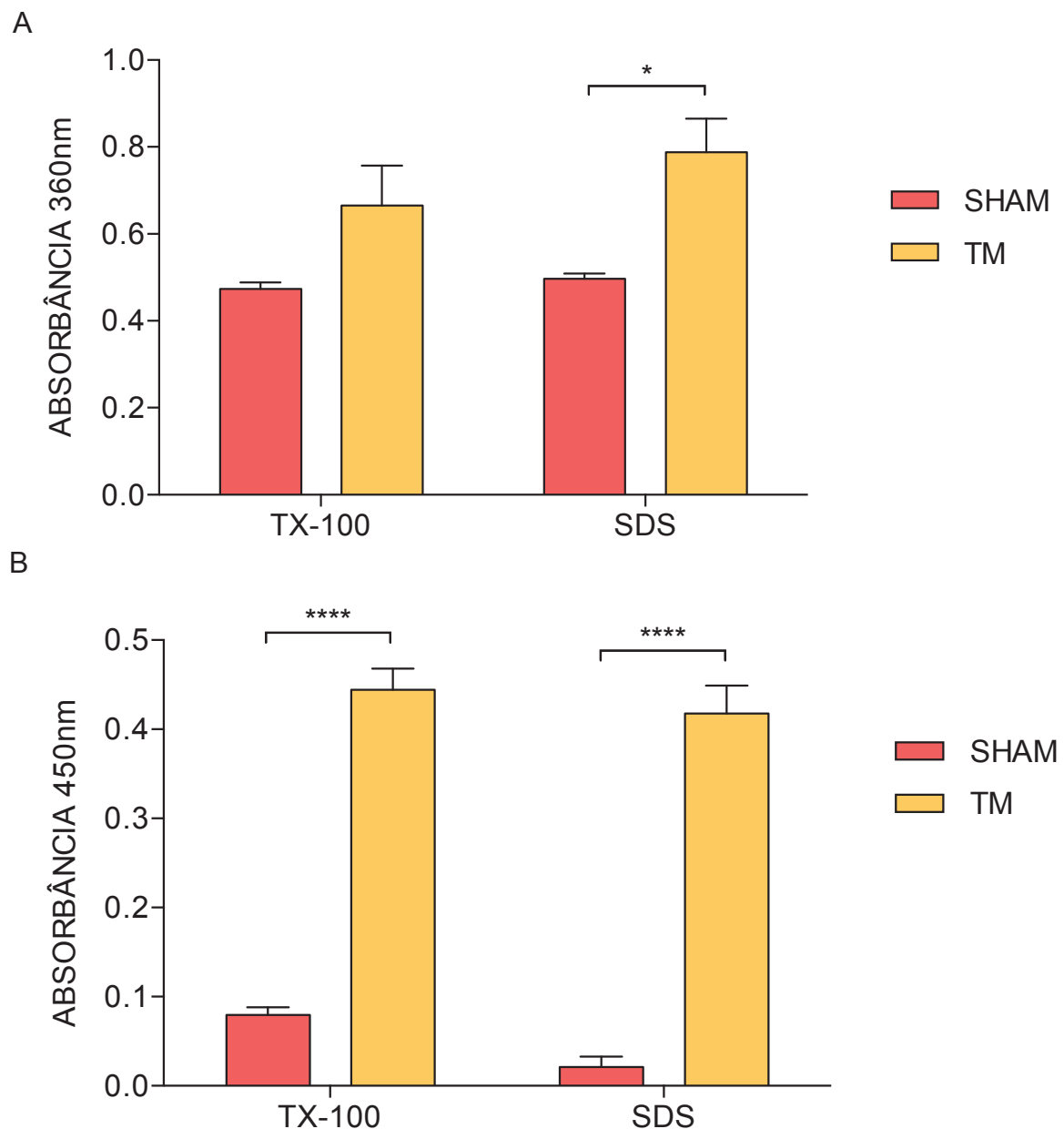
Quando analisados os níveis de p-S129- $\alpha$ -sinucleína no CE, os animais injetados com TM não apresentaram diferenças nos níveis de fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína, entre ambos grupos, para nenhuma das duas frações de proteínas avaliadas (Figura 3). No entanto, dentro do grupo injetado com TM, a fração proteica solúvel em TX-100 apresentou níveis maiores de p-S129- $\alpha$ -sinucleína quando comparado com a fração proteica solúvel em SDS (Figura 3).



**Figura 5.- O estresse de RE induzido por TM na SN aumenta os níveis de fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína no CE.** Fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína foi avaliada nas frações proteicas solúveis em TX-100 e SDS por ELISA de captura. Resultados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 5; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.2.2 Carbonilação

A carbonilação é um tipo de MPT comumente observado no desequilíbrio da proteostase em doenças degenerativas e doenças inflamatórias crônicas (Canizzo e cols., 2011; Canizzo e cols., 2012). Particularmente, tem sido demonstrado um importante incremento na carbonilação de proteínas da SN de pacientes com DP (Dexter e cols., 1989; Floor e Wetzel, 1998) assim como em  $\alpha$ -sinucleína em modelos *in vitro* desta doença (Esteves e cols., 2009; Jang e cols., 2010). Primeiramente, os níveis de carbonilação foram avaliados nas frações solúveis em TX-100 e SDS por espectrofotometria e ELISA para proteínas totais, e depois foram avaliados os níveis de carbonilação da  $\alpha$ -sinucleína por ELISA, também em ambas frações proteicas na SN e no CE.

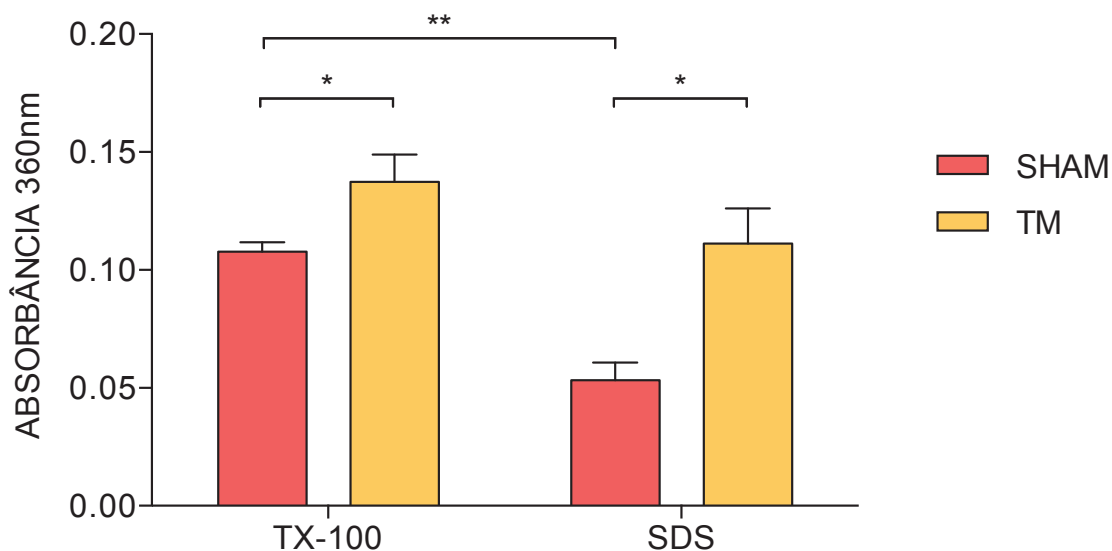


**Figura 6.- O estresse de RE induzido por TM aumenta os níveis de carbonilas em proteínas totais em SN.** Fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína foi avaliada nas frações proteicas solúveis em TX-100 e SDS por ELISA de captura. Análise de carbonilas em proteínas totais por (A) espectrofotometria o (B) ELISA. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 5; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

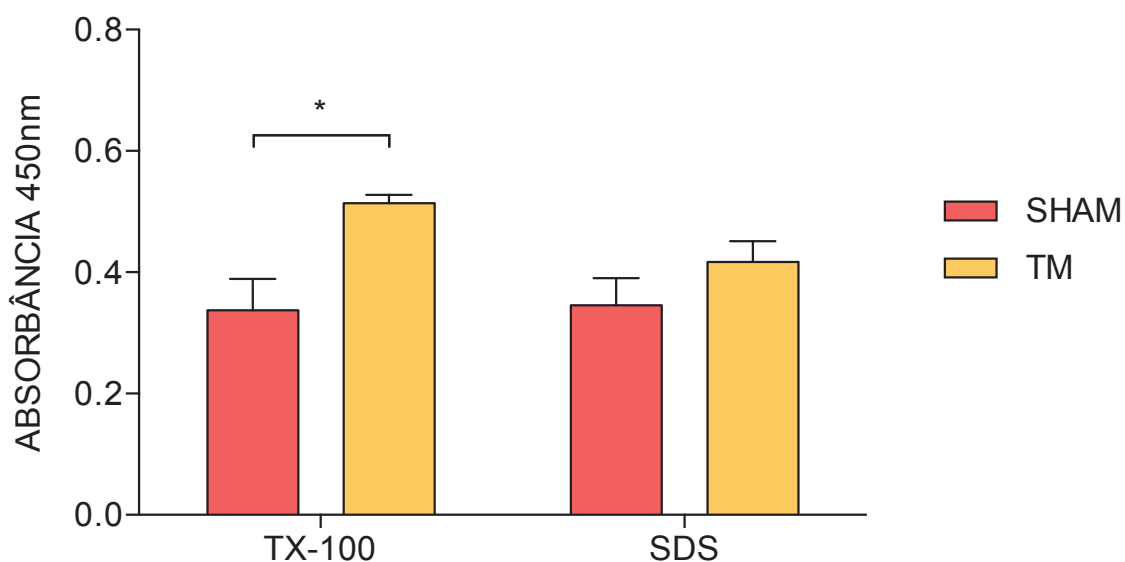
A análise de carbonilas na SN, avaliada por espectrofotometria, mostrou um aumento de carbonilação das proteínas totais só na fração solúvel em SDS do grupo TM, quando comparado com o grupo SHAM (Figura 4A). Embora exista uma tendência de aumento nos níveis de carbonilas totais na fração solúvel em

TX-100 para animais injetados com TM quando comparados com SHAM, essa diferença não apresenta significância estatística. No entanto, quando utilizada uma metodologia modificada de ELISA (Alamdari e colaboradores, 2005) para avaliar carbonilas totais, animais injetados com TM apresentaram um aumento significativo de carbonilação das proteínas totais, quando comparado com SHAM

A



B

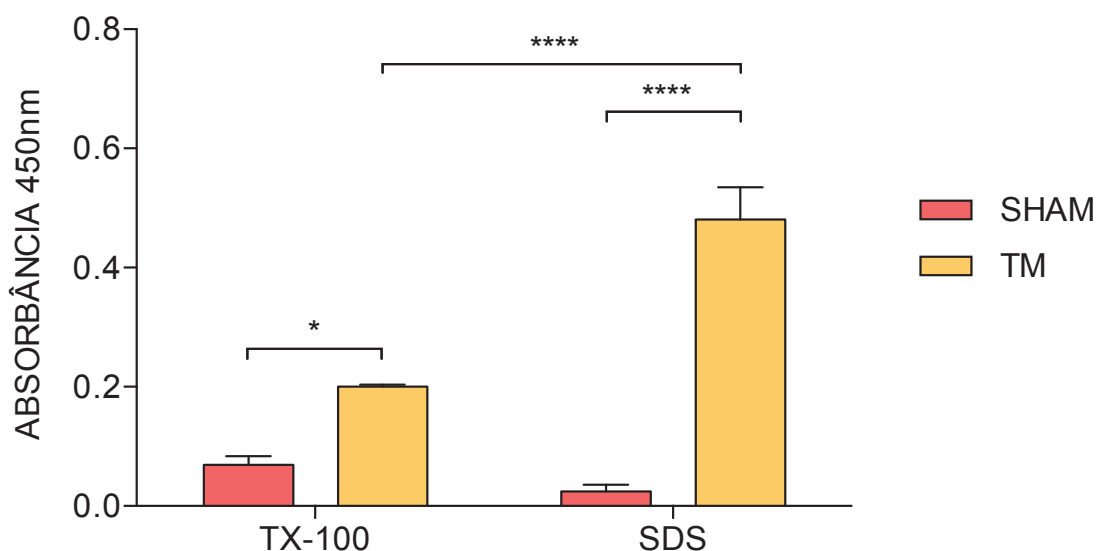


nas duas frações de proteínas (Figura 4B).

**Figura 7.- O estresse de RE induzido por TM na SN aumenta os níveis de carbonilas em proteínas totais no CE.** Carbonilação de proteínas totais foi avaliada nas frações proteicas solúveis em TX-100 e SDS por (A) espectrofotometria e (B) ELISA. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 5; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

Quando avaliados os níveis de carbonilação de proteínas totais no CE por espectrofotometria, os animais injetados com TM apresentaram maiores níveis de proteínas carboniladas nas frações de proteínas solúvel em TX-100 e SDS quando comparados com o grupo SHAM (Figura 5A). Ao mesmo tempo, as amostras solúveis em SDS apresentaram uma diminuição dos níveis de carbonilação quando comparadas com as proteínas solúveis em TX-100 dentro do grupo SHAM (Figura 5A). No entanto, quando utilizado o método de ELISA, as proteínas de animais injetados com TM apresentaram maiores níveis de proteínas carboniladas só na fração de proteínas solúveis em TX-100, em relação ao grupo SHAM (Figura 5B). Embora exista uma tendência de aumento dos níveis de carbonilas totais na fração solúvel em SDS para animais injetados com TM quando comparados com SHAM, essa diferença não apresenta significância estatística

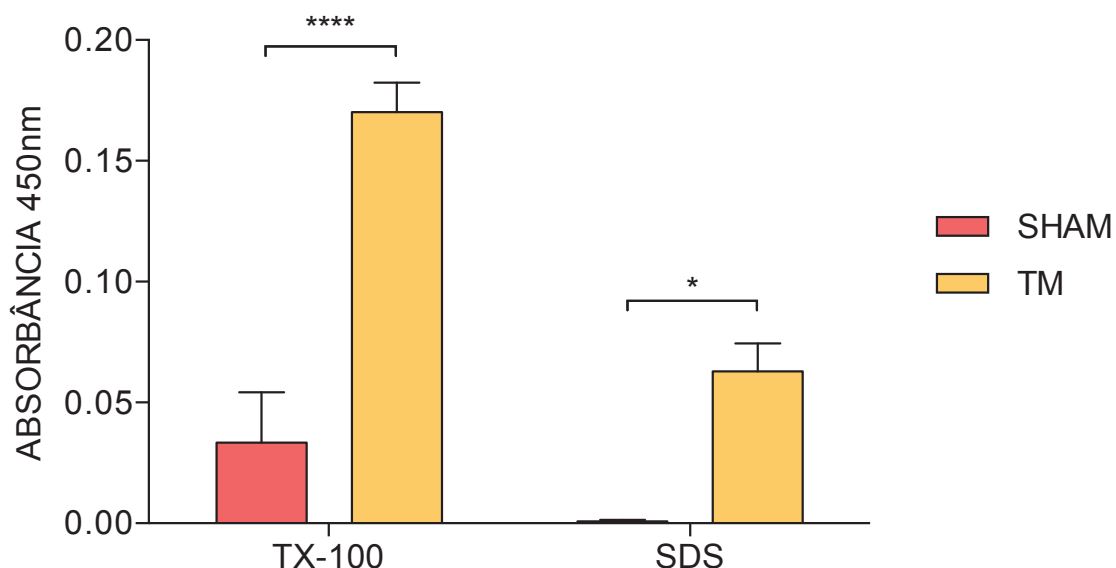
Considerando que a TM foi eficiente na agregação de  $\alpha$ -sinucleína, que a carbonilação é uma MPT associada com a agregação de proteínas, e que os níveis dessa MPT em proteínas totais foram elevados em animais injetados com TM, decidimos avaliar os níveis de carbonilação especificamente na  $\alpha$ -sinucleína. Para isso, no presente estudo foi adaptado o protocolo de Colombo (2015) e avaliado por ELISA.



**Figura 8.- Aumento nos níveis de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína em SN induzido por TM.** Carbonilação da  $\alpha$ -sinucleína foi avaliada nas frações proteicas solúveis em TX-100 e SDS por ELISA de captura. Análise de  $\alpha$ -sinucleína carbonilada. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 4; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

A análise de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína em SN mostrou um aumento nos níveis de  $\alpha$ -sinucleína carbonilada em ambas frações em animais injetados com TM, quando comparados com animais pertencentes ao grupo SHAM. Além disso, quando comparados os níveis de carbonilação da  $\alpha$ -sinucleína dentro do grupo de animais injetados com TM, foram observados maiores níveis de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína na fração solúvel em SDS em relação à fração solúvel em TX-100 dentro do grupo TM (Figura 6).

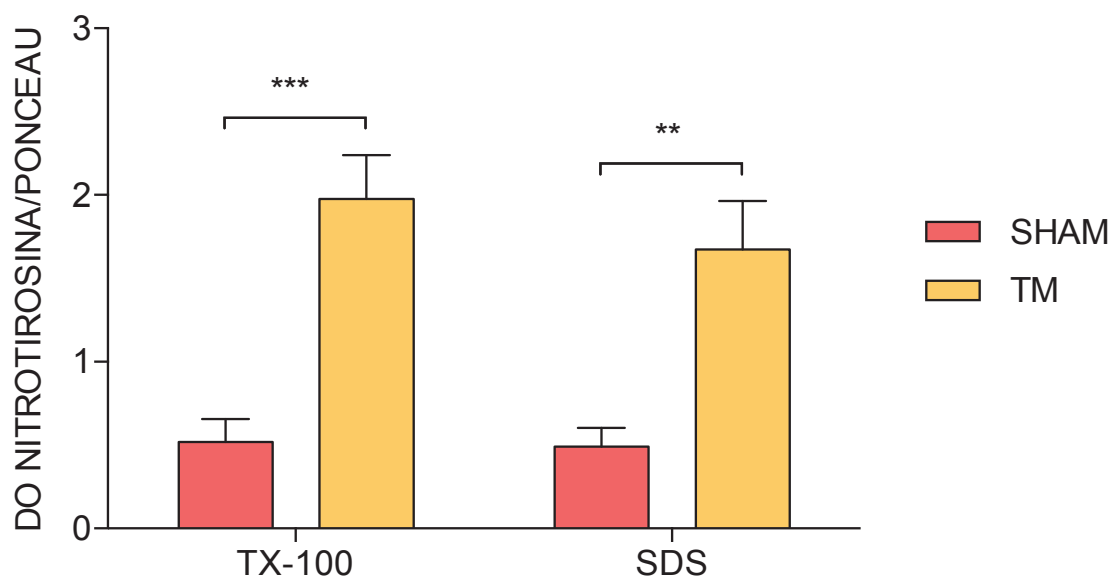
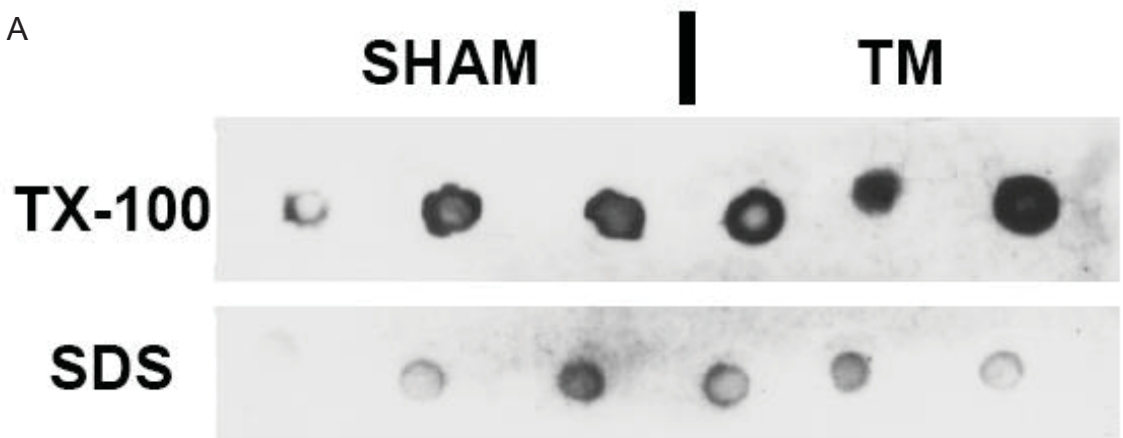
Quando analisados os níveis de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína em CE, também foram encontrados maiores níveis dessa MPT em ambas frações proteicas no grupo injetado com TM, quando comparados com o grupo SHAM (Figura 7). Os resultados também mostraram uma tendência de aumento nos níveis de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína na fração TX-100 em relação à fração SDS, porém sem diferença estatisticamente relevante.

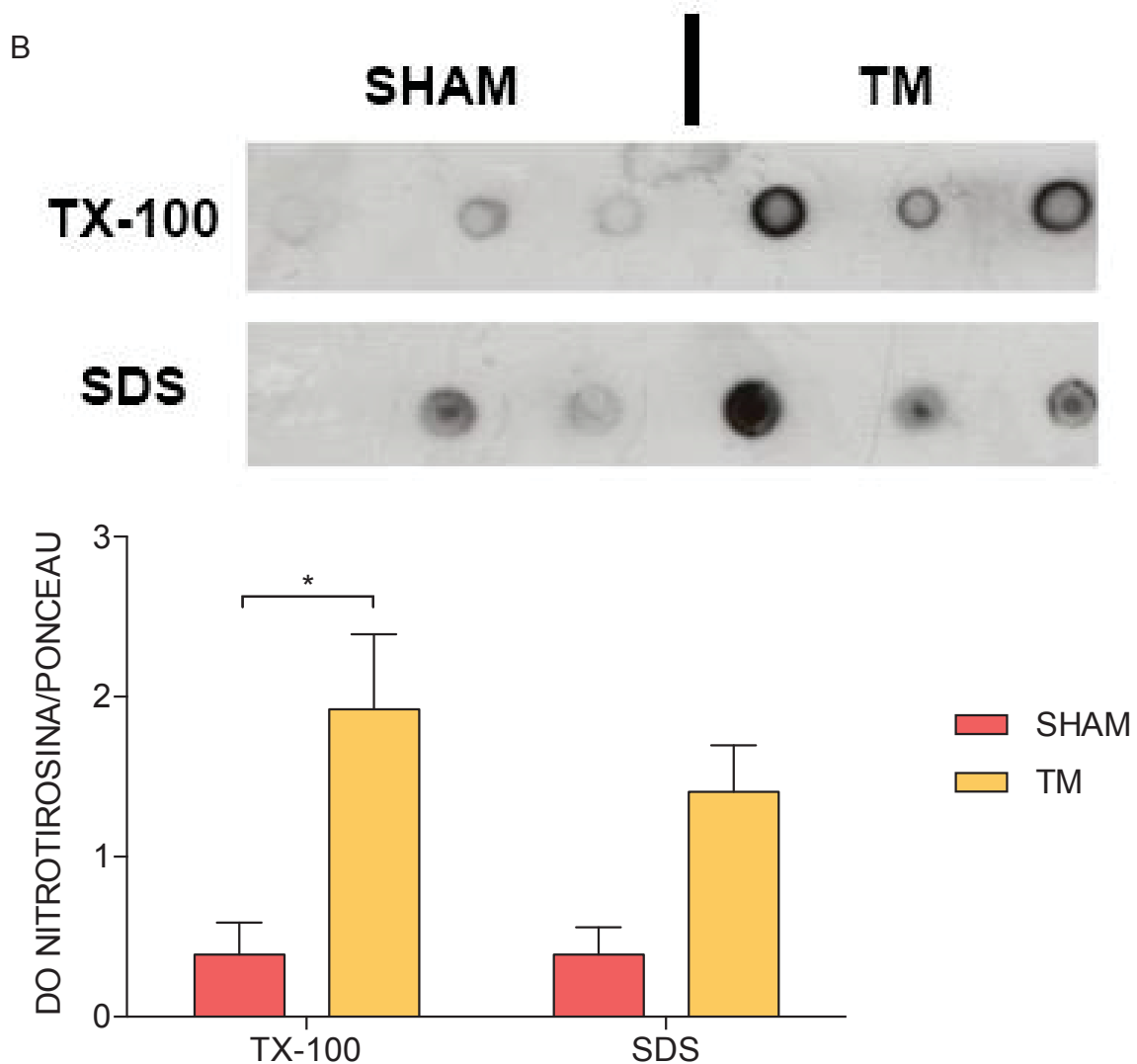


**Figura 9.- Aumento nos níveis de carbonilação de  $\alpha$ -sinucleína em CE.** Análise de  $\alpha$ -sinucleína carbonilada. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 4; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

#### 4.2.2.3 Nitração

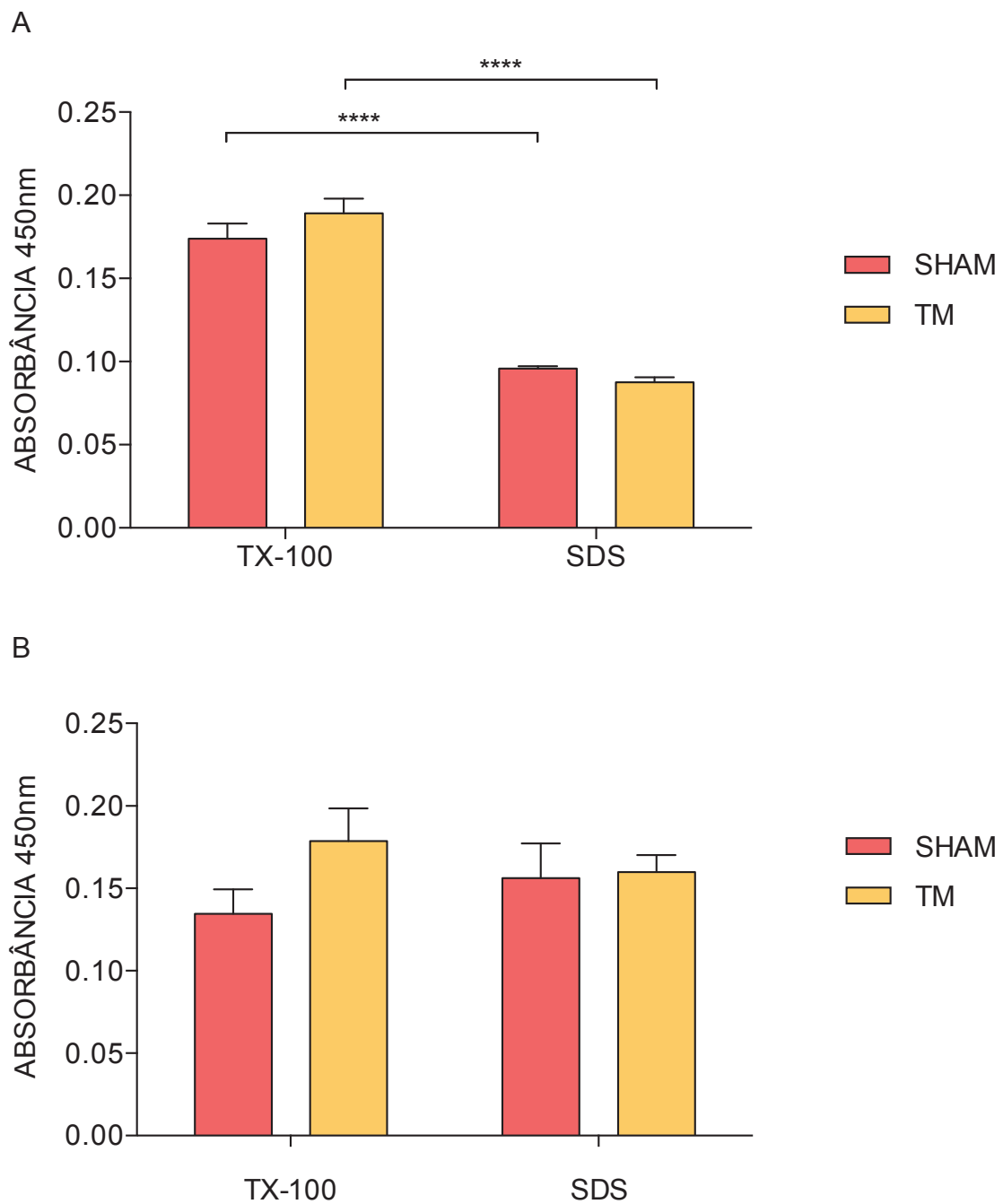
A oxidação das proteínas também ocorre através da nitração de resíduos de tirosina mediado por espécies reativas de nitrogênio, formadas como produtos secundários do metabolismo do óxido nítrico na presença de oxidantes (Turko & Murad., 2002). Com o intuito de avaliar os níveis de nitrotirosina em ambas frações proteicas, solúveis em TX-100 e SDS, um ensaio de dot-blot foi realizado. Os resultados para a SN mostraram um aumento de nitrotirosina em ambas frações proteicas analisadas no grupo TM quando comparado com o grupo SHAM (Figura 8A). Quando avaliados os níveis de nitrotirosina em CE, só foi possível observar diferenças estatisticamente significativas na fração TX-100 de animais injetados com TM em relação com animais do grupo SHAM (Figura 8B).





**Figura 10.-TM aumenta os níveis de nitrotirosina em proteínas totais em SN e CE.** Análise de dot blot para nitrotirosina (A) em SN e (B) no CE. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 4; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

No entanto, quando analisada a nitração de tirosinas da  $\alpha$ -sinucleína por ELISA, não foram encontradas diferenças entre os grupos TM e SHAM, tanto para SN como para CE (Figuras 9 A e B). Porém, os níveis de tirosinas nitradas na  $\alpha$ -sinucleína são mais elevados nas frações solúveis em TX-100 quando comparadas com SDS para ambos grupos de estudo, na SN (Figura 9A).



**Figura 11.- TM não modifica os níveis de nitrotirosina em  $\alpha$ -sinucleína em SN e CE.** Análise de dot blot para nitrotirosina de  $\alpha$ -sinucleína (A) em SN e (B) no CE. Dados representados como média  $\pm$  SEM (SHAM n = 4; TM n = 5), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na DP, o desdobramento e a agregação de proteínas se tornaram um dos focos centrais da pesquisa desde finais do século XX. O acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína tem sido associado à progressão da DP (BOVÉ et al., 2005; HOOZEMANS et al., 2012), e diferentes estudos relacionaram a oligomerização da  $\alpha$ -sinucleína com a condição de estresse do ER (JIANG et al., 2010; COLLA et al., 2012; JIANG et al., 2014). Utilizando um modelo de camundongo transgênico A53T, Colla e colaboradores mostraram que animais sintomáticos apresentavam níveis aumentados de chaperonas de RE e acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína ER, além da formação de oligômeros de  $\alpha$ -sinucleína e progressão da doença (COLLA et al., 2012). Notavelmente, estudos *in vitro* mostraram que níveis aumentados de estresse de ER induzem oligomerização de  $\alpha$ -sinucleína em células superexpressando  $\alpha$ -sinucleína do tipo selvagem (JIANG et al., 2010; JIANG et al., 2014). No presente estudo, utilizamos um modelo farmacológico *in vivo* de estresse de RE e mostramos que a  $\alpha$ -sinucleína endógena é extensamente agregada sob um desafio com TM (Figuras 4 do paper e 1 do Capítulo II). Importante a destacar no presente trabalho, é o uso de animais sem qualquer tipo de manipulação genética (por exemplo, camundongos transgênicos de  $\alpha$ -sinucleína), indicando que os níveis endógenos de  $\alpha$ -sinucleína selvagem são suficientes para produzir espécies de Alta Massa Molecular (AMM) da proteína sob condições de estresse de RE. Curiosamente, de acordo com resultados anteriores obtidos com culturas de células neuronais primárias de linhagem de neuroblastoma e camundongos humanos (JIANG et al., 2010; JIANG et al., 2014), os níveis monoméricos de  $\alpha$ -sinucleína não foram alterados após o tratamento com TM (Figuras 4 A e B do paper), sugerindo que a agregação não é causada por uma sobre-expressão da  $\alpha$ -sinucleína. No presente estudo, observamos que o tratamento com TM foi mais eficiente para produzir espécies de AMM de  $\alpha$ -sinucleína, quando comparado ao modelo da 6-OHDA (Figura 4 C do paper). Este dado sugere que algum estado de oligomerização de  $\alpha$ -sinucleína poderia ser induzida no modelo de 6-OHDA, apesar deste dado nunca

ter sido descrito na literatura até o momento. Tais diferenças poderiam ser explicadas como reflexo dos diferentes modelos de parkinsonismo, uma vez que o de 6-OHDA induz parkinsonismo por um mecanismo molecular aparentemente distinto daquele utilizado pela TM (LEAVER et al., 1988; BARNUM, TANSEY 2010; CÓPPOLA-SEGOVIA et al., 2017). No entanto, nossos resultados sugerem fortemente que não apenas o tratamento com TM induz a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, mas também 6-OHDA. Inesperadamente, o estado de agregação de  $\alpha$ -sinucleína não foi previamente descrito para animais administrados com 6-OHDA, apesar de ser um modelo bem estabelecido de parkinsonismo.

A formação de agregados proteicos é um evento que pode acontecer por MPTs e/ou mutações genéticas que favorecem tanto a sobre-expressão como a estrutura primária das proteínas. Curiosamente, a principal característica da DP é a formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína, característica observada tanto em casos familiares (associados com mutações genéticas que representam 5-10% dos pacientes), quanto nos casos esporádicos (que representam 90-95% dos pacientes) (ANDERSON et al., 2006). Uma vez que aparentemente as modificações genéticas não são fundamentais para a agregação proteica da  $\alpha$ -sinucleína, nas últimas duas décadas foram feitos diferentes esforços para avaliar o papel das MPTs no processo de agregação (SUGEON et al., 2008; OUESLATI et al., 2010). A importância das MPTs nas proteínas reside na possível alteração estrutural e funcional, conduzindo a uma perda ou ganho de função das mesmas.

Os derivados de carbonila são formados diretamente pela oxidação direta catalisada por metal, principalmente nas cadeias laterais dos aminoácidos prolina, arginina, lisina e treonina (MIYATA et al., 1999; HIMMELFARB et al., 2000; NYSTRÖM et al., 2005). A carbonilação proteica induz disfunção proteica

e enzimática, motivo pelo qual é um importante indicador do dano oxidativo ao tecido (ALAM et al., 1997), e sabe-se que as espécies reativas de oxigênio são potenciais indutores na agregação proteica (PERFEITO et al., 2012). Análise post-mortem de pacientes diagnosticados com DP demonstraram um aumento generalizado de proteínas carboniladas no sistema nervoso (ALAM et al., 1997). No entanto, no mesmo estudo foram analisadas amostras de pacientes com corpos de Lewy incidental (pacientes que bem podem desenvolver uma DP ou uma Demência com Corpos de Lewy) os quais não apresentaram diferenças quando comparados com controles (ALAM et al., 1997), estabelecendo uma correlação entre ambos eventos. Por outro lado, foi estabelecido *in vitro* e *in vivo* que o uso de 6-OHDA e rotenona induzem dano oxidativo, possivelmente pelo aumento de carbonilas totais (SHERER et al., 2003; HOLTZ et al., 2006). O aumento da carbonilação de proteínas no presente modelo ainda precisa ser estudado em profundidade, para identificar a presença ou não de carbonilas ligadas diretamente à  $\alpha$ -sinucleína (JANG et al., 2010). Não obstante, nossos dados sugerem fortemente que, no modelo utilizado, a presença de proteínas carboniladas forma parte das duas frações proteicas na SN, e da fração solúvel em TX-100 no CE. Tanto em proteínas totais quanto em  $\alpha$ -sinucleína, a SN apresenta maiores níveis de carbonilação na fração solúvel em SDS em relação a fração TX-100. No entanto, quando analisado o CE, as frações solúveis em TX-100 apresentam maiores níveis de carbonilação em comparação com a fração SDS, tanto para proteínas totais quanto para  $\alpha$ -sinucleína. Essas diferenças entre os tecidos podem se dever ao efeito diferencial direto do estresse de RE na SN e não no CE. Desta maneira, o aumento nos níveis de proteínas totais carboniladas, e de  $\alpha$ -sinucleína carbonilada no CE possa ser consequência de: (1) transporte anterógrado de proteínas oxidadas desde o corpo celular até os terminais sinápticos na SN em direção do CE, assim como por (2) um desequilíbrio homeostático na comunicação SN/CE, que favoreça a oxidação de proteínas nas células do CE. A carbonilação da  $\alpha$ -sinucleína já foi avaliada *in vitro* por espectrometria de massas (JANG et al., 2010) ou por espectrofotometria, depois de imunoprecipitação da  $\alpha$ -sinucleína (ESTEVES et al., 2009). Ambos os trabalhos demonstraram um aumento de carbonilação da  $\alpha$ -

sinucleína, assim como o possível papel desta MPT na oligomerização (ESTEVES et al., 2009) e na secreção desta proteína (JANG et al., 2010). Embora essas metodologias sejam as mais utilizadas, elas são caras e muito trabalhosas. No presente trabalho descrevemos uma metodologia nova para o estudo de carbonilação de proteínas específicas por ELISA. Embora tenham sido avaliados somente os níveis de carbonilação para a  $\alpha$ -sinucleína, esta metodologia poderia ser utilizada para avaliar a carbonilação de outras proteínas.

A oxidação das proteínas também ocorre através da nitração de resíduos de tirosina mediada por espécies reativas de nitrogênio, formadas como produtos secundários do metabolismo do óxido nítrico na presença de oxidantes (TURKO, MURAD 2002). A nitração de tirosinas em Parkinson é um evento envolvido na perda de função da tirosina hidroxilase (enzima chave na síntese da dopamina), na dimerização de  $\alpha$ -sinucleína (TAKAHASHI et al., 2002), estabilização de formas oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína (PAXINOU 2001), e na ativação da resposta imune (BENNER et al., 2008). Estudos tem demonstrado que a nitração de  $\alpha$ -sinucleína impede a formação de fibras devido a estabilização de oligômeros de baixa massa molecular (YAMIN et al., 2003). Quando comparados com o grupo de controle, observamos um aumento de nitrotirosina nas proteínas solúveis em TX-100 e solúveis em SDS de animais tratados com TM, sugerindo que essa MPT não é uma característica dos agregados proteicos observados neste modelo. No entanto, estudos tem demonstrado o aumento dos níveis de nitrotirosina em células que sobre-expressam  $\alpha$ -sinucleína mutada (JIANG et al., 2007), assim como a co-localização com agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína (MATSUZAKI et al., 2004). Por outro lado, diferentes estudos demonstraram que a nitração de  $\alpha$ -sinucleína está associado com o aumento de solubilização desta proteína, resultados que contradizem os resultados de MATSUZAKI e colaboradores (2004). Não obstante, o aumento de nitrotirosina induzido por TM em SN e CE está em concordância com dados recentemente descritos na literatura, onde animais injetados intraperitonealmente com TM apresentaram

aumento de nitrotirosina em aorta (CHOY et al., 2017). Tomados em conjunto, nossos dados corroboram a ideia de que o estresse de RE contribui com o aumento de nitrotirosina em proteínas totais (Figuras 8 A e B). Embora exista uma tendência de aumento nos níveis de nitrotirosina em  $\alpha$ -sinucleína na fração solúvel em TX-100, esta diferença não é estatisticamente significativa. Portanto, o aumento de nitrotirosina parece não estar associado com a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, já que não foram encontradas diferenças entre os grupos de estudo para ambas frações proteicas (Figuras 9 A e B).

Por outro lado, a fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína é outro tipo de MPT que pode acontecer em vários sítios da proteína. Essa modificação é localizada nos corpos de Lewy em casos esporádicos e familiares de DP (FUJIWARA et al., 2003; ANDERSON et al., 2006). A importância dessa MPT na toxicidade da  $\alpha$ -sinucleína é uma pergunta ainda a ser respondida. Gorbatyuk e colaboradores (2008) têm tentado esclarecer essa questão utilizando um elegante modelo de super-expressão de  $\alpha$ -sinucleína humana mutada em ratos. Nesse trabalho, os autores concluem que a fosforilação da S129 poderia servir como um mecanismo de proteção frente a toxicidade da proteína, porque essa MPT ajuda na estabilização de oligômeros tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína, 'sequestrando' os mesmos para formar agregados mais estáveis (GORBATYUK et al., 2008; OUESLATI et al., 2010). No entanto, estudos em *Drosophila melanogaster* e modelos transgênicos para o estudo da DP demonstraram um efeito patogênico nesta MPT (CHEN, FEANY 2005; FREICHEL et al., 2007). Embora a participação dessa MPT na promoção ou bloqueio da agregação proteica ainda seja assunto de debate, é indiscutível a importância da mesma na presença de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (OUESLATI, 2016, SUGEON et al., 2008). Nos dados apresentados aqui, temos demonstrado um aumento significativo da p-S129- $\alpha$ -sinucleína unicamente na fração de proteínas solúveis em SDS de animais tratados com TM. Considerando que na fração de proteínas solúveis em SDS também estaria representada a porção de proteínas agregadas, e que a p-S129- $\alpha$ -sinucleína é característica da agregação desta proteína, esses dados confirmam que o

estresse de RE tem um papel preponderante na formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína. Por outro lado, há uma década atrás, Sugeon e colaboradores demonstraram que a fosforilação da S129 é importante na indução do estresse de RE e da morte celular *in vitro*, após exposição a rotenona (SUGION et al., 2008). No entanto, até esse momento nunca tinha sido avaliado o efeito do estresse de RE na fosforilação da  $\alpha$ -sinucleína. Nesse sentido, este é o primeiro registro a mostrar que o estresse de RE induz a fosforilação de  $\alpha$ -sinucleína.

Uma vez que as modificações genéticas parecem não ser necessárias no processo de agregação proteica, as MPT ganharam uma importante notoriedade neste processo. Nesse sentido, Jang e colaboradores (2010), também sugeriram que o mal dobramento e dano da  $\alpha$ -sinucleína parecem ser um pré-requisito na translocação e exocitosis desta proteína, o que poderia contribuir com dois processos importantes na progressão da doença: (1) ativação do processo neuro-inflamatório e (2) espalhamento dos agregados proteicos. A liberação/secreção de  $\alpha$ -sinucleína oligomérica/agregada desde os neurônios doentes até o meio extracelular por diferentes vias, poderia contribuir com a propagação da doença de um neurônio afetado a outro não afetado (NONAKA et al., 2010; ALVAREZ-ERVITI et al., 2011; MARQUES, OUTEIRO 2012; LEE et al., 2014). Esses agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína não são importantes apenas na propagação aos outros neurônios, mas também para a ativação de células gliais uma vez liberados no meio extracelular, contribuindo assim para a indução do processo neuroinflamatório característico da DP (ZHANG et al., 2005; ALVAREZ-ERVITI et al., 2011; BÉRAUD, MAGUIRE-ZAISS et al., 2012; ROODVELT et al., 2013). Estudos *in vitro* demonstraram o aumento da secreção de citocinas em células microgliais induzida por agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011), assim com um concomitante aumento da neurotoxicidade (ZHANG et al., 2005). Essa ativação parece ser independente da  $\alpha$ -sinucleína presente no meio condicionado ser selvagem ou mutante (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011). Além disso, a ativação microglial induzida por  $\alpha$ -

sinucleína também promove a proliferação e migração microglial dependente de integrina  $\beta$ -1 *in vitro* (KIM et al., 2013; KIM et al., 2014). O efeito direto da  $\alpha$ -sinucleína na ativação microglial *in vivo* foi demonstrado por Couch e colaboradores, que uma vez injetada na SN de camundongos, a  $\alpha$ -sinucleína selvagem humana, resultou na modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de marcadores endoteliais de inflamação, e ativação microglial (COUCH et al., 2011).

Embora recentemente tenha sido demonstrada a transmissão, e o espalhamento da proteína  $\alpha$ -sinucleína agregada entre neurônios *in vitro* (MAO et al., 2016; CHOI et al., 2018), fomentando o debate sobre o comportamento 'priônico' da  $\alpha$ -sinucleína na DP, é importante esclarecer que quando demonstrada a presença de  $\alpha$ -sinucleína oxidada ou fosforilada no CE, neste trabalho não estamos confirmando a transmissão, nem muito menos discutindo a função tipo 'priônica' desta proteína no presente modelo. A presença destas formas de  $\alpha$ -sinucleína modificada (e sua presença nas frações solúveis e insolúveis em TX-100) no CE pode ser devido à presença das mesmas nos terminais sinápticos dos neurônios da SN que se comunicam com os neurônios do CE.

Nas últimas duas décadas, o estresse de RE tem sido alvo de estudo para várias doenças crônicas, e se o estresse de RE é causa ou consequência na formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína na DP é motivo de debate. No entanto, resultados deste trabalho já publicados indicam que o estresse de RE pode estar envolvido na formação de agregados proteicos ricos em  $\alpha$ -sinucleína mal dobrada (CÓPPOLA-SEGOVIA et al., 2017), colocando o estresse de RE como possível responsável por esse processo (Figuras 4 do paper e 1 do Capítulo II). Recentemente, um trabalho pertencente ao grupo de Hetz (MEDINAS et al., 2018) tem constatado que o estresse de RE é responsável pela formação de agregados proteicos ricos em SOD1 num modelo *in vivo* de

ELA, com sobre-expressão da enzima SOD1 selvagem. No entanto, levando em consideração que a sobre-expressão de uma proteína já é uma condição de estresse celular importante, e pode colaborar com a agregação proteica, o modelo proposto pelo nosso laboratório parece ser o único até o momento em demonstrar o efeito do estresse de RE sobre a agregação proteica em condições, somente, de expressão endógena de  $\alpha$ -sinucleína, o que se assemelha mais com casos esporádicos da doença, que representam aproximadamente um 90% dos casos totais.

No presente trabalho foi demonstrado o papel do estresse de RE na agregação de  $\alpha$ -sinucleína 7 dias pós-lesão, num novo modelo *in vivo* de DP, induzido por TM. Como discutido anteriormente, as MPTs parecem ter um papel preponderante nos processos de agregação, mudança de funcionalidade e toxicidade da  $\alpha$ -sinucleína na DP (OUESLATI et al., 2010). A carbonilação, a nitração de resíduos de tirosina, assim como a fosforilação na S129 da  $\alpha$ -sinucleína são características observadas em amostras post-mortem de pacientes de Parkinson (ANDERSON et al., 2006; OUESLATI et al., 2010; PERFEITO et al., 2013), também identificadas em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* de DP (JIANG et al., 2010; COLLA et al., 2012). Este é o primeiro trabalho a descrever os efeitos do estresse de RE sobre as MPTs e agregação de  $\alpha$ -sinucleína endógena selvagem *in vivo*. Desta maneira, este trabalho fornece importante contribuição no estabelecimento do estresse de RE como responsável do (1) processo de agregação de  $\alpha$ -sinucleína e (2) das MPTs que ocorrem na mesma, num modelo *in vivo* da DP.

No geral, nossos dados confirmam que o estresse de RE induzido por TM *in vivo*, produz algumas das características moleculares mais importantes da DP anteriormente descritas apenas para modelos *in vitro* e *in vivo* de animais transgênicos (JIANG et al., 2010; COLLA et al., 2012; JIANG et al., 2014). É

importante ressaltar que a TM, induzindo estresse do RE e ativando a UPR, recapitula várias características da DP, como a agregação da  $\alpha$ -sinucleína, a morte dos neurônios dopaminérgicos e deficiências locomotoras (CÓPPOLA-SEGOVIA et al., 2017). A compreensão da gênese da DP é necessária para o desenvolvimento de novas ferramentas com relevância no diagnóstico precoce da doença e no avanço do desenvolvimento de terapias preventivas. Acreditamos que estudos futuros utilizando esse modelo de lesão com TM e manipulação farmacológica/genética das vias da UPR irão caracterizar ainda melhor o papel do estresse de ER no desenvolvimento da DP, e servirão para o desenvolvimento de terapias inovadoras, tanto na prevenção como no retardo da doença já estabelecida.

## REFERÊNCIAS

United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division. World Population Ageing 2015. Report ST/ESA/SER.A/390 [http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf) (United Nations, 2015)

ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARIN, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W.; CASTILLO, P.E.; SHINSKY, N.; MANUEL, J.; ERDUGO, G.; ARMANINI, M.; RYAN, A.; HYNES, M.; PHILLIPS, H.; SULZER, D.; ROSENTHAL, A.; FRANCISCO, S.; DE VALENCIA, U.; FRANCISCO, S. S. Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System, **Neuron**. 25:239–252. 2000

ALAM, Z. I.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J.; MARSDEN, D. C.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. A generalized increase in protein carbonyls in the brain in parkinson's but not incidental Lewy Body Disease. **Journal of Neurochemistry** 69(3):1326-9. 1997

ALAMDARI, D. H.; KOSTIDOU, E.; PALETAS, K.; SARIGIANNI, M.; KONSTAS, A. G.; KARAPIPERIDOU, A.; KOLIAKOS, G. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. **Free Radical Biology and Medicine**; 39(10):1362-7. 2005

ALVAREZ-ERVITI, L.; COUCH, Y.; RICHARDSON, J.; COOPER, J. M.; WOOD, M. J. A. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line, **Neurosci Res**. 69:337–342. 2011

ANDERSON, J. P.; WALKER, D. E.; GOLDSTEIN, J. M.; DE LAAT, R.; BANDUCCI, K.; et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. **J Biol Chem** 281: 29739–29752. 2006

BARNUM, C. J.; TANSEY, M. G. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Brain Res**; 184:113-32. 2010

BARRETT, P. J.; GREENAMYRE J. T. Post-translational modification of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. **Brain Res.**, 1628(Pt B):247-253. 2015

BENNER, E. J.; BANERJEE, R.; REYNOLDS AD, SHERMAN S.; PISAREV, V. M.; TSIPERSON, V.; NEMACHEK, C.; CIBOROWSKI, P.; PRZEDBORSKI, S.; MOSLEY, R. L.; GENDELMAN, H. E. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic. **PLOS ONE**, 3(1):E1376. 2008

BÉRAUD, D.; MAGUIRE-ZEISS, K. A. Misfolded  $\alpha$ -synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 1:S17-20. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70008-6.n2012

BERKE, S. J.; PAULSON, H. L. Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPer hand on neurodegeneration. **Curr Opin Genet Dev**, 13(3):253-61. 2003

BERNALES, S.; MORALES, D.; SOTO, M.; MC CULLAGH, E. Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 4(5):1-13. 2012

BÉTEMPS, D.; VERCHÈRE, J.; MOUGENOT, A. L.; LACHMANN, I.; MORIGNAT, E.; ANTIER, E.; LAKHDAR, L.; LEGASTELOIS, S.; BARON, T. Detection of Disease-associated  $\alpha$ -synuclein by Enhanced ELISA in the Brain of Transgenic Mice Overexpressing Human A53T Mutated  $\alpha$ -synuclein. **Journal of Visual Experiments**. 30;(99):e52752. 2015

BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. **J of Biomed and BioTech**, 845618. 2012

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx** 2(3):484–494. 2005

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**. 1;211:51-76. 2012

BOYCE, M.; YUAN, J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. **Cell Death Differ** 13(3):363–373. 2006

BRAAK, H.; BRAAK, E.J. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Neurology** v. 247, n. 2, p. II3-II10. 2000

BROWN, M. K.; NAIDOO, N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. **Front Physiol**, 3:263. 2012

CANNIZZO, E. S.; CLEMENT, C. C.; SAHU, R.; FOLLO, C.; SANTAMBROGIO, L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. **J Proteomics**. 19;74(11):2313-23. 2011

CANNIZZO, E. S. ; CLEMENT, C. C.; MOROZOVA, K.; VALDOR, R.; KAUSHIK, S.; ALMEIDA, L. N.; FOLLO, C.; SAHU, R.; CUERVO, A. M.; MACIAN, F.; SANTAMBROGIO, L. Age-related oxidative stress compromises endosomal proteostasis. **Cell Rep**. Jul 26;2(1):136-49. 2012

CASTRO-CALDAS, M.; CARVALHO, A. N.; RODRIGUES, E.; HENDERSON, C. J.; WOLF, C. R.; RODRIGUES, C. M.; GAMA, M. J. Tauroursodeoxycholic acid prevents MPTP-induced dopaminergic cell death in a mouse model of Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 46, n. 2, p. 475-486. 2012

CHATTOPADHYAY, M.; VALENTINE, J. S. Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. **Antioxid Redox Signal**,11(7):1603-14. 2009

CHEN, L.; FEANY, M. B. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. **Nature Neuroscience** 8: 657–663. 2005

CHEN, X.; SHEN, J.; PRYWES, R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the er to the Golgi, **J Biol Chem**. 277:13045–13052. 2002

CHOI, Y. R.; CHA, S. H.; KANG, S. J.; KIM, J. B.; JOU, I.; PARK, S. M. Prion-like Propagation of  $\alpha$ -Synuclein Is Regulated by the Fc $\gamma$ RIIB-SHP-1/2 Signaling Pathway in Neurons. **Cell Reports** 22, 136–148. 2018

CHOY, K. W.; LAU, Y. S.; MURUGAN, D.; MUSTAFA, M. R. Chronic treatment with paeonol improves endothelial function in mice through inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated oxidative stress. **PLoSOne**, 12(5):e0178365. 2017

COLLA, E.; COUNE, P.; LIU, Y.; PLETNIKOVA, O.; TRONCOSO, J. C.; IWATSUBO, T.; SCHNEIDER, B. L.; Lee, M. K. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of  $\alpha$ -synucleinopathy in vivo. **J Neurosci** 32(10):3306–3320. 2012

COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GARAVAGLIA, M. E.; GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**;1019:178-90. 2016

CÓPPOLA-SEGOVIA, V.; CAVARSAN, C.; MAIA, F. G.; FERRAZ, A. C.; NAKAO, L. S.; LIMA, M. M. L.; ZANATA, S. M. ER Stress Induced by Tunicamycin Triggers  $\alpha$ -Synuclein Oligomerization, Dopaminergic Neurons Death and Locomotor Impairment: a New Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, 54(8), 5798–5806. 2017

COUCH, Y.; ALVAREZ-ERVITI, L.; SIBSON, N. R.; WOOD, M. J.; ANTHONY, D. C. The acute inflammatory response to intranigral alpha-synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. **J Inflamm** 2011; 8: 166. 2011

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**. Sep 11;39(6):889-909. 2003

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, 302(5646):819-22. 2003

DEXTER, D. T.; CARTER, C. J.; WELLS, F. R.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Basal lipid peroxidation in

substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **J Neurochem** 52:381-389. 1989

DUAN, G.; WALTHER, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction network. **PLoS Comput Biol.** 11(2):e1004049. 2015

EMAMZADEH, F. N. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci.* 9:21-29. EMBORG, ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **J Neurosci Methods;** 139(2): 121-43. 2004

ESTEVEZ, R. A.; ARDUÍNO, D. M.; SWERDLOW, R. H.; Oliveira, C. R.; Cardoso, S. M. Oxidative stress involvement in  $\alpha$ -synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids. **Antiox & Redox Signaling,** 11:3:439-448. 2009

FARRER, M. J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature;* 7:306-318. FORNO, LS. Neuropathologic features of Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's diseases. **Ann N Y Acad Sci;** 648:6-16. 1992

FORMAN, M. S.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine.** 10:1055-1063. 2005

FREICHEL, C.; MANUELANEUMANN; T.; VERONIKAMÜLLER; H.; A.KRETZSCHMAR; CHRISTIANHAASS; WILLSPÖREN; PHILIPP JK. Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in  $\alpha$ -synuclein transgenic mice. **Neurobiology of Aging.** 28(9):1421-1435. 2007

FUJIWARA, H.; HASEGAWA, M.; DOHMAE, N.; KAWASHIMA, A.; MASLIAH, E.; GOLDBERG, M. S.; SHEN, J.; TAKIO, K.; IWATSUBO, T.  $\alpha$ -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. **Nature Cell Biology;** 4(2):160-4. 2002

GORBATYUK, O. S.; LI, S.; SULLIVAN, L. F.; CHEN, W.; KONDRIKOVA, G.; Manfredsson, F. P.; Mandel, R. J.; Muzyczka, N. The phosphorylation state of Ser-129 in human  $\alpha$ -synuclein determines neurodegeneration in a rat

model of Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 105: 763–768. 2008

HANSEN, C.; LI, J. Y. Beyond  $\alpha$ -synuclein transfer: Pathology propagation in Parkinson's disease, **Trends Mol Med**. 18:248–255. 2012.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature**; 13(2), 89–102. 2012

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; MCMENAMIN, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney Int**. Dec;58(6):2571-8. 2000

HOLTZ, W. A.; O'MALLEY, K. L. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. **J Biol Chem** 278(21):19367–19377. 2003

HOOZEMANS, J. J. M.; VAN HAASTERT, E. S.; EIKELENBOOM, P.; de VOS, R. A.; ROZEMULLER, J. M.; SCHEPER, W. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun** 354(3):707–711. 2007

HOOZEMANS, J. J. M.; SCHEPER, W. Endoplasmic reticulum: the unfolded protein response is tangled in neurodegeneration. **Int J Biochem Cell Biol** 44(8):1295–1298. 2012

HUANG, K. Y.; S. U., M. G.; KAO, H. J.; HSIEH, Y. C.; JHONG, J. H.; CHENG, K. H.; HUANG, H. D.; LEE, T. Y. Ten-year anniversary of a resource for post-translational modification of proteins. **Nucleic Acids Research**. 44(D1):D435–46. 2010

JANG, A.; LEE, H. J.; SUK, J. E.; JUNG, J. W.; KIM, K. P.; LEE, S. J. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. **J Neurochem**. 113(5):1263-74. 2010

JIANG, P.; GAN, M.; EBRAHIM, A. S.; LIN, W. L.; MELROSE, H. L.; YEN, S. H. C. ER stress response plays an important role in aggregation of  $\alpha$ -synuclein. **Molecular Neurodegeneration**, 5(1):56. 2010

JIANG, P.; GAN, M.; LIN, W. L.; YEN, S. H. C. Nutrient deprivation induces  $\alpha$ -synuclein aggregation through endoplasmic reticulum stress response and SREBP2 pathway. **Front Aging Neurosci** 6: 268. 2014

KIM, C.; HO, D.; SUK, J.; YOU, S.; MICHAEL, S.; KANG, J.; LEE, S. J.; MASLIAH, E.; HWANG, D.; LEE, H.; LEE, S. Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist TLR2 for paracrine activation of microglia, **Nat. Commun**, 4 (2013) 1512–1562. 2013

KIM, C.; CHO, E. D.; KIM, H. K.; YOU, S.; LEE, H. J.; HWANG, D.; LEE, S. J. Beta 1-Integrin-Dependent Migration of Microglia in Response To Neuron-Released Alpha-Synuclein. **Experimental & molecular medicine**, v 46, e91. 2014

KIM, I.; XU, W.; REED; J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature reviews Drug discovery** 7:1013-1030. 2008

KLEIN, C.; WESTERNBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2012.

LEAVER, D. D.; SCHNEIDER, K. M.; RAND, M. J.; ANDERSON, R. M.; GAGE, P. W.; MALBON, R. The neurotoxicity of tunicamycin. **Toxicology**, 49:179–187. 1998

LEE, H. J.; BAE, E. J.; LEE, S.J. Extracellular  $\alpha$ -synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases. **Nat Rev Neurol**, 10(2):92–8. 2014

LINDHOLM, D.; WOOTZ, H.; KORHONEN, L. ER stress and neurodegenerative diseases. **Cell Death and Differentiation**. 13:385-392. 2006

MAGEN, I.; CHESSELET, M. F. Genetic mouse models of Parkinson's disease. The state of the art. **Prog. Brain Res**. 184:53-87. 2010

MAO, X.; OU, M. T.; KARUPPAGOUNDER, S. S.; KAM, T. I.; YIN, X.; XIONG, Y.; Ge, P.; Umanah, G. E.; Brahmachari, S.; Shin, J. H.; Kang, H. C.; Zhang, J.; Xu, J.; Chen, R.; Park, H.; Andrabi, S. A.; Kang, S. U.; Gonçalves, R. A.; Liang, Y.; Zhang, S.; Qi, C.; Lam, S.; Keiler, J. A.; Tyson, J.; Kim, D.; Panicker, N.; Yun, S. P.; Workman, C. J.; Vignali, D. A.; Dawson, V. L.; Ko, H. S.; Dawson, T. M. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. **Science**, 353(6307). 2016

MARCINIAK, S. J.; RON, D. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Diseases. **Physiol Rev**, 86(4), 1133–1149. 2006

MARQUES, O.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death, **Cell Death Dis.** e350. 2012

MATSUI, H.; ITO, H.; TANIGUCHI, Y.; TAKEDA, S.; TAKAHASHI, R. Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induce Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. **J Neurochem.** 115(5):1150-60. 2010

MATSUI, H.; GAVINIO, R.; TAKAHASHI, R. Medaka Fish Parkinson's Disease Model. **Experimental Neurobiology**, 21(3):94-100. 2010

MATSUZAKI, M.; HASEGAWA, T.; TAKEDA, A.; KIKUCHI, A.; FURUKAWA, K.; KATO, Y.; ITOYAMA, Y. Histochemical features of stress-induced aggregates in alpha-synuclein overexpressing cells. **Brain Research**, 9;1004(1-2):83-90. 2004

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**. V 38, pp. 1285–1291. 1988

MEDINAS, D. B.; ROZAS, P.; MARTÍNEZ TRAUB, F.; WOHLBIER, U.; BROWN, R. H.; BOSCO, D. A.; HETZ C. Endoplasmic reticulum stress leads to accumulation of wild-type SOD1 aggregates associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.** 115(32):8209-8214. 2018

MISHIZ-ENEBERZ, A. J.; NORRIS, E. H.; GIASSON, B. I.; HODARA, R.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; LYNCH, D.R.

Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein. **Biochemistry**, 44:7818-7829. 2005

MORAWE, T.; HIEBEL, C.; KERN, A.; BEHL, C. Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol**, 46(1):41-54. 2012

MORI, K. Tripartite management of unfolded Proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell** 101:451–454. 2010

MUNTANÉ, G.; FERRER, I.; MARTINEZ-VICENTE, M.  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. **Neuroscience** 200,3:106-119. 2012

NIXON, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nat Med Rev** 19(8):983-987. 2013

NONAKA, T.; WATANABE, S. T.; IWATSUBO, T.; HASEGAWA, M. Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. **J Biol Chem**. 285, 34885–34898. 2010

NYSTRÖM, T.; GONON, A. T.; SJÖHOLM, A.; PERNOW, J. Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. **Regul Pept**. Feb 15;125(1-3):173-7. 2005

OLANOW, C. W. The pathogenesis of the cell death in Parkinson's disease. **Mov Disord**, 22(17): s335-342. 2007

OMURA, T.; KANEKO, M.; OKUMA, Y.; MATSUBARA, K.; NOMURA, Y. Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. **Oxid Med Cell Longev**, 239854. 2013

ORCI, L.; RAVAZZOLA, M.; MEDA, P.; HOLCOMB, C.; MOORE, H. P.; HICKE, L.; SCHEKMAN, R. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88(19):8611-5. 1991

OUESLATI, A.; FOURNIER, M.; LASHUEL, H. A. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. **Prog Brain Res**;183:115-45. 2010

OUESLATI, A. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? **Journal of Parkinson's Disease**, 6(1):39–51. 2016

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain stereotaxic coordinates. San Diego: **Academic Press**. 1997

PAXINO, E.; CHEN, Q.; WEISSE, M.; GIASSON, B. I.; NORRIS, E. H.; RUETER, S. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.; ISCHIROPOULOS, H. Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. **J Neurosci**; 21(20):8053-61. 2001

PERFEITO, R.; CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease - Resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radical Biology and Medicine**, 62, 186–201. 2013

PESAH, Y.; PHAM, T.; BURGESS, H.; MIDDLEBROOKS, B.; VERSTREKEN, P.; ZHOU, Y.; HARDING, M.; BELLEN, H.; MARDON, G. Drosophila parquin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. **Development**, 131(9):2183-94. 2004

POLYMERPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S. E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E. S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W. G.; LAZZARINI, A. M.; DUVOISIN, R. C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L. I.; NUSSBAUM, R. L. Mutation in the alpha- synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045-2047. 1997

PURVES, D., AUGUSTINE, G. A., FITZPATRICK, D., HALL, W. C., LAMANTIA, A., MCNAMARA, J., WILLIAMS, S. Neuroscience. Capítulo 17: Modulation of Movement by the Basal Ganglia. 3<sup>rd</sup> Edition. 2004 **Sinauer Associates**.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. England: **Oxford University Press**, 2002. p. 257- 258.

RICHFIELD, E. K.; THIRUCHELVAM, M. J.; CORY-SLECHTA, D. A.; WUERTZER, C.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; DI MONTE, D. A.; FEDEROFF, H. J. Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. **Experimental Neurology**, 175:35–48. 2002

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:519– 529. 2007

RUTKOWSKI, D. T.; ARNOLD, S. M.; MILLER, C. N.; WU, J.; LI, J.; GUNNISON, K. M.; MORI, K.; SADIGHI AKHA, A. A.; RADEN, D.; KAUFMAN, R. J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. **PLoS Biol**, 4(11):e374. 2006

RYU, E. J.; HARDING, H. P.; ANGELASTRO, J. M.; VITOLO, O. V.; RON, D.; GREENE, L. A. (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. **J Neurosci.**, 22(24), 10690–10698. 2002

SANTOS, AL; LINDNER, AB. Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease **Oxid Med Cell Longev.**; 2017: 5716409. 2017

SATO, H.; KATO, T.; ARAWAKA, S. The role of Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. **Rev Neurosci** 24: 115–123. 2013

SHEN, J.; CHEN, X.; HENDERSHOT, L.; PRYWES, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals, **Dev. Cell.** 3:99–111. 2002

SILVA, BA; EINARSDÓRTTIR, O; FINK, AL; UVERSKY, VN. (2013). Biophysical characterization of  $\alpha$ -synuclein and rotenone interaction. **Biomolecules**, 3:703-732.

SHERER, TB; BETARBET, R; TESTA, CM; SEO, BB; RICHARDSON, JR; KIM, JH; MILLER, GW; YAGI, T; MATSUNO-YAGI, A; GREENAMYRE, JT. (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **J Neurosci**. Nov 26;23(34):10756-64.

SHERER, TB; RICHARDSON, JR; TESTA, CM; SEO, BB; PANOV, AV; YAGI, T; MATSUNO-YAGI, A; MILLER, GW; GREENAMYRE, JT. (2007). Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. **J Neurochem**, 100(6): 1469-1479.

SPILLANTINI, MG; SCHMIDT, ML; LEE, VM; TROJANOWSKI, JQ; JAKES, R; GOEDERT, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, 388(6645):839–840.

SPILLANTINI, MG; CROWTHER, RA; JAKES, R; HASEGAWA, M; GOEDERT, M. alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 95(11):6469–6473. 1998

STEFANIS, L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2(2), 1–23. 2012

STUENDL, A., KUNADT, M., KRUSE, N., BARTELS, C., MOEBIUS, W., DANZER, K.M., MOLLENHAUER, B., SCHNEIDER, A. Induction of  $\alpha$ -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies., **Brain**. 139(Pt2):481-94. 2016

SUGENO N, TAKEDA A, HASEGAWA T, KOBAYASHI M, KIKUCHI A, MORI F, WAKABAYASHI K, ITOYAMA Y. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. **J Biol Chem** 283:23179-23188. 2008

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat Cell Biol** 13(3): 184–190. 2011

TAKAHASHI, T.; YAMASHITA, H.; NAKAMURA, T.; NAGANO, Y.; NAKAMURA, S. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following nitrative stress. **Brain Res.** ;938(1-2):73-80. 2002

TANASE, M.; URBANSKA, A. M.; ZOLLA, V.; CLEMENT, C. C.; HUANG, L.; MOROZOVA, K.; Follo, C.; Goldberg, M.; Roda, B.; Reschiglian, P.; Santambrogio, L. Role of carbonyl modifications on aging-associated protein aggregation. **Scientific Reports**, 6:1–14. 2016

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 1(1):a009316. 2011

TOFARIS, G. K.; RAZZAQ, A.; LILLEY, K. S.; GRAZIA, M.; SPILLANTINI, M. G. Ubiquitination of  $\alpha$ -Synuclein in Lewy Bodies Is a Pathological Event Not Associated with Impairment of Proteasome Function Ubiquitination of  $\alpha$ -Synuclein in Lewy Bodies Is a Pathological Event Not Associated with Impairme. **Journal of Biological Chemistry**. 278:44405-44411. 2003

TURKO, I. V.; MURAD, F. Protein nitration in cardiovascular diseases. **Pharmacol Rev**; 54(4):619-34. 2002

UVERSKY, V. N. Neuropathology, biochemistry and biophysics of a-synuclein aggregation **J Neurochem** 103, 17-37. 2007

WANG, X. F.; LI, S.; CHOU, A. P.; BRONSTEIN, J. M. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, 23(1):198-205. 2006

YAMIN, G.; UVERSKY, V. N.; FINK A. L. Nitration inhibits fibrillation of human alpha-synuclein in vitro by formation of soluble oligomers. **FEBS Lett.** 542(1-3):147-52. 2003

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **FEBS**. 274(3):630-658. 2007

ZHANG, W., WANG, T., PEI, Z., MILLER, D., S., WU, X., BLOCK, M., L., WILSON, B., ZHANG, W., ZHOU, Y., HONG, J., S., ZHANG, J. Aggregated

$\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, 19:533-542. 2005

ZHOU, J.; BROE, M.; HUANG, Y.; ANDERSON, J. P.; GAI, W. P.; MILWARD, E. A.; PORRITT, M.; HOWELLS, D.; HUGHES, A. J.; WANG, X.; HALLIDAY, G. M. Changes in the solubility and phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein over the course of Parkinson's disease. **Acta Neuropathol.** 121(6):695-704. 2011