



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Stella Célio Junqueira

**O estudo da SUMOilação em modelos *in vitro* e *in vivo*  
da doença de Parkinson**

Florianópolis  
2020

Stella Célio Junqueira

**O estudo da SUMOilação em modelos *in vitro* e *in vivo*  
da doença de Parkinson**

Dissertação/Tese submetida ao Programa  
de Pós Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Doutora em  
Neurociências

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Helena I.  
Cimarosti

Coorientador: Prof. Dr. Rui Daniel S.  
Prediger

Florianópolis  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Junqueira, Stella Célio

O estudo da SUMOilação em modelos in vitro e in vivo da  
doença de Parkinson / Stella Célio Junqueira ; orientadora,  
Helena Iturvides Cimarosti, coorientador, Rui Daniel  
Schroder Prediger, 2020.

114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Doença de Parkinson. 3. SUMOilação.  
4. MPTP intranasal. 5. Fissão mitocondrial. I. Cimarosti,  
Helena Iturvides. II. Prediger, Rui Daniel Schroder. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências. IV. Título.

Stella Célio Junqueira  
**O estudo da SUMOilação em modelos *in vitro* e *in vivo*  
da doença de Parkinson**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Daniela Dal Secco Abbud, Dr.(a)  
Faculdade de Tecnologia Nova Palhoça

Prof. Marcelo Farina, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Neurociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Helena Iturvides Cimarosti, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado à minha mãe Merisander,  
minha maior incentivadora e apoiadora.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força de cada dia, pela jornada de grande aprendizado que me permitiu viver nesses cinco anos.

À minha família, principalmente à minha mãe Merisander, pelo apoio incondicional, incentivo, por acreditar no meu potencial e por toda a ajuda, amor e carinho dedicados a mim durante toda a vida.

À professora Helena Cimarosti, minha orientadora, por todos os valiosos conselhos, ensinamentos e incentivos, paciência e confiança profissional. Ao meu co-orientador que me recebeu de início para a jornada do doutorado, obrigada pela oportunidade e por todos os conselhos. Ao professor Jeremy Henley pela orientação, por todas as discussões científicas e todo auxílio necessário na universidade de Bristol.

Minha eterna gratidão aos colegas de laboratório e grandes amigos, Camila Zanella, Letícia Coelho, Izi Izumi, Eduarda Centeno e Ericks Sousa pela parceria nos experimentos, nas discussões científicas e filosóficas da vida.

À Clarissa, Fabinho, Andreia, Rafaela e Igor, por todo apoio, incentivo e parceria em diferentes momentos e situações dessa jornada.

Aos colegas de Bristol, Richard, Kevin e Nadiia pelas discussões científicas e auxílio no laboratório; à Luana, Plínio, Bárbara, Felipe, Olívia pelos momentos de descontração.

Aos colegas Ana Cristina, Josiel, Maurício, Felipe que também contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos funcionários do LAMEB, Vanessa, Denis e Maíra. Aos funcionários de limpeza, em especial, seu Sérgio. Aos funcionários e ex-funcionários da secretaria de pós-graduação, em especial Nivaldo.

Às minhas terapeutas Jordane e Viviane que me auxiliaram em diferentes momentos ao longo do doutorado.

À CAPES e ao *International Society of Neurochemistry* pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A SUMOilação é uma modificação pós-traducional (MPT), altamente dinâmica e reversível, que consiste na conjugação da proteína *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) a proteínas-alvo, alterando sua estabilidade, função e localização subcelular. A SUMOilação exerce um papel neuroprotetor em modelos de estresse celular e tem sido considerada um fator crítico em diversas doenças neurodegenerativas. A doença de Parkinson (DP) é uma neuropatia progressiva caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos e disfunção motora, precedida por sintomas pré-motores. Tanto a patogênese da fase pré-motora da DP quanto o papel da SUMOilação na DP não estão totalmente elucidados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e seu metabólito tóxico 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>) sobre a SUMOilação e enzimas envolvidas nesse processo, como também sobre proteínas-alvo mitocondriais. Para isto foram utilizados o MPP<sup>+</sup> em modelos *in vitro* e a administração intranasal (i.n.) de MPTP no modelo *in vivo* da DP. O MPP<sup>+</sup> reduziu os conjugados de SUMO-2/3, níveis de SENP 3 (enzima deSUMOilante) e Ubc9 (enzima SUMOilante) e das proteínas de fissão mitocondrial Drp-1 e Mff. O MPTP i.n. não alterou os conjugados de SUMO no bulbo olfatório, mas alterou os conjugados de SUMO-1 no córtex pré-frontal e no hipocampo, de SUMO-2/3 no estriado e no hipocampo e alterou os níveis da SENP 3 e da Ubc9 em todas as estruturas. O MPTP i.n. reduziu os níveis de Drp-1 no bulbo olfatório e no estriado e os níveis de Mff no estriado e no hipocampo. Os resultados apresentados nesse trabalho mostram pela primeira vez a descrição altamente dinâmica do perfil de SUMOilação em modelos *in vitro* e/ou *in vivo* da DP utilizando o MPP<sup>+</sup> e o MPTP i.n. A partir desses resultados é possível identificar alterações de conjugados SUMO-substrato específico e futuramente identificar proteínas específicas alteradas pela SUMOilação no processo de patogênese da DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Fase pré-motora. Fissão mitocondrial. Modificação pós-traducional. MPTP intranasal. SUMO.

## ABSTRACT

SUMOylation is a highly dynamic and reversible post-translational modification that consists of conjugating the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein to target proteins, changing their stability, function and subcellular location. SUMOylation plays a neuroprotective role in cell stress models and has been considered a critical factor in several neurodegenerative diseases. Parkinson's disease (PD) is a progressive neuropathy characterized by the loss of dopaminergic neurons and motor dysfunction, preceded by pre-motor symptoms. Both the pathogenesis of pre-motor PD and the role of SUMOylation in PD are not completely understood. The aim was to evaluate the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and the toxic metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) effects on SUMOylation and enzymes involved in this process, as well as on mitochondrial targets. For this, MPP<sup>+</sup> was used in *in vitro* models and intranasal (i.n.) administration of MPTP in the *in vivo* model of PD. MPP<sup>+</sup> reduced SUMO-2/3 conjugates, SENP 3 and Ubc9 and the mitochondrial fission proteins Drp-1 and Mff levels. The MPTP i.n. (1 mg/nostril) did not change the SUMO conjugates in the olfactory bulb, but it did change SUMO-1 conjugates in the prefrontal cortex and hippocampus, SUMO-2/3 conjugates in the striatum and hippocampus, and SENP 3 and Ubc9 levels in all structures. MPTP i.n. reduced Drp-1 levels in the olfactory bulb and striatum, while Mff levels were reduced in the striatum and hippocampus. The results presented in this work show for the first time the highly dynamic alteration of SUMOylation proteins in *in vitro* and/or *in vivo* models of PD. The results presented in this work show for the first time the highly dynamic description of the SUMOylation profile in *in vitro* and/or *in vivo* models of PD using MPP<sup>+</sup> and MPTP i.n. From these results it is possible to identify changes in SUMO-specific substrate conjugates and the second step it is to identify specific proteins altered by SUMOylation in the pathogenesis process of PD.

**Keywords:** Intranasal MPTP. Mitochondrial fission. Parkinson's disease. Pre-motor phase. Post-translational modification. SUMO.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de conjugação e desconjugação de modificadores tipo ubiquitina.....	17
Figura 2 – Diagramas tridimensionais em fita da Ub e dos UBLs Nedd8 e SUMO-1..	19
Figura 3 – Ciclo de SUMOilação e de-SUMOilação.....	20
Figura 4 – Mecanismos de seleção de lisina acceptora de SUMO.....	22
Figura 5 – Proteínas SUMOiladas são encontradas em toda a célula.....	25
Figura 6 – Localização subcelular da maquinaria de SUMO em neurônios.....	28
Figura 7 – Alvos de SUMOilação na doença Parkinson.....	32
Figura 8 – Estágios da doença de Parkinson segundo Braak.....	35
Figura 9 – Ilustração esquemática do metabolismo complexo da pró-neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e sua via de neurotoxicidade.....	41
Figura 10 – O MPP+ reduziu os níveis de conjugados de SUMO-2/3 em cultura de células SHSY5Y.....	52
Figura 11 – Os conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 e os níveis de SENP 3 e Ubc9 foram reduzidos de forma concentração dependente pelo MPP+ em cultura primária de neurônios.....	54
Figura 12 – O MPP+ reduziu os níveis de Drp-1 e Mff em cultura primária de neurônios.....	56
Figura 13 – O MPP+ induziu a fragmentação mitocondrial em cultura primária de neurônios.....	57
Figura 14 – O MPP+ alterou diferentemente os conjugados de SUMO-2/3 e os níveis de SENP 3 nas frações subcelulares de neurônios corticais.....	59
Figura 15 – O MPP+ alterou diferentemente os níveis de Drp-1 e Mff nas frações subcelulares de neurônios corticais.....	61
Figura 16 – O MPTP i.n. não alterou os conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP 3 e Ubc9 no bulbo olfatório 1 dia pós administração.....	63
Figura 17 – O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO-1 e os níveis de SENP 3 e Ubc9 no córtex pré-frontal dias pós administração.....	65
Figura 18 – O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO-2/3 e níveis de SENP 3 no estriado dias pós administração.....	67

Figura 19 – O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO e níveis de SENP 3 e Ubc9 no hipocampo dias pós administração.....	69
Figura 20 – O MPTP i.n. não alterou conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP 3 e Ubc9 no bulbo olfatório horas após a administração.....	71
Figura 21 – O MPTP i.n. alterou os conjugados de SUMO-1 e os níveis de Ubc9 no córtex pré-frontal horas após a administração.....	73
Figura 22 – O MPTP i.n. não alterou conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP 3 e Ubc9 no estriado horas após a administração.....	75
Figura 23 – O MPTP i.n. não alterou os conjugados de SUMO-2/3 e os níveis de Ubc9, mas alterou os conjugados de SUMO-1 e os níveis de SENP 3 no hipocampo horas após a administração.....	77
Figura 24 – O MPTP i.n. não alterou os níveis de Drp-1 no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no bulbo olfatório e no estriado horas após a administração.....	79
Figura 25 – O MPTP i.n. não alterou os níveis de Mff no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal, mas alterou no estriado e no hipocampo 1 h após a administração.....	81
Figura 26 – O MPTP i.n. não inibiu a atividade do complexo I mitocondrial no bulbo olfatório, no córtex pré-frontal e no estriado, mas inibiu no hipocampo 6 h após a administração.....	83
Figura 27 – O MPTP i.n. não alterou os níveis de MDA no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no bulbo olfatório e no estriado 1 h após a administração.....	85
Figura 28 – O MPTP i.n. não alterou os níveis de HNE no bulbo olfatório, no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no estriado 1 h após a administração.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de sintomas pré-motores e motores no modelo MPTP i.n. em roedores na doença de Parkinson.....	42
Tabela 2 – Resultados deste estudo obtidos no modelo in vitro da DP.....	87
Tabela 3 – Resultados deste estudo obtidos no modelo in vivo da DP.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6 – OHDA 6-hidroxidopamina
- A $\beta$  – proteína beta-amilóide
- APP – proteína precursora amilóide
- ATP – adenosina trifosfato
- B27 – suplemento para cultivo celular
- CoA – coenzima-A
- DA – doença de Alzheimer
- DAT – Transportador de dopamina
- DMEM-F-12 – meio *Eagle's Dulbecco* modificado
- DNA – *deoxyribonucleic acid*
- DNAmt – *deoxyribonucleic acid* mitocondrial
- DP – Doença de Parkinson
- Drp-1 – *Dinamin related protein-1*
- ECL – *Enhanced chemiluminescent*
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- ER – espécies reativas
- ERO – Espécie reativa de oxigênio
- GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
- GluK2 – *glutamate receptor ionotropic kainate 2*
- GSH – Glutathione
- GTP – guanosina trifosfato
- HNE – 4-hidroxinonenal
- HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*
- HT – doença de Huntington
- HTT – Huntingtina

i.n. – intranasal

IRFs – *Interferon regulatory factors*

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

LB – *Lewy body*

LTD – depressão de longa duração

MAO-B – monoaminaoxidase-B

MDA – Malondialdeído

Mff – *mitochondrial fission fator*

Mfn1 – mitofusina 1

Mfn2 – mitofusina 2

MME – membrana mitocondrial externa

MPP<sup>+</sup> - 1-metil-4-fenilpiridínio

MPT – Modificação pós-traducional

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NACl – cloreto de sódio

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida reduzido

Nedd8 – *neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*

NEM – N-metil-maleimida

NF-κB – *nuclear factor kappa B*

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PO<sub>4</sub> – fosfato

POG – privação de oxigênio e glicose

PVDF – difluoreto de polivinidileno

RanGAP1 – proteína 1 ativadora da Ran GTPase

SAE 1 – *SUMO-activating enzyme 1*

SAE 2 – *SUMO-activating enzyme 2*

SCM – *SUMO consensus motif*

SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SENP – *sentrin-specific protease*  
SIM – SUMO *interacting motif*  
SNC – Sistema nervoso central  
SNE – sistema nervoso entérico  
SUMO – *Small ubiquitin-like modifier*  
TBS-T – *Tris-buffered saline – tween 20*  
TH – Tirosina hidroxilase  
Ub – Ubiquitina  
UBL – *Ubiquitin-like modifier*  
Ubc9 – *ubiquitin carrier protein 9*  
VDAC – *Voltage-dependent anion channels*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Das proteínas às modificações pós-traducionais	15
1.1.1	<b>A Ubiquitina e a família dos modificadores tipo ubiquitina</b>	<b>16</b>
1.2	SUMOilação, o processo de modificação pela SUMO	19
1.2.1	<b>A maquinaria proteica da SUMOilação</b>	<b>22</b>
1.2.2	<b>Consequências funcionais da SUMOilação</b>	<b>23</b>
1.3	A SUMOilação em processos fisiológicos e patológicos	25
1.3.1	<b>A SUMOilação na função e disfunção neuronal</b>	<b>27</b>
1.3.1.1	<i>A SUMOilação na doença de Huntington</i>	28
1.3.1.2	<i>A SUMOilação na doença de Alzheimer</i>	29
1.3.1.3	<i>A SUMOilação na isquemia e hipóxia</i>	30
1.3.1.4	<i>A SUMOilação na doença de Parkinson</i>	31
1.4	A doença de Parkinson	33
1.4.1	<b>A neuropatologia e a etiologia da DP</b>	<b>33</b>
1.4.2	<b>A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo na DP</b>	<b>35</b>
1.4.3	<b>O modelo de MPTP intranasal como modelo animal de DP de fase pré-motora</b>	<b>39</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>44</b>
4.1	Animais	44
4.2	Administração de MPTP i.n.	44
4.3	Coleta das estruturas cerebrais e preparo das amostras	45
4.4	Cultura primária de neurônios corticais	46
4.5	Fracionamento subcelular de cultura primária de neurônios corticais	46
4.6	Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	47
4.7	<i>Western blotting</i>	48
4.8	<i>Dot blotting</i>	48
4.9	Medida da atividade enzimática do complexo I mitocondrial	49
4.10	Imunocitoquímica	50

4.11	Análise Estatística.....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1	Efeitos do MPP <sup>+</sup> sobre a SUMOilação e a fissão mitocondrial em modelos <i>in vitro</i> da DP.....	51
5.1.1	Efeito do MPP <sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 em cultura de SH-SY5Y.....	51
5.1.2	Efeito do MPP <sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, da SENP3 e da Ubc9 em cultura primária de neurônios.....	52
5.1.3	Efeito do MPP <sup>+</sup> nos níveis de Drp-1, Ubc9 e caspase-3 clivada em cultura primária de neurônios.....	55
5.1.4	Efeito do MPP <sup>+</sup> no perfil da população mitocondrial em cultura primária de neurônios.....	56
5.1.5	Efeito do MPP <sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 e da SUMO protease SENP3 em frações subcelulares de cultura neuronal	57
5.1.6	Efeito do MPP <sup>+</sup> nos níveis de Drp-1 e Mff em frações subcelulas de cultura neuronal.....	60
5.2	Efeitos do MPTP <i>i.n.</i> sobre a SUMOilação, a disfunção mitocondrial e o estresse celular em modelo <i>in vivo</i> da DP.....	62
5.2.1	Efeito do MPTP <i>i.n.</i> nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, níveis de SENP3 e Ubc9 diferentes dias após a administração da pró-neurotoxina.....	62
5.2.2	Efeito da administração <i>i.n.</i> de MPTP nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, níveis de SENP3 e Ubc9 1 e 6 h após a administração da pró-neurotoxina.....	70
5.2.3	Efeito da administração <i>i.n.</i> de MPTP nos níveis de Drp-1 e Mff horas após a administração da pró-neurotoxina.....	78
5.2.4	Efeito da administração <i>i.n.</i> de MPTP na atividade do complexo I mitocondrial horas após a administração da pró-neurotoxina.....	82
5.2.5	Efeito da administração <i>i.n.</i> de MPTP nos níveis de MDA e HNE horas após a administração da pró-neurotoxina.....	83
5.3	Resumos dos resultados obtidos.....	86
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100100</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Das proteínas às modificações pós-traducionais

As proteínas, macromoléculas formadas pela combinação de aminoácidos, desempenham diferentes papéis fundamentais nas células. Além de compor a maior parte estrutural celular (MOHAN e JOHN, 2015; HLUSHCHENKO, KOSKINEN e HOTULAINEN, 2016), as proteínas são capazes de catalisar reações metabólicas (enzimas) (HERRAIZ, 2012; NAYAK e MULLER, 2014), proteger o próprio organismo (anticorpos) (JANKOVIC, 2018; LITZMAN, 2019), transportar pequenas moléculas (ferritina) (CHAKRABORTI e CHAKRABARTI, 2019) e transmitir mensagens ou sinais (hormônios) (HAUFFA, 2001; ATHAUDA e FOLTYNIE, 2016) coordenando diferentes processos biológicos. A importância de uma proteína é tamanha que a sua ausência ou defeitos em sua estrutura, e conseqüentemente na sua função, podem acarretar diversas doenças (BALTUSSEN, ROSIANU e ULTANIR, 2018; LUNATI, LESAGE e BRICE, 2018; PANDEY e RAJAMMA, 2018). Além disso, a maioria dos fármacos desenvolvidos possui como alvo terapêutico as proteínas (WU, NIELSEN e CLAUSEN, 2015; FRANCO-SERRANO *et al.*, 2018).

As informações adquiridas com o sequenciamento do genoma de diversos organismos trouxeram um grande progresso no campo da biologia molecular (LAND *et al.*, 2015; MORAES e GOES, 2016). Por exemplo, o sequenciamento do genoma permitiu uma melhor compreensão das falhas e anormalidades moleculares contribuindo para identificação, diagnóstico e tratamento de doenças genéticas (SUBRAMANIAN *et al.*, 2001; GREEN, WATSON e COLLINS, 2015). No entanto, cientistas concluíram que precisavam ir além do estudo das sequências genômicas para uma completa compreensão da função e atividade das proteínas. Muitas das proteínas, após serem traduzidas pelos ribossomos, passam por modificações pós-traducionais (MPTs) que influenciam a sua função biológica por meio da alteração da sua localização subcelular, da sua interação com ligantes ou outras proteínas e seu estado funcional (GUO *et al.*, 2013; FORAN *et al.*, 2014; KAZLAUSKAITE *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2017). Grande parte dessas modificações são necessárias em muitos processos biológicos, como o crescimento celular, o metabolismo e regulações na

transcrição (WILSON e HOCHSTRASSER, 2016; KAMYNINA e STOVER, 2017; RICHARD, VETHANTHAM e MANLEY, 2017; HARDWICK, AZZARELLI e PHILPOTT, 2018). Assim, a capacidade de modificar as proteínas existentes permite um controle rápido e econômico da função de uma proteína. Desse modo, a célula pode responder rapidamente a estímulos sem grandes gastos energéticos e isso é particularmente importante na comunicação entre neurônios.

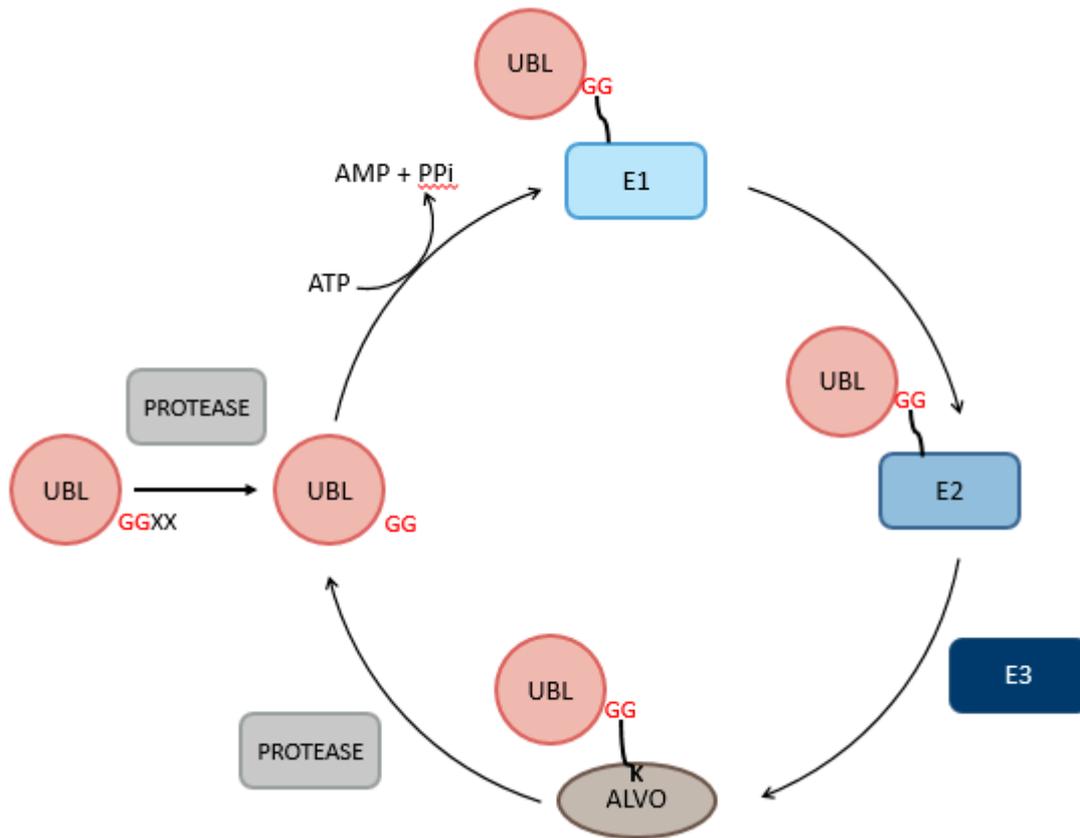
As MPTs consistem em modificações catalisadas por enzimas que reconhecem sequências específicas em proteínas alvo (DWORKIN, 2015; IYER *et al.*, 2017). Dentre as MPTs mais simples estão a fosforilação e a acetilação. Considerada uma das mais comuns e importantes MPTs, a fosforilação consiste na adição de um grupo fosfato (PO<sub>4</sub>) em resíduos de serina, treonina ou tirosina de proteínas alvo pelas cinases (PATWARDHAN e MILLER, 2007; DWORKIN, 2015). A ativação e inativação de diversas enzimas e receptores celulares ocorrem por meio da fosforilação (JOHNSON e STOOTHOFF, 2004; ARDITO *et al.*, 2017; FOSTER e VAUGHAN, 2017) acetilação, grupos acetil (CH<sub>3</sub>CO) doados por enzimas acetil coenzima-A (CoA) são adicionados a resíduos de lisina de proteínas alvo influenciando sua estabilidade, dobramento, interação com outras proteínas e localização celular (BAEZA, SMALLEGAN e DENU, 2016; DRAZIC *et al.*, 2016; REE, VARLAND e ARNESEN, 2018).

Nos anos 80, a importância das MPTs teve um ápice com a descoberta da ubiquitinação (CIECHANOVER, FINLEY e VARSHAVSKY, 1984; DEMARTINO *et al.*, 1989) e, posteriormente, de MPTs geradas por modificadores tipo ubiquitina (*ubiquitin-like modifiers* – UBLs) de grande importância para a regulação de inúmeros processos biológicos (HOCHSTRASSER, 2000; CAPPADOCIA e LIMA, 2018).

### 1.1.1 A Ubiquitina e a família dos modificadores tipo ubiquitina

A ubiquitina (Ub) e os UBLs são pequenas proteínas de aproximadamente 8-20 kDa que se ligam de forma covalente em resíduos de lisina de proteínas alvo (CIECHANOVER, FINLEY e VARSHAVSKY, 1984; CAPPADOCIA e LIMA, 2018). O processo de ubiquitinação e modificação por UBLs (Figura 1) é mais complexo que a fosforilação e acetilação, envolvendo uma cascata de enzimas

que incluem as enzimas E1 ativadora, E2 conjugadora e E3 ligase, bem como proteases específicas na desconjugação (VARSHAVSKY, 2017; CAPPADOCIA e LIMA, 2018).

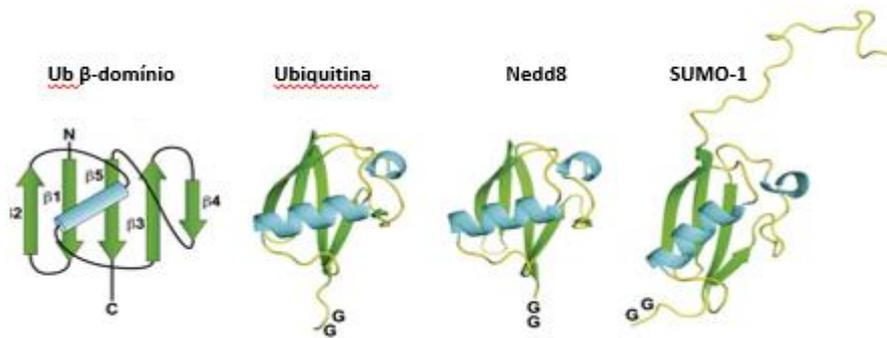


**Figura 1: Ciclo de conjugação e desconjugação de modificadores tipo ubiquitina.** Os UBLs são tipicamente expressos como proteínas precursoras com resíduos extras (XX) em seus terminais carboxila. Proteases específicas clivam a proteína precursora para gerar o UBL maduro expondo a região di-glicina (GG) no terminal carboxila. Um UBL maduro é então ligado via uma ligação tioéster ao resíduo catalítico de cisteína de sua enzima de ativação E1 de maneira dependente de ATP. O UBL é então transferido para o resíduo de cisteína catalítica em uma enzima conjugadora E2. Finalmente, o UBL é transferido para um substrato, geralmente com o auxílio de uma ligase E3, formando uma ligação isopeptídica com um substrato no resíduo de lisina. Proteases específicas podem remover o UBL do substrato. Fonte: Figura adaptada de FLOTHO e MELCHIOR (2013).

A MPT gerada pelos UBLs é o principal mecanismo regulatório de diferentes processos biológicos importantes em eucariotos. Para o processo de ubiquitinação nos mamíferos, são encontradas apenas duas E1, porém

diferentes E2, E3 e deubiquitinases já foram identificadas (MEVISSSEN e KOMANDER, 2017; VARSHAVSKY, 2017; ZHENG e SHABEK, 2017). Na ubiquitinação, os substratos podem ser mono ou poli-ubiquitinados sendo reconhecidos por receptores que contém domínios de ligação de ubiquitina (OHTAKE e TSUCHIYA, 2017; VARSHAVSKY, 2017). Cadeias de poli-Ub são conhecidas por sinalizarem proteínas para degradação, principalmente via proteassoma 26S (SAEKI, 2017; VARSHAVSKY, 2017). No entanto, a ubiquitinação também possui função não proteolítica, geralmente por ligação monomérica da Ub. Essa sinalização não proteolítica está envolvida na regulação da interação, localização e atividade de algumas proteínas, como o fator de transcrição p53 que após ser multi-mono-ubiquitinado é exportado para fora do núcleo (LOHRUM *et al.*, 2001).

Estruturalmente, os UBLs possuem um pequeno domínio em comum e uma glicina no terminal carboxila essencial para reação de modificação de uma proteína-alvo (Figura 2) (VIERSTRA, 2012). Até o presente momento, nove famílias de UBLs foram identificadas em mamíferos (CAPPADOCIA e LIMA, 2018). Dentre elas, a proteína Nedd8, do inglês *neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*, é o UBL mais similar à Ub e atua na regulação de enzimas E3 da ubiquitinação (ENCHEV, SCHULMAN e PETER, 2015). A Neddilação da E3 é de extrema importância para controle de diferentes proteínas correlacionadas a doenças, como por exemplo o câncer (TANAKA, NAKATANI e KAMITANI, 2013; ZHOU *et al.*, 2019). Entretanto, o sistema de modificação por UBL melhor estudado até o momento é o da família SUMO, do inglês *small ubiquitin-related modifier*, com inúmeras funções essenciais nos eucariotos (FLOTHO e MELCHIOR, 2013; HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014; PICHLER *et al.*, 2017).



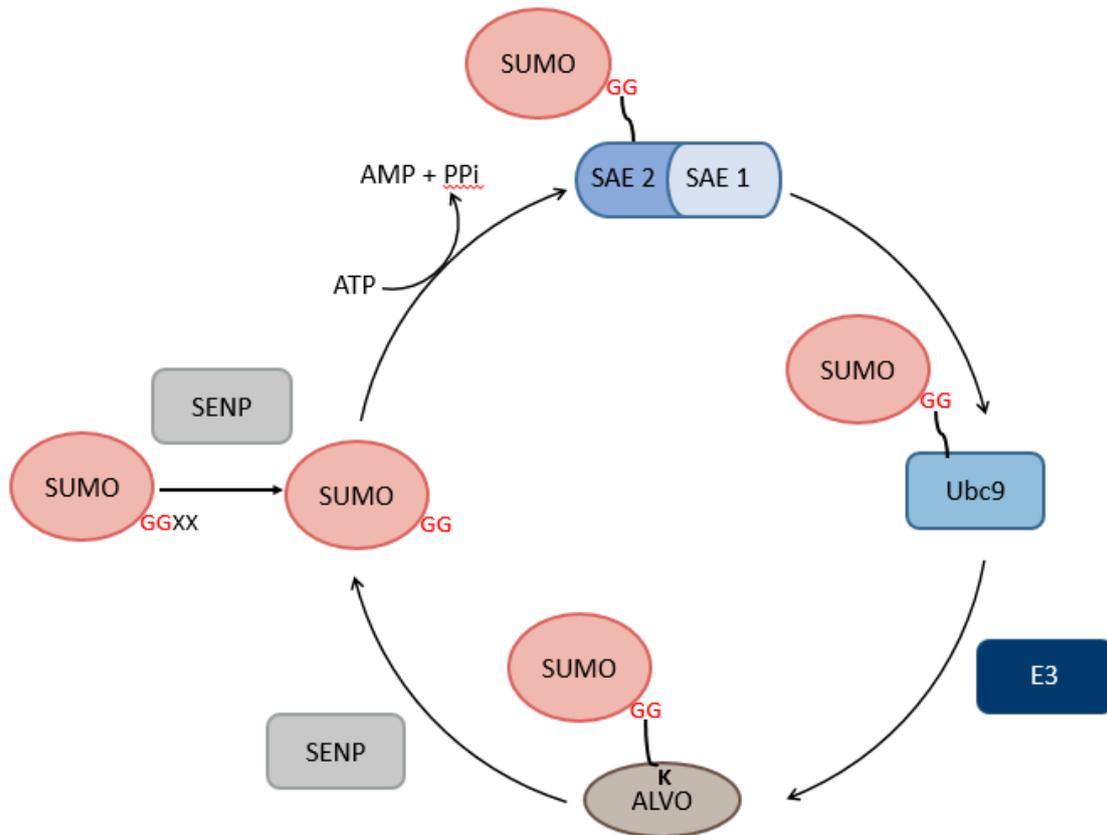
**Figura 2: Diagramas tridimensionais em fita da Ub e dos UBLs Nedd8 e SUMO-1.** Na esquerda, está um esquema mostrando o arranjo da estrutura secundária da hélice  $\alpha$  e  $\beta$ . Em seguida são mostradas as formas da ubiquitina e as UBLs Nedd8 e SUMO-1 com terminal carboxila exposto contendo o grupamento glicina-glicina indicado. Fonte: Figura adaptada de VIERSTRA (2012).

## 1.2 SUMOilação, o processo de modificação pela SUMO

SUMO, uma pequena molécula de aproximadamente 11 kDa, está presente todos os organismos eucariotos (DIECKHOFF *et al.*, 2004; CIMAROSTI *et al.*, 2008; NIE *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2010; ELROUBY, 2015). Sua descoberta, há aproximadamente três décadas, foi um tanto quanto difícil devido à instabilidade de sua ligação aos substratos. Finalmente, pela observação da ligação estável da proteína RanGAP1, *Ran GTPase-activating protein 1*, com SUMO, obteve-se a descoberta da SUMOilação nos anos 90 (MATUNIS, COUTAVAS e BLOBEL, 1996). Após o avanço em métodos experimentais que previnem a desconjugação SUMO-substrato, muitos substratos da SUMOilação foram e continuam sendo identificados (KUMAR e ZHANG, 2015; CHEN *et al.*, 2020).

Como mencionado anteriormente, a MPT por uma proteína UBL é processada pela ação hierárquica de uma tríade enzimática. Desse modo, antes do primeiro ciclo de conjugação, a forma precursora inativa da SUMO é maturada por proteases SUMO específicas membros da família de sentrininas, denominadas SENPs (*sentrin-specific proteases*) em mamíferos. Esta forma madura de SUMO é então ativada em uma reação que consome ATP pela enzima E1, um heterodímero de SAE1 e SAE2, respectivamente *SUMO-activating enzyme 1* e *SUMO-activating enzyme 2*. A SUMO ativada está pronta

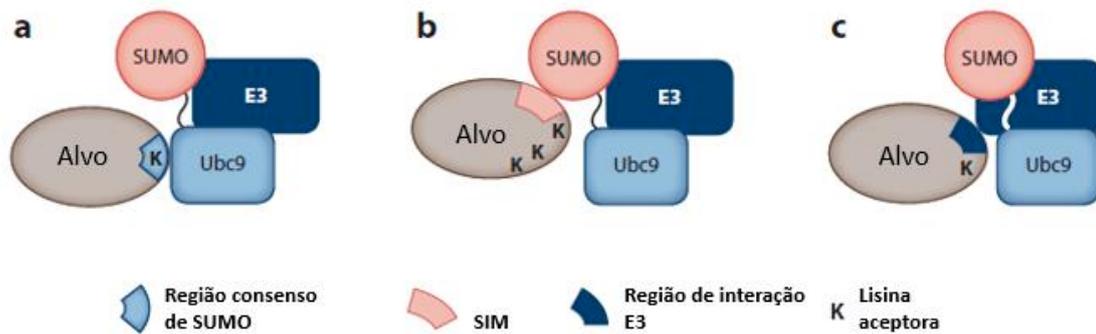
para ser então transferida para a proteína-alvo, o que ocorre diretamente por meio da ação catalítica da enzima conjugadora E2 Ubc9, do inglês *ubiquitin carrier protein 9*, ou com o auxílio de uma enzima ligase E3, formando uma ligação isopeptídica. Os detalhes do ciclo dinâmico e reversível da SUMOilação estão descritos na figura 3.



**Figura 3: Ciclo de SUMOilação e de-SUMOilação.** Para iniciar um ciclo de SUMOilação uma SUMO deve ser proteoliticamente clivada para expor a região glicina-glicina (GG) no seu terminal carboxila. Isto é conseguido pelas proteases específicas da SUMO da família SENP. A SUMO madura é ativada pelo heterodímero E1 SAE1 / SAE2 em uma etapa que consome ATP, resultando na formação de uma ligação tioéster entre a glicina C-terminal de SUMO e a cisteína catalítica (C) de SAE2. Após, a SUMO é então transferida para a cisteína catalítica da enzima E2, Ubc9, formando novamente uma ligação tioéster. A Ubc9 catalisa a formação de uma ligação isopeptídica entre a glicina e o terminal carboxila de SUMO e um resíduo de lisina (K) no substrato, geralmente junto com uma ligase específica de SUMO E3. A SUMOilação é reversível devido às proteases específicas de SUMO que clivam a ligação isopeptídica e libertam a SUMO para outros ciclos. Abreviação: XX, aminoácidos do terminal carboxila da região GG em SUMO imatura. Fonte: Figura adaptada de FLOTHO e MELCHIOR (2013).

As proteínas podem ser modificadas com uma única SUMO (mono-

SUMOilação), com múltiplas SUMOs (multi-SUMOilação) ou com uma cadeia de diversas SUMOs (poli-SUMOilação) (TATHAM *et al.*, 2001; WILKINSON e HENLEY, 2010). No entanto existem duas condições para que uma proteína seja alvo da SUMOilação além de possuir o resíduo de lisina como receptor. A proteína deve ter uma afinidade direta com o complexo SUMO-Ubc9 ou ser reconhecida por uma E3 específica que sinaliza e atrai o complexo SUMO-Ubc9 para próximo da proteína (WILKINSON e HENLEY, 2010; FLOTHO e MELCHIOR, 2013). Para facilitar a compreensão, três mecanismos de seleção da lisina na proteína-alvo são propostos (Figura 4). A primeira possibilidade é a localização da lisina aceptora na região consenso de SUMOilação (SUMO *consensus motif* - SCM) reconhecida diretamente pela Ubc9 (BERNIER-VILLAMOR *et al.*, 2002). Uma SCM é composta pela sequência  $\Psi Kx E$ , onde  $\Psi$  é um resíduo hidrofóbico grande, K é a lisina alvo, X é um aminoácido qualquer e E é um aspartato ou glutamato (PICHLER *et al.*, 2017). De acordo com análises proteômicas, o SCM está presente em pelo menos metade dos alvos da SUMOilação até então identificados e novas sequências de regiões aceptoras de SUMO já foram identificadas (MATIC *et al.*, 2010). A segunda possibilidade é a presença da região SIM (SUMO-*interacting motifs*) na proteína-alvo próximo à lisina aceptora que promove atração do complexo SUMO-Ubc9 para que ocorra a modificação (CHANG *et al.*, 2011). A SUMOilação dependente de um SIM pode ocorrer em múltiplas lisinas, sejam pertencentes a um SCM ou não. Por último, a enzima E3 pode rearranjar a proteína-alvo e a Ubc9 em conformação favorável para um resíduo de lisina se ligar à SUMO. Todas as três possibilidades de reconhecimento podem ocorrer mutuamente (FLOTHO e MELCHIOR, 2013).



**Figura 4: Mecanismos de seleção de lisina aceptora de SUMO.** a) a lisina aceptora (K) presente na região SCM é reconhecida diretamente pela Ubc9; b) a proteína-alvo recruta o complexo SUMO-Ubc9 por meio da interação com uma região SIM permitindo a modificação de lisinas próximas a ela; c) a interação da proteína-alvo com a E3 ocorre em uma posição preferencial para a modificação de uma lisina aceptora específica. Fonte: Figura adaptada de FLOTHO e MELCHIOR (2013).

### 1.2.1 A maquinaria proteica da SUMOilação

Em mamíferos, as proteínas SUMO são expressas em três isoformas diferentes: SUMO-1, SUMO-2 e SUMO-3 (SAITOH e HINCHEY, 2000). Estudos apontam uma possível existência das isoformas SUMO-4 e 5, porém até o momento ambas foram caracterizadas apenas como pseudogenes (SU e LI, 2002). Entre elas, SUMO-1 compartilha menos de 50% da sequência de aminoácidos com SUMO-2 e SUMO-3. Por outro lado, SUMO-2 e SUMO 3 são quase idênticas, não sendo possível distingui-las por anticorpos disponíveis sendo referidas frequentemente como SUMO-2/3 (SAITOH e HINCHEY, 2000).

As proteases SENPs atuam tanto no processo de maturação da SUMO como na sua desconjugação do substrato (MIKOLAJCZYK et al., 2007; NAYAK e MULLER, 2014). Foram identificadas seis SENPs em mamíferos (SEN1, SEN2, SEN3, SEN5, SEN6 e SEN7), as quais diferem quanto sua especificidade pelas isoformas de SUMO, na seletividade pelos processos de maturação e deSUMOilação, e localização subcelular (MIKOLAJCZYK et al., 2007; NAYAK e MULLER, 2014). As diferentes SENPs possuem distribuição celular distinta, o que sugere um fator importante na restrição de sua atuação e especificidade quanto ao substrato (GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007; HENLEY, CARMICHAEL e WILKINSON, 2018).

Diferentemente da Ub, a Ubc9 é a única enzima E2 conjugadora até hoje

identificada (PICHLER et al., 2017). Devido a sua função essencial na SUMOilação, a regulação dos níveis de expressão da Ubc9, bem como a regulação de sua atividade catalítica, interferem diretamente na SUMOilação celular global (MATTOSCIO et al., 2015; PICHLER et al., 2017; WRIGHT et al., 2019). Além disso, a ausência da Ubc9 é letal na maioria dos organismos eucariotos (HAYASHI et al., 2002).

A enzima E3 ligase interage com o complexo SUMO-Ubc9 e o substrato alinhando a SUMO em uma conformação ótima, altamente reativa, para sua transferência para o substrato (CAPPADOCIA, PICHLER e LIMA, 2015; STREICH e LIMA, 2016). Até o presente momento, três grupos de SUMO E3 ligases foram caracterizadas estrutural e bioquimicamente com função catalítica na SUMOilação: a família SP-RING (Siz/Pias), RanBP2 e a família ZNF451 (PICHLER et al., 2017). Tanto a seletividade quanto a especificidade das enzimas SUMO E3 em relação ao substrato são pouco compreendidas.

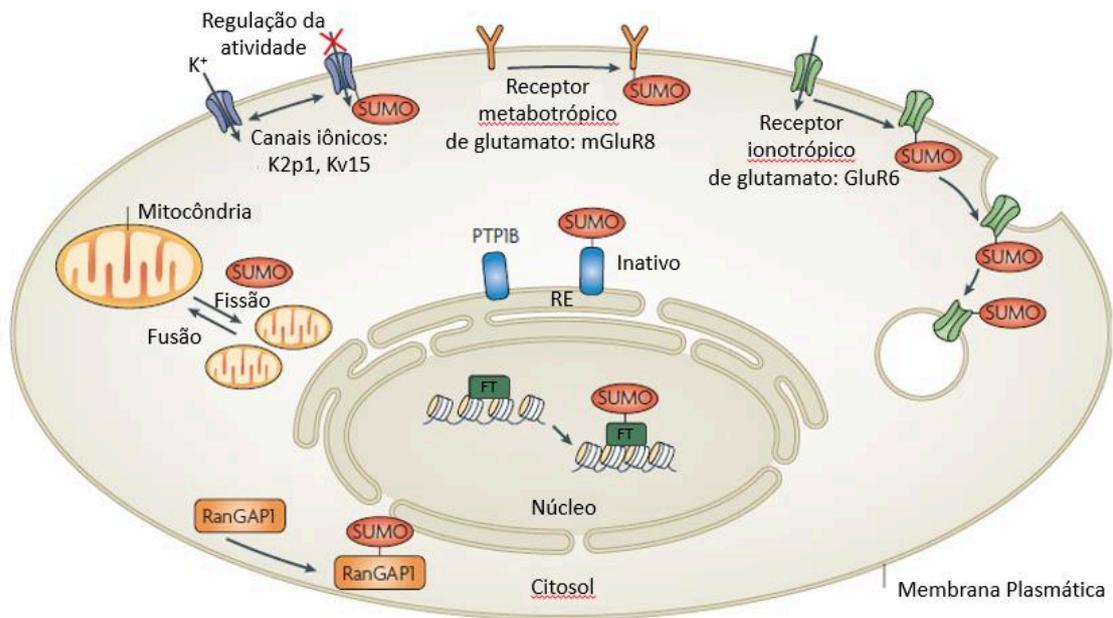
Ainda não foi esclarecido como uma única maquinaria de SUMOilação determina qual isoforma de SUMO será conjugada a um substrato alvo específico, sabendo-se que muitos deles podem ser modificados por ambas as isoformas (SAITOH e HINCHEY, 2000; WILKINSON e HENLEY, 2010). Visto que a Ubc9 e a SUMO E1 possuem pouca preferência entre SUMO-1 e SUMO-2/3 para o processo de conjugação (TATHAM et al., 2001), sugere-se que a especificidade SUMO-substrato venha principalmente da SUMO E3 (HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014).

### 1.2.2 Consequências funcionais da SUMOilação

As consequências funcionais da SUMOilação de um substrato específico são difíceis de serem previstas devido a diversidade de substratos que podem ser SUMOilados. Entretanto, considerando o seu papel nos substratos já identificados, a SUMOilação pode provocar quatro tipos de efeitos diferentes sobre a proteína-alvo: redução da interação proteína substrato-proteína por bloqueio do sítio de interação; aumento da interação proteína substrato-proteína por possibilitar um novo domínio de interação; mudança na conformação da proteína substrato e, conseqüentemente, regulação da sua função e/ou atividade; alteração da localização celular da proteína-alvo

(GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007; HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014).

Os primeiros relatos de SUMOilação foram feitos a partir de observações em substratos nucleares, cuja função associava-se à reparação de DNA e processos de transcrição (HOEGE *et al.*, 2002; PFANDER *et al.*, 2005). Porém, a SUMOilação não está restrita ao compartimento nuclear. Atualmente, já foram identificados diversos substratos citoplasmáticos, de membrana celular e mitocondriais, como podemos ver alguns exemplos na figura 5 (GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007; HENLEY, CARMICHAEL e WILKINSON, 2018).



**Figura 5: Proteínas SUMOiladas são encontradas em toda a célula.** Muitos dos alvos da SUMO são proteínas nucleares, como fatores de transcrição (FTs) e co-reguladores ou proteínas envolvidas na organização, replicação e reparo da cromatina. No entanto, encontram-se alvos da SUMO também na membrana plasmática, no retículo endoplasmático (RE) e no citoplasma. A SUMOilação da RanGAP1 leva a alterações em sua localização celular: a proteína não modificada é solúvel no citosol, mas é recrutada para o poro nuclear após conjugação com SUMO 1. Os canais iônicos localizados na membrana plasmática K2P1 e Kv1.5 possuem atividade modificada quando SUMOilados. A SUMOilação do receptor de glutamato GluK2 induz sua internalização. O exato papel da SUMOilação do receptor metabotrópico 8 de glutamato (mGluR8) ainda é desconhecido. A tirosina fosfatase-1B (PTP1B) localizada no RE é inativada pela SUMOilação. A SUMOilação de proteínas tipo dinamina afeta a dinâmica mitocondrial, bem como a superexpressão de SUMO ou regulação negativa de isopeptidases específicas. Fonte: Figura adaptada de GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR (2007).

### 1.3 A SUMOilação em processos fisiológicos e patológicos

Em organismos complexos, está claramente demonstrado que a SUMOilação é essencial em células proliferativas (CIRIA *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2018). No entanto, o mesmo não se pode afirmar para células já diferenciadas e células não-proliferativas. De acordo com um estudo realizado em camundongos e outro em drosófilas, a necessidade de que ocorra o processo de SUMOilação

pode variar significativamente entre as diferentes células e tecidos (DEMARQUE *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2012). Demonstrou-se que a ausência da enzima Ubc9 em tecido gastrointestinal de camundongos adultos provoca a depleção do compartimento proliferativo intestinal de células tronco, levando o camundongo à morte em seis dias (DEMARQUE *et al.*, 2011). Em drosófilas, o complexo ativador E1 é essencial para as divisões mitóticas, mas são dispensáveis para a viabilidade celular, homeostase em células não proliferativas (YIN *et al.*, 2012). Esses dois estudos corroboram a ideia de que células em rápido processo de divisão se beneficiam de eficientes ciclos de SUMOilação. Assim, cientistas puderam correlacionar de forma condizente os altos níveis de SAE1/SAE2, Ubc9 e SUMO isopeptidases com o desenvolvimento de tumores e metástases (HAN *et al.*, 2018). Por outro lado, a SUMOilação de uma proteína específica pode ser crucial. Por exemplo, uma mutação no gene do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) prejudicando sua SUMOilação aumenta significativamente o risco do desenvolvimento de melanoma e carcinoma celular renal (BERTOLOTTI *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011).

Muitos fatores de transcrição essenciais para a morfogênese e funcionamento normal do coração são regulados pela SUMOilação. Além disso, camundongos *knockout* para SUMO 1 apresentam cardiopatias congênitas com altas taxas de mortalidade (GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007). As evidências de que a SUMOilação regula proteínas do sistema imunológico têm crescido ao longo dos anos. As vias sinalizadoras que resultam na produção de mediadores anti-microbianos e início da resposta imune, como o NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor kappa B*, e os IRFs, do inglês *Interferon regulatory factors* são finamente reguladas pela SUMOilação (ADORISIO *et al.*, 2017). Além disso, a SUMOilação está envolvida na regulação da atividade de células T regulatórias, sendo importante para evitar uma excessiva resposta imune e, conseqüentemente, doenças autoimunes (ADORISIO *et al.*, 2017).

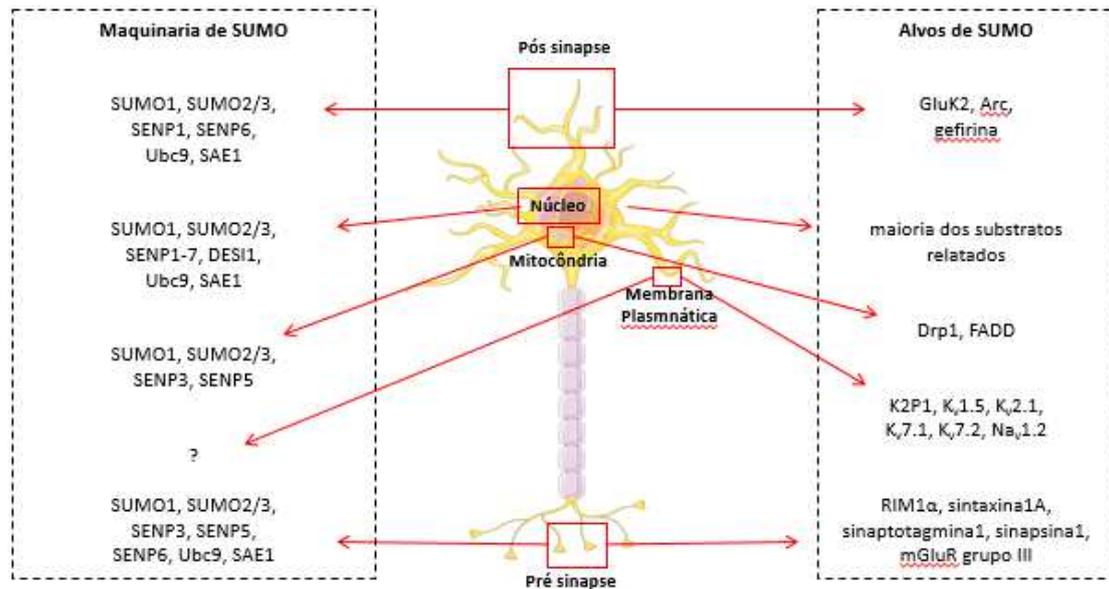
Dados recentes demonstram a importância da SUMOilação no desenvolvimento cerebral e no envelhecimento (PRINCZ e TAVERNARAKIS, 2017; SCURR, HAFERKAMP e RIZOS, 2017). Durante o desenvolvimento de camundongos, a presença de SUMO-2/3 é essencial, porém a falta de SUMO-1 pode ser compensada pela SUMO-2/3. O papel da SUMOilação no envelhecimento ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, estudos

demonstram a importância da SUMOilação na manutenção da integridade dos telômeros (YALCIN, SELENZ e JACOBS, 2017), na regulação da autofagia, na homeostase de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na sinalização de fatores de crescimento (PRINCZ e TAVERNARAKIS, 2017; SCURR, HAFERKAMP e RIZOS, 2017).

### 1.3.1 A SUMOilação na função e disfunção neuronal

Com os avanços no estudo da SUMOilação, sabe-se hoje que ela é fundamental para o funcionamento celular em condições normais, sendo considerada um regulador crítico de neurônios e funções sinápticas (HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014). A distribuição da maquinaria e o perfil de SUMOilação em neurônios ainda não estão totalmente elucidados. Porém, sabe-se que é encontrada nos axônios, dendritos e sinapses além do compartimento nuclear (Figura 6) (HENLEY, CARMICHAEL e WILKINSON, 2018).

Além de possuir um papel chave no desenvolvimento e diferenciação dos neurônios, a SUMOilação também exerce função na excitabilidade neuronal e potencial de membrana regulando canais iônicos nos neurônios (WILKINSON, NAKAMURA e HENLEY, 2010; LUO *et al.*, 2013; BENSON, INIGUEZ-LLUHI e MARTENS, 2017). Na neurotransmissão, o papel da SUMOilação é um tanto complexo. De acordo com um estímulo específico, a conjugação da SUMO com proteínas pré-sinápticas pode aumentar ou reduzir a liberação de neurotransmissores (FELIGIONI, NISHIMUNE e HENLEY, 2009). Na pós-sinapse, também existem diversas proteínas alvo da SUMO. A mais bem caracterizada é a subunidade GluK2 do receptor kainato, cuja SUMOilação faz-se necessária para a depressão de longa duração (LTD) (CHAMBERLAIN *et al.*, 2012).



**Figura 6: Localização subcelular da maquinaria de SUMO em neurônios.** Exemplos de proteínas substrato para SUMOilação (caixa pontilhada à direita) e componentes da maquinaria de SUMOilação (caixa pontilhada à esquerda) podem ser encontrados nos neurônios em diferentes localizações. Embora a maioria dos substratos de SUMO conhecidos sejam proteínas nucleares, proteínas pré e pós-sinápticas também são SUMOiladas. Por exemplo, na pré-sinapse, a SUMOilação altera a função de várias proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores para controlar a eficácia da transmissão sináptica. Na pós-sinapse, a SUMOilação regula a atividade de receptores e proteínas de ancoramento. Além disso, a SUMOilação de várias classes de canais iônicos localizados na membrana plasmática alteram sua atividade e sintonizam a excitabilidade neuronal. A SUMOilação de proteínas mitocondriais, como por exemplo, Drp-1 e FADD, desempenha papéis na dinâmica mitocondrial e na respostas ao estresse. Fonte: Figura adaptada de HENLEY, CARMICHAEL e WILKINSON (2018).

Por outro lado, a elucidação sobre o papel da SUMOilação nas doenças neurodegenerativas têm avançado nos últimos anos levando muitos cientistas a acreditarem na hipótese de que a SUMOilação seja um fator crítico na patofisiologia de algumas delas (STEFFAN *et al.*, 2004; CIMAROSTI *et al.*, 2008; ECKERMANN, 2013; GUERRA DE SOUZA, PREDIGER e CIMAROSTI, 2016; MARTINS, TASCA e CIMAROSTI, 2016). Assim, proteínas alvo de SUMOilação e as consequências desses mecanismos em neuropatologias têm sido o foco de interesse de muitos pesquisadores.

### 1.3.1.1 A SUMOilação na doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma doença hereditária, progressiva e neurodegenerativa caracterizada pela atrofia gradativa do estriado resultante do acúmulo da proteína huntingtina (HTT) mutada em neurônio estriatais

(SUBRAMANIAM *et al.*, 2009; PANDEY e RAJAMMA, 2018). Pessoas com DH apresentam déficit cognitivo, problemas psiquiátricos e disfunções motoras (PANDEY e RAJAMMA, 2018). A HTT é substrato da SUMOilação e na presença de uma E3 específica tem sua conjugação aumentada e consequente aumento da sua citotoxicidade, o que não ocorre quando essa E3 está ausente (STEFFAN *et al.*, 2004; OCHABA *et al.*, 2016). Além disso, a remoção da lisina acceptora na HTT mutada resulta em toxicidade reduzida da proteína (STEFFAN *et al.*, 2004).

#### 1.3.1.2 A SUMOilação na doença de Alzheimer

Considerada a maior causa de demência crônica, a doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de agregados de proteína beta-amilóide (A $\beta$ ), produto da clivagem da proteína precursora amilóide (APP), e emaranhados neurofibrilares de proteína tau (LANE, HARDY e SCHOTT, 2018). Ambas as proteínas APP e tau são alvos de SUMOilação, porém as consequências desse processo de modificação são contraditórias (MARTINS, TASCA e CIMAROSTI, 2016). Algumas evidências mostraram que a SUMOilação de APP por SUMO 1 e a superexpressão da Ubc9 estão associadas a níveis reduzidos de agregados da proteína A $\beta$  (ZHANG e SARGE, 2008). Porém, posteriormente a esses achados, dados sugerem que a superexpressão de SUMO-1 pode acelerar o acúmulo de vacúolos autofágicos e, conseqüentemente, promover a produção de A $\beta$  (YUN *et al.*, 2013). Em relação à SUMO-2/3, sua superexpressão pode reduzir dramaticamente a produção de A $\beta$ , enquanto uma forma mutante de SUMO-2/3 eleva sua produção (LI *et al.*, 2003). Por outro lado, agregados da proteína tau foram co-localizados com SUMO-1 em modelos animais transgênicos para a doença de Alzheimer (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Além disso, a hiperfosforilação da tau promove sua SUMOilação com consequente redução de sua solubilidade e degradação (LUO *et al.*, 2014). Análises de tecido hipocampal *post-mortem* de pacientes de doença de Alzheimer mostraram uma desregulação no processo de SUMOilação (AHN *et al.*, 2009). Estudos mais recentes em amostras de plasma sanguíneo de pacientes com doença de Alzheimer correlacionaram níveis elevados de SUMO-1 ao baixo *score* obtido pelo mini-exame de estado mental (MMSE) (HOPPE, SALBEGO e CIMAROSTI, 2015). O que sugere a SUMO como um possível marcador biológico de risco

para DA.

### 1.3.1.3 A SUMOilação na isquemia e hipóxia

A isquemia cerebral é uma forma severa de hipóxia com consequente estresse celular e morte neuronal (RANDOLPH, 2016). De forma interessante, observou-se que a SUMOilação atua de forma neuroprotetora na hibernação de esquilos, situação com condições celulares de estresse semelhantes à isquemia (LEE *et al.*, 2007). Durante esse processo natural de adaptação, os esquilos não sofrem danos cerebrais nem perda celular e apresentam níveis elevados de SUMOilação. Dados prévios do nosso grupo mostraram aumento nos níveis de conjugados de SUMO-1 e SUMO-2 observado em diferentes modelos *in vivo* (CIMAROSTI *et al.*, 2008) e *in vitro* (CIMAROSTI *et al.*, 2012) de isquemia. Além disso, Cimarosti e colaboradores (2012) mostram no mesmo trabalho que a superexpressão da SUMO protease SENP aumenta a vulnerabilidade neuronal à morte celular induzida pelo processo isquêmico de privação de oxigênio e glicose (POG). Datwyler e colaboradores (2011) demonstraram no modelo de POG que o silenciamento da SUMO-2/3 também aumenta a vulnerabilidade neuronal à morte celular. Esses dados suportam a ideia prévia de que a SUMOilação pode atuar como um mecanismo neuroprotetor frente a condições de estresse celular.

Algumas proteínas alvo da SUMOilação estão envolvidas na resposta neuronal ao estresse hipóxico induzido pela isquemia, como por exemplo a proteína relacionada à dinamina 1 (Drp-1) (GUO *et al.*, 2013). A Drp-1 é uma GTPase envolvida na dinâmica mitocondrial, localizada preferencialmente no citosol e recrutada para a membrana mitocondrial externa (MME) onde se liga ao receptor Mff, do inglês *mitochondrial fission factor*, para que ocorra o processo de fissão da organela (LOSON *et al.*, 2013). Em condições de estresse celular induzido pela POG, a redução nos níveis de SENP3 prolonga a SUMOilação da Drp-1 por SUMO-2/3, o que inibe sua translocação para a mitocôndria e o aumento da fissão mitocondrial, prevenindo liberação de citocromo c e a morte celular (GUO *et al.*, 2013). Por outro lado, após uma reoxigenação ocorre recuperação nos níveis de SENP3 que induz a de-SUMOilação da Drp-1, facilitando seu recrutamento pelo receptor Mff localizado na MME e consequentemente o aumento da fissão mitocondrial (GUO *et al.*, 2013; GUO *et*

*al.*, 2017). Novamente podemos observar uma contribuição neuroprotetora da SUMOilação.

#### 1.3.1.4 A SUMOilação e a doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma neuropatia progressiva que afeta principalmente o sistema motor voluntário pela degeneração de neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra para o estriado. A maioria dos casos de DP até hoje identificados são de origem idiopática, porém fatores genéticos, ambientais e a SUMOilação também estão implicados na patologia da doença (LUNATI, LESAGE e BRICE, 2018).

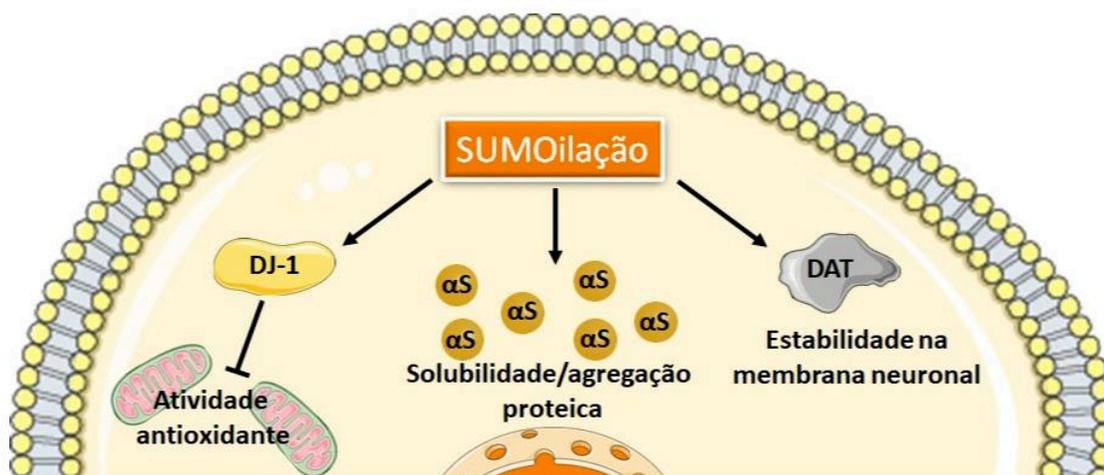
Algumas proteínas correlacionadas à patogênese da DP são alvos da SUMOilação (Figura 7) (JUNQUEIRA *et al.*, 2019). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína encontrada na maioria das inclusões citoplasmáticas que caracterizam a DP, os corpos de Lewy. Grande é a controvérsia quando se diz respeito às consequências da SUMOilação da  $\alpha$ -sinucleína na DP. Em modelos animais, estudos apontam para um papel promotor de agregação proteica (OH *et al.*, 2011), enquanto outros sugerem que a  $\alpha$ -sinucleína SUMOilada tende à menor agregação e toxicidade (KRUMOVA *et al.*, 2011).

Além disso, outras proteínas associadas à patologia da DP como a parkina e uma forma mutante da DJ-1 interagem com a SUMO (SHINBO *et al.*, 2006). A parkina é uma enzima E3 ubiquitina ligase cuja forma mutante caracteriza uma das principais causas de DP genética (ARKINSON e WALDEN, 2018). Até o presente momento não foi demonstrado que a parkina é SUMOilada, no entanto, ela interage com SUMO-1 de forma não covalente aumentando sua atividade de ubiquitina ligase (PILLA *et al.*, 2012). Outra causa genética da DP, porém de baixa frequência (ECKERMANN, 2013), é a mutação da proteína glicase DJ-1, cuja principal função é combater o estresse celular oxidativo (TAIRA *et al.*, 2004). A SUMOilação exacerbada de uma das formas mutantes da DJ-1 provoca a perda do seu papel antioxidante (SHINBO *et al.*, 2006).

Um estudo pioneiro com amostras de sangue de pacientes com DP avaliou níveis de diferentes MPTs da proteína  $\alpha$ -sinucleína (VICENTE MIRANDA *et al.*, 2017). Dentre elas, identificou-se um nível reduzido da SUMOilação da  $\alpha$ -

sinucleína por SUMO-1 nos eritrócitos de pacientes de DP comparado aos eritrócitos de indivíduos saudáveis. Por meio de uma análise combinatória das alterações encontradas nas MPTs e a progressão da DP, a SUMOilação está dentre um dos potenciais marcadores biológicos da evolução da DP.

Mais recentemente, um novo alvo de SUMO foi identificado, o transportador de dopamina (DAT). O DAT é uma proteína de membrana responsável pela recaptação do neurotransmissor dopamina para os terminais pré-sinápticos (HONG e AMARA, 2013; RUDNICK *et al.*, 2014; GERMAN *et al.*, 2015). Análises de imagem do DAT são utilizadas como marcador biológico para avaliar o progresso da DP, na qual encontra-se reduzido de 50-70% (IKEDA *et al.*, 2019). A superexpressão de SUMO-1 e Ubc9 em cultura de células induziram a SUMOilação de DAT e reduziram sua ubiquitinação e degradação. Conseqüentemente, obteve-se aumento da estabilidade do receptor na membrana neuronal e a sua capacidade de recaptação de dopamina (CARTIER *et al.*, 2019). Assim, os autores sugerem o mecanismo de SUMOilação, e mais especificamente a conjugação de SUMO-1 com DAT, como potenciais alvos terapêuticos na regulação da recaptação de dopamina e sinalização dopaminérgica (CARTIER *et al.*, 2019).



**Figura 7: Alvos de SUMOilação na doença de Parkinson.** A SUMOilação exacerbada de uma das formas mutantes da DJ-1 provoca a perda do seu papel antioxidante. A SUMOilação da  $\alpha$ -sinucleína interfere na sua solubilidade, podendo contribuir ou evitar a sua agregação. A SUMOilação de DAT reduz sua ubiquitinação e degradação com conseqüente aumento da sua estabilidade na membrana neuronal. DJ-1: proteína glicase DJ-1;  $\alpha$ S:  $\alpha$ -sinucleína; DAT: transportador de dopamina. Fonte: Figura adaptada de GUERRA DE SOUZA, PREDIGER e CIMAROSTI (2016).

## 1.4 A doença de Parkinson

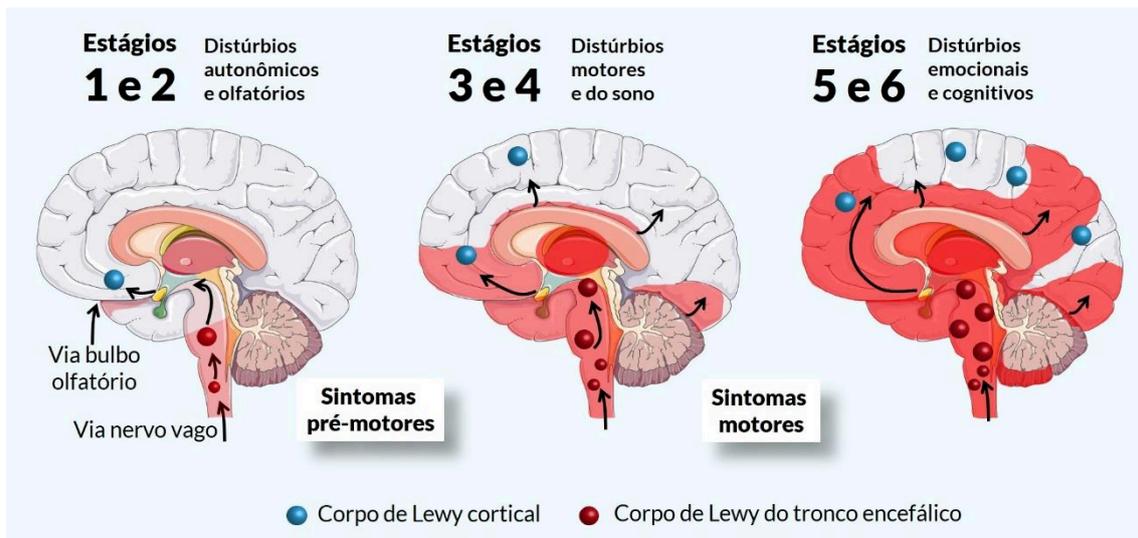
### 1.4.1 A neuropatologia e a etiologia da DP

Apesar do envelhecimento ainda ser considerado o maior fator de risco da DP, ela pode ter origem hereditária, comumente conhecida como DP familiar, ou esporádica, sendo esta consequente de fatores genéticos e ambientais (COSTELLO *et al.*, 2009; BLAUWENDRAAT, NALLS e SINGLETON, 2020). Variações em mais de 20 genes já foram correlacionadas à DP, como mutações no gene codificador da  $\alpha$ -sinucleína (SNCA) e da parkina (PARK2) (BLAUWENDRAAT, NALLS e SINGLETON, 2020). Dentre os fatores ambientais que contribuem ou modificam o risco à DP estão o cigarro (CHEN *et al.*, 2010), uso de ibuprofeno (GAO *et al.*, 2011), exposição a pesticidas (rotenona e paraquat) (COSTELLO *et al.*, 2009; TANNER *et al.*, 2011) e pró-neurotoxinas sintéticas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (LANGSTON, 2017). Entretanto, a exata influência de fatores genéticos e ambientais na DP esporádica ainda não está totalmente elucidada. Alguns mecanismos celulares em comum têm sido correlacionados como, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e agregação da  $\alpha$ -sinucleína (NIRANJAN, 2014; DEL TREDICI e BRAAK, 2016; ALEXOUDI, ALEXOUDI e GATZONIS, 2018; PARK, DAVIS e SUE, 2018), o que leva cientistas a crer na combinação de ambos os fatores para desencadear a DP esporádica.

Como já mencionado brevemente, a DP é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra e pela presença de corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes (KALIA e KALIA, 2015; REICH e SAVITT, 2019). Em consequência desse dano dopaminérgico, surgem os sintomas motores característicos da DP, como a perda de controle do movimento voluntário, bradicinesia, rigidez muscular e tremores de repouso comumente utilizados para fins de diagnóstico clínico (BALESTRINO e MARTINEZ-MARTIN, 2017). Por outro lado, dados clínicos como a presença de constipação, náuseas, disfagia, perda de olfato e problemas cognitivos também foram reportados por pacientes com DP (BALESTRINO e MARTINEZ-

MARTIN, 2017).

Esses sintomas juntamente com a identificação de corpos de Lewy em neurônios do trato olfatório e do sistema nervoso entérico (SNE) (LIDDLE, 2018) são evidências que suportam a hipótese de Braak postulada em 2003 (BRAAK *et al.*, 2004) . Primeiramente, a hipótese defendia a ideia que um patógeno como vírus ou bactéria incitava a agregação da  $\alpha$ -sinucleína e consequente distribuição padronizada dos agregados no SNC (BRAAK *et al.*, 2004). Em 2009, Braak e colaboradores sugeriram que a DP esporádica possivelmente teria início não só no SNE como também em neurônios da cavidade nasal. Como representado na figura 8, a nova hipótese postulou que a DP esporádica segue um padrão de dispersão de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, com início no trato olfatório e nervo vago ocupando gradativamente regiões do SNC até alcançarem a substância negra (HAWKES, DEL TREDICI e BRAAK, 2010). A hipótese de Braak é suportada por evidências clínicas de estágios iniciais da DP bem como por resultados de modelos experimentais. Em ambos são relatados distúrbios gastrointestinais e olfatórios antes do surgimento de sintomas motores, além da presença de agregados de  $\alpha$ -sinucleína no trato gastrointestinal, encontrados em modelos de DP inicial e avançada (PREDIGER *et al.*, 2011; BALESTRINO e MARTINEZ-MARTIN, 2017; PEREZ-PARDO *et al.*, 2018).



**Figura 8: Estágios da doença de Parkinson segundo Braak.** De acordo com a teoria de Braak, a DP se inicia pelo bulbo olfatório ou núcleo motor dorsal do nervo vago e se espalha para o locus coeruleus, substância negra e córtex cerebral. Os sintomas se iniciam com deficits não motores como distúrbios olfatórios (estágios 1 e 2) até ocorrer a neurodegeneração e consequente sintomas motores (estágios 3 e 4). Com o avanço da patologia (estágios 5 e 6), surgem distúrbios emocionais e cognitivos. O tempo total desses estágios leva em torno de 20 ou mais anos. Figura adaptada de DOTY (2012).

#### 1.4.2 A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo na DP

As mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento de ATP celular, molécula imprescindível em diversos procedimentos celulares, como na realização de sinapses, ativação de enzimas por meio da fosforilação, sendo essenciais para a sobrevivência neuronal (HORBAY e BILYY, 2016). Organelas altamente dinâmicas, as mitocôndrias também são a maior fonte de espécies reativas (ER) (NICKEL, KOHLHAAS e MAACK, 2014). Como mencionado anteriormente, diversos mecanismos patogênicos têm sido propostos para a DP, incluindo o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (SCHAPIRA, 1993; RYAN *et al.*, 2015; ZALTIERI *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2018; REEVE *et al.*, 2018).

A hipótese do envolvimento da mitocôndria na patogênese da DP surgiu através de experimentos demonstrando a inibição do complexo I mitocondrial (NADH/ ubiquinona oxidoreductase) presente em diferentes formas da DP (SCHAPIRA, 1993; RYAN *et al.*, 2015). A primeira evidência surgiu com o interesse na compreensão da ação da pró-neurotoxina MPTP após a

observação de que esse composto havia induzido sintomas parkinsonianos em um grupo de usuários de heroína sintética contaminada com MPTP (LANGSTON, 2017). Dessa forma, estudos demonstraram que o metabólito do MPTP, 1- metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>) (HERRAIZ, 2012), quando captado pelos neurônios dopaminérgicos da SN via DAT, possui ação inibitória do complexo I mitocondrial (HASEGAWA *et al.*, 1997; MAPA, LE e WIMALASENA, 2018). A disfunção desse complexo compromete todo o estado energético da célula, uma característica correlacionada à patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (BHAT *et al.*, 2015). A partir dessa descoberta, outras moléculas com atividade semelhante ao MPP<sup>+</sup> (como o paraquat) foram relacionadas à etiologia da DP (DI MONTE *et al.*, 1986; BETARBET *et al.*, 2000).

A dinâmica mitocondrial é muito sensível a mudanças fisiológicas e patológicas intracelulares que podem afetar o seu equilíbrio (HORBAY e BILYY, 2016). Uma alta taxa de fissão mitocondrial, seja por problemas estruturais ou funcionais da mitocôndria, pode elevar os níveis de EROs e gerar estresse oxidativo (YOULE e VAN DER BLIEK, 2012; NICKEL, KOHLHAAS e MAACK, 2014). As mitocôndrias são organelas dinâmicas que continuamente se dividem e se fundem, possuem uma expressão coordenada do DNA mitocondrial (DNAMt) (biogênese mitocondrial), sofrem degradação autofágica (mitofagia) e locomovem-se no meio intracelular, processos fundamentais para um controle adequado do tamanho, distribuição e qualidade mitocondria (TILOKANI *et al.*, 2018). A manutenção de todos esses processos possui papel fundamental na viabilidade neuronal e na adequada função sináptica, especialmente o equilíbrio dos processos de fissão e fusão mitocondrial (BERTHOLET *et al.*, 2016).

Por meio do processo de fissão, danos mitocondriais podem ser isolados em mitocôndrias destinadas a eliminação por mitofagia, evitando assim o acúmulo de mitocôndrias danificadas nas células (TILOKANI *et al.*, 2018). Além disso, a geração de mitocôndrias menores contribui para uma distribuição adequada dessas organelas ao longo dos dendritos e axônios, como também seu alcance até os terminais sinápticos, região de alta demanda energética (LI *et al.*, 2004; BERTHOLET *et al.*, 2016). Por outro lado, a fusão pode recuperar uma mitocôndria que sofreu danos proteicos e mutações

genéticas do seu DNA, além de contribuir para uma eficiente distribuição de proteínas, componentes da cadeia respiratória e DNAm (NI, WILLIAMS e DING, 2015). Dessa forma, os ciclos de fissão e fusão mitocondrial garantem a presença de mitocôndrias saudáveis no meio intracelular.

Ambos os processos de fissão e fusão mitocondrial são realizados por proteínas da família *dynamin-like* GTPases (TILOKANI *et al.*, 2018). Em mamíferos, a fissão é mediada pela GTPase citosólica Drp-1 que é recrutada para a membrana mitocondrial externa onde se oligomeriza para formar anéis de constricção ao redor da mesma dividindo a organela (LOSON *et al.*, 2013). O recrutamento mitocondrial da Drp-1 ocorre principalmente pela proteína Mff (OTERA *et al.*, 2010). Já o processo de fusão mitocondrial em mamíferos ocorre por proteínas distintas, no qual na membrana mitocondrial externa é mediado por proteínas denominadas mitofusinas, Mfn1 e Mfn2, enquanto na membrana mitocondrial interna é mediado pela GTPase *dynamin-like* codificada pelo gene OPA1 (TILOKANI *et al.*, 2018).

Estudos utilizando neurotoxinas como MPP<sup>+</sup>, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e rotenona demonstram um aumento da fragmentação mitocondrial dependente de Drp-1 com conseqüente morte neuronal (GOMEZ-LAZARO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011; WEETMAN *et al.*, 2013). Como inibidor do complexo I mitocondrial, o MPP<sup>+</sup> reduz os níveis de ATP, sendo este intensificado após a indução do aumento excessivo da fragmentação mitocondrial (WANG *et al.*, 2011). Esse desequilíbrio na dinâmica mitocondrial potencializa os efeitos tóxicos do MPP<sup>+</sup> como a geração de EROs, mitofagia e morte celular. A inibição das proteínas envolvidas no processo de fissão ou o aumento da expressão de proteínas pró-fusão têm sido sugerida a fim de se obter a proteção dos neurônios da morte induzida por essas toxinas (RAPOLD *et al.*, 2014; FILICHIA *et al.*, 2016). Por outro lado, estudos em tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com DP demonstraram uma alta taxa populacional de mitocôndrias dentro dos neurônios remanescentes, sugerindo um mecanismo compensatório de transmissão neuronal frente à neurodegeneração (REEVE *et al.*, 2018).

A disfunção mitocondrial resultante da inibição do complexo I na DP não só correlaciona-se aos agentes ambientais como também às alterações em genes codificadores de proteínas relacionadas à patologia da doença

(SCHAPIRA, 1993; RYAN *et al.*, 2015). Dessa forma, a disfunção mitocondrial tem sido sugerida como um fator crítico contribuinte para o dano de neurônios dopaminérgicos na DP.

As EROs são normalmente produzidas nas células e contribuem de forma relevante para a homeostase celular (SEO *et al.*, 2005; FUJINO *et al.*, 2007; RAY, HUANG e TSUJI, 2012). Entretanto, níveis muito elevados de EROs podem desencadear um estado de estresse oxidativo, o que pode ser controlado por proteínas antioxidantes (INDO *et al.*, 2015) evitando uma série de prejuízos para a célula. A mitocôndria é particularmente susceptível ao estresse oxidativo visto ser a maior fonte produtora de EROs (YOULE e VAN DER BLIEK, 2012; NICKEL, KOHLHAAS e MAACK, 2014). Como já discutido anteriormente, sua disfunção pode elevar os níveis de EROs e muitos fatores são alvos desencadeadores de disfunção mitocondrial dentro da patologia da DP (YONG-KEE *et al.*, 2012; BHAT *et al.*, 2015; RYAN *et al.*, 2015). A disfunção mitocondrial juntamente com o estresse oxidativo estão intimamente ligados com déficits comportamentais e a neurodegeneração dopaminérgica observados na DP esporádica (FRANCO *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2018). Porém, ainda se debate se tal fato ocorre em fases iniciais ou tardias da degeneração neuronal na DP.

Além da disfunção mitocondrial outros eventos celulares observados na DP contribuem para o estresse oxidativo celular, seja por si só ou em conjunto. No retículo endoplasmático ocorrem MPTs que geram EROs como subprodutos (MALHOTRA e KAUFMAN, 2007; RYAN, NISSIM e WINYARD, 2014). Além disso, o retículo endoplasmático é um compartimento responsável pela regulação de cálcio intracelular, que sob condições de estresse pode afetar o comportamento da mitocôndria e consequentemente induzir a produção exacerbada de EROs (JOZA *et al.*, 2001; MALHOTRA e KAUFMAN, 2007). Oligômeros de  $\alpha$ -sinucleína mostraram-se potentes indutores de estresse oxidativo quando comparados à forma monomérica da proteína. Quando associados ao ferro, os oligômeros de  $\alpha$ -sinucleína induzem a produção de EROs (CHUNG *et al.*, 2016). Visto que níveis elevados de ferro já foram identificados na substância negra de pacientes com DP (DEXTER *et al.*, 1987; MICHAELI *et al.*, 2007; PYATIGORSKAYA *et al.*, 2015), pode-se explicar em parte a vulnerabilidade seletiva dessa região à patologia. Outro fator que

contribui potencialmente para o dano dos neurônios dopaminérgicos são os subprodutos oxidativos e reativos resultantes do metabolismo da dopamina (MASATO *et al.*, 2019).

Evidências de estresse oxidativo em pacientes com DP foram relatadas por análise de tecido cerebral *post-mortem* (BOSCO *et al.*, 2006; PARKER, PARKS e SWERDLOW, 2008; GUO *et al.*, 2018). Foi identificado, por exemplo, a redução nos níveis de glutatona (GSH) (ANANDHAN *et al.*, 2017), e aumento nos níveis de produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonanal (HNE) (CHAN *et al.*, 1991). Além disso, modelos experimentais utilizando mutações gênicas e toxinas relacionadas à patologia da DP demonstram uma alta vulnerabilidade celular ao estresse oxidativo (NGUYEN *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2016). Dessa forma, pode-se sugerir que uma combinação de fatores, genéticos e ambientais, correlacionados ao estresse oxidativo desempenham um papel central em uma variedade de fenótipos ligados à DP estando fortemente correlacionado à progressão da doença e à neurodegeneração.

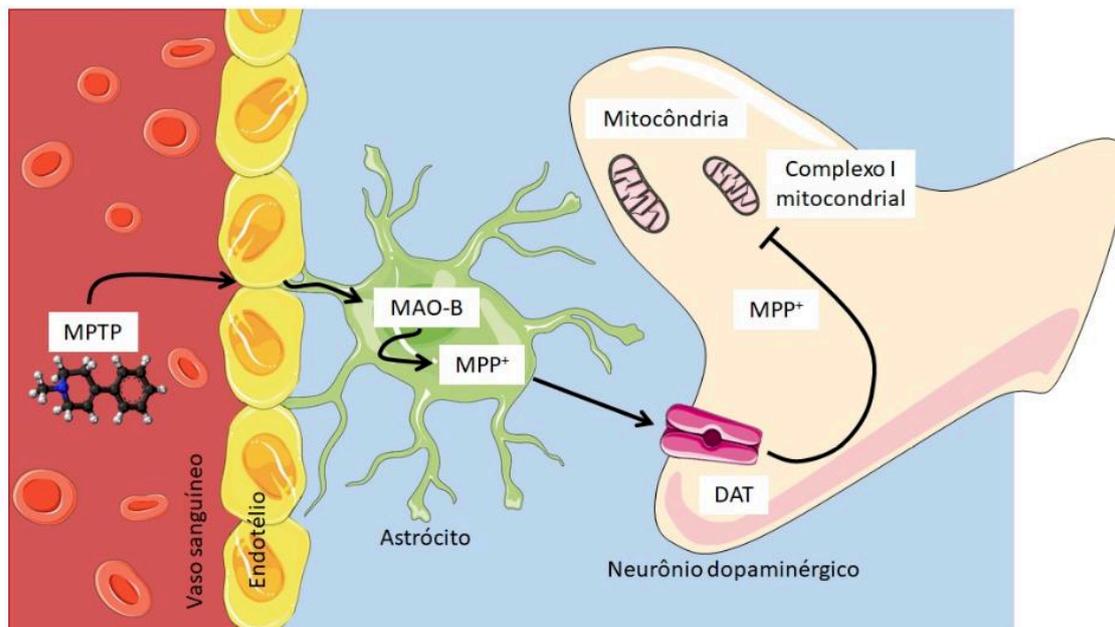
#### 1.4.3 O modelo de MPTP intranasal como modelo animal de DP de fase pré-motora

Desde 1960, utiliza-se a reposição de dopamina como tratamento principal para DP, baseada na perda neuronal dopaminérgica e no desenvolvimento dos sintomas motores (YOU *et al.*, 2018). Entretanto, é uma terapia que desenvolve inúmeros efeitos adversos, como movimentos involuntários anormais (discinesia), psicose e compulsividade por jogos (YOU *et al.*, 2018). Por outro lado, como mencionado anteriormente, a DP esporádica atinge inicialmente regiões do SNC não-dopaminérgicas com consequentes sintomas não-motores (DEL TREDICI e BRAAK, 2016). Esses podem anteceder em até 20 anos o aparecimento dos sintomas motores clássicos da DP, geralmente após uma perda de 60-70% dos neurônios da substância negra e níveis de dopamina no estriado reduzidos em 70-80% (HAWKES, DEL TREDICI e BRAAK, 2010). Nesse sentido, faz-se necessário a utilização de terapias que atuem na fase inicial da doença, uma vez que os sintomas não-motores não respondem de forma eficaz a reposições dopaminérgicas (SCHAEFFER e

BERG, 2017; LI *et al.*, 2018). Assim, um dos grandes desafios frente à DP é o desenvolvimento de agentes terapêuticos que atuem sobre os sintomas não-motores e retardem a progressão da DP.

Com base na literatura informada até o momento, podemos classificar a DP como uma patologia multifatorial, com agentes indutores que se combinam entre si para desencadear mecanismos patogênicos, e muitos desses não foram ainda elucidados como causa ou consequência. Assim, para o avanço do desenvolvimento de agentes neuroprotetores na DP faz-se necessário aprofundar cada vez mais o estudo da sua patogênese e, para isso, a disponibilidade de modelos experimentais adequados.

Em se tratando de modelo animal, Prediger e colaboradores desenvolveram em 2006 o modelo de MPTP intranasal (i.n.), de administração única da pró-neurotoxina que permite o estudo dos sintomas não-motores e motores da DP em roedores (PREDIGER *et al.*, 2006). Nesse modelo, é possível observar alterações como déficit olfatório, cognitivo e emocional prévios às alterações motoras em um curto período (PREDIGER *et al.*, 2011). Como já mencionado nesse trabalho, a degeneração induzida pelo MPP<sup>+</sup> ocorre pela elevação dos níveis de EROs e da inibição direta do complexo I mitocondrial com consequente redução nos níveis de ATP (WANG *et al.*, 2011; HERRAIZ, 2012). Ao atingir o cérebro, o MPTP é rapidamente convertido a MPP<sup>+</sup> pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) nas células gliais (HERRAIZ, 2012). O MPP<sup>+</sup> possui alta afinidade pelo DAT (GAINETDINOV *et al.*, 1997), sendo transportado para o meio intracelular onde se acumula nas vesículas sinápticas ou nas mitocôndrias (Figura 9) (SAI, UCHIDA e NAKAYAMA, 2013; LANGSTON, 2017). Dessa forma, é possível identificar vias patogênicas associadas à DP como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (FRANCO *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2018). Já os sinais motores decorrentes da administração do MPTP dependem da severidade da lesão, do roedor e da espécie utilizada (PREDIGER *et al.*, 2011). A alta afinidade pelos neurônios dopaminérgicos leva à redução de tirosina hidroxilase e consequentemente de dopamina, desencadeando as disfunções motoras (PREDIGER *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2013).



**Figura 9: Ilustração esquemática do metabolismo complexo da pró-neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e sua via de neurotoxicidade.** Após sua administração, o MPTP atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica e é metabolizado em 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio (MPP<sup>+</sup>) pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) nas células gliais (principalmente astrócitos). O composto tóxico ativo, o MPP<sup>+</sup>, é então captado pelo transportador de dopamina (DAT), pelo qual possui alta afinidade. Uma vez dentro dos neurônios dopaminérgicos, o MPP<sup>+</sup> é concentrado dentro das mitocôndrias, onde prejudica a respiração mitocondrial inibindo o complexo I do transporte de elétrons, resultando em um aumento da produção de radicais livres, o que causa estresse oxidativo e ativação das vias moleculares programadas da morte celular. Figura adaptada de PREDIGER *et al.* (2011).

Dados experimentais do nosso grupo demonstraram por meio do modelo de MPTP i.n. em ratos e camundongos prejuízo olfatório, no processo de aprendizado e de aquisição de memória, além de comportamentos tipo-depressivo (Tabela 1) (MOREIRA *et al.*, 2010; PREDIGER *et al.*, 2010; MATHEUS *et al.*, 2012; SCHAMNE *et al.*, 2018). Cabe ressaltar que os prejuízos sintomáticos obtidos com esse modelo em roedores diferem entre linhagens, espécies, idade, sexo (PREDIGER *et al.*, 2011). Alterações em neurotransmissores monoaminérgicos, como dopamina e noradrenalina, também foram relatadas em estruturas do SNC no modelo de MPTP i.n. (PREDIGER *et al.*, 2010). A análise de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH) revelou uma perda diferenciada desses neurônios entre ratos e camundongos. Demonstrou-se que neurônios dopaminérgicos mesencefálicos

de ratos são menos susceptíveis à toxicidade do MPTP no modelo i.n. quando comparados aos de camundongos (PREDIGER *et al.*, 2011). Os deficits motores surgiram após 14 dias da administração em ratos, enquanto em camundongos nenhuma alteração foi observada até 18 dias após a administração do MPTP (PREDIGER *et al.*, 2006; PREDIGER *et al.*, 2009; PREDIGER *et al.*, 2010).

Além das alterações mencionadas acima, foi possível obter alterações mitocondriais por meio do modelo intranasal de MPTP. Nosso grupo demonstrou redução da atividade do complexo I mitocondrial no bulbo olfatório e no estriado, aumento da peroxidação lipídica e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (MOREIRA *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2018).

Certamente há muito o que ser elucidado no modelo intranasal de MPTP, porém os sintomas pré-motores obtidos por meio dele correspondem aos identificados na DP esporádica, além de proporcionar alterações moleculares identificadas na patogênese da doença.

**Tabela 1:** resumo de sintomas pré-motores e motores no modelo de MPTP i.n. em roedores da doença de Parkinson

Dias após MPTP intranasal	Animal	Resultado	Hipótese de Braak
1 – 14 5	Rato Camundongo	Déficits olfatórios Déficits olfatórios	Estágio 1
6 12	Rato Camundongo	Déficits na memória social Déficits na memória social	Estágio 2
7 – 10 12 – 15	Rato Camundongo	Déficits na memória de trabalho Déficits na memória de trabalho	Estágio 2
7 – 10	Rato	Déficits na memória implícita	Estágio 2
16	Rato	Comportamento tipo-depressivo	Estágio 2
1 – 7 14 e 21	Rato Rato	Sem alterações Danos motores	Estágios 1 – 2 Estágios 3 - 4
32 18	Rato Camundongo	Danos motores Sem alterações	Estágios 3 – 4 Estágios 3 – 4

Tabela adaptada de PREDIGER *et al.* (2011).

Isso sugere que o modelo de DP utilizando o MPTP i.n. tem grande potencial para o aprofundamento do conhecimento da patofisiologia da DP na fase pré-motora, possibilitando um diagnóstico mais precoce da doença. Assim, um melhor conhecimento do modelo pode contribuir para medidas de intervenção terapêutica que possam retardar a progressão da doença. Por exemplo,

compreender como a SUMOilação está alterada por meio de análises sanguíneas, cerebrais e comportamentais comparativas do processo de SUMOilação, que tem sido considerado um fator crítico na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas.

## **2 HIPÓTESE**

Diante do exposto até o momento, vê-se a necessidade de maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fase pré-motora da DP e como a SUMOilação pode ser de grande contribuição para esse avanço no conhecimento. Por se tratar de um processo altamente dinâmico e reversível, a SUMOilação tem se mostrado vulnerável diante de diferentes condições patogênicas. Assim, hipotetizamos que os conjugados totais de SUMOilação, bem como enzimas envolvidas nessa MPT, apresentam-se alterados em diferentes estruturas do SNC sob ação do MPTP/MPP<sup>+</sup> em modelos *in vitro* e *in vivo* da DP. Por se tratar de análise temporal de diferentes estruturas, hipotetizamos que as alterações possam ser região-tempo específica.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os níveis de conjugados de SUMO e enzimas envolvidas nesse processo, bem como sobre proteínas-alvo mitocondriais em modelos *in vitro* e *in vivo* da DP.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- avaliar alterações nos conjugados de SUMO-2/3 em cultura de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y expostas ao MPP<sup>+</sup> de forma temporal;

- avaliar alterações nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 e nos níveis das enzimas SENP3 e Ubc9 em cultura primária de neurônios corticais exposta ao MPP<sup>+</sup> como também em estruturas cerebrais específicas de forma temporal em modelo animal de DP utilizando o MPTP i.n.;

- avaliar alterações nos níveis das proteínas Drp-1 e Mff, envolvidas na fissão mitocondrial, em cultura primária de neurônios corticais exposta ao MPP<sup>+</sup> como também em estruturas cerebrais específicas nas horas iniciais após a administração do MPTP i.n.;

- avaliar alterações da fragmentação/população mitocondrial em cultura primária de neurônios corticais exposta ao MPP<sup>+</sup>;

- avaliar alterações de deslocamento subcelular da Drp-1 entre citosol e mitocôndria e alterações nos conjugados de SUMO-2/3 e nos níveis de SENP3, que estão envolvidos nesse processo, em cultura primária de neurônios corticais exposta ao MPP<sup>+</sup>;

- avaliar a atividade do complexo I mitocondrial e os níveis de MDA e HNE em estruturas cerebrais específicas nas horas iniciais após a administração do MPTP i.n.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Para a realização do modelo de MPTP i.n. foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos de 3 meses de idade provenientes da colônia do Biotério Central da UFSC, mantidos no biotério setorial climatizado a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso à água e ração.

### **4.2 Administração de MPTP i.n.**

O MPTP HCl foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) e preparado na hora do uso para a administração i.n. de acordo com procedimento descrito previamente por Prediger e colaboradores (2010). Inicialmente os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 0,96% (0,75 CAM, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) usando um sistema

vaporizador (SurgiVet In., WI, USA) e 7mm de um tubo de polietileno foi inserido na narina dos animais. O fluxo de administração (25  $\mu$ L/min) foi controlado através de uma bomba de infusão conectada ao tubo de polietileno. O MPTP foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 20 mg/mL e na sequência infundido por 2 minuto. Os animais do grupo controle receberam uma única administração i.n. de salina. Todos os animais receberam uma primeira administração i.n. de MPTP ( 1mg/narina) na narina direita e logo em seguida o procedimento foi repetido na narina esquerda.

#### 4.3 Coleta das estruturas cerebrais e preparo das amostras

Determinou-se que as análises nos tecidos cerebrais seriam realizadas no bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo em diferentes tempos após a administração de MPTP (1, 7, 14 e 21 dias). A escolha das estruturas e dos diferentes tempos de análise é baseada em resultados obtidos a partir de trabalhos prévios do nosso grupo, nos quais alterações clínicas não motoras e motoras, bem como moleculares, foram associadas em regiões e tempos diferentes pós administração do MPTP (PREDIGER *et al.*, 2011). Após um intervalo de 1, 7, 14 ou 21 dias da administração de MPTP ou do veículo, os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta das seguintes estruturas: bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. O cérebro foi rapidamente coletado em uma placa de Petri colocada no gelo e as estruturas foram dissecadas e homogeneizadas com pistilo em solução de lise (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0,1% SDS, 20 mM N-etil-maleimide - NEM, inibidor das SENPs, suplementada com inibidor de proteases) rapidamente no gelo. Os lisados foram centrifugados (10.000 rpm, 10 min, 4°C), parte dos sobrenadantes recolhidos foi separada para dosagem de proteínas e o restante diluído em solução tampão para eletroforese em gel ( 100 mM Tris, 4 mM EDTA, 8% SDS, 20% glicerol, 8%  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,8) e fervido por 5 min. Todos os procedimentos estão de acordo com os padrões éticos legais da Comissão de ética no uso de animais - CEUA (CEUA: protocolo 830, ofício 104/CEUA/PRPE/2012).

#### 4.4 Cultura primária de neurônios corticais

As culturas neuronais foram preparadas e mantidas seguindo o protocolo padrão do laboratório do Prof. Dr. Jeremy Henley, na Universidade de Bristol (GUO *et al.*, 2013). Para a obtenção das células corticais, foram utilizados embriões Wistar de 18 dias (E18). Todos os estágios de dissecação foram realizados em solução salina tamponada de Hank's (HBSS) em gelo. A partir da suspensão de células corticais obtidas, plaqueou-se 500.000 células em cada poço das placas de 6 pocos previamente preparadas com 0,5 mg/mL de solução de poli-L-lisina em água destilada estéril, e incubadas a 37°C *overnight* em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Após 24 h, o meio de plaqueamento (meio Neurobasal, 10% de soro de cavalo, suplemento B27, Glutamax 2 mM, penicilina/estreptomicina) foi substituído por meio de manutenção (meio Neurobasal, suplementado com 2% B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,6% Glutamax) e as células foram novamente incubadas nas mesmas condições de temperatura e umidade. As culturas de células corticais foram expostas ao MPP<sup>+</sup> 0,05-1,0 mM (dissolvido em PBS estéril), ou apenas ao veículo por 1, 24 e 48 h. Para coletar as proteínas totais das culturas, os poços foram lavados uma vez em PBS gelado e as células foram lisadas rapidamente por raspagem com o tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0,1% SDS, 20 mM NEM e suplementado com inibidor de proteases). Em seguida, os lisados foram coletados em tubos *Eppendorf* devidamente identificados, sonicados rapidamente e incubados em gelo por 10 min para solubilização de proteínas. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 10 min para sedimentar detritos insolúveis. O sobrenadante foi recolhido, parte dele separado para dosagem de proteínas e o restante diluído em tampão para eletroforese em gel (4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6,4 e 0,004% azul de bromofenol) e fervido por 5 min.

#### 4.5 Fracionamento subcelular de cultura primária de neurônios corticais

Antes da coleta, as células foram lavadas 3x em PBS gelado e o

fracionamento subcelular se procedeu baseado em protocolo previamente publicado (HOLDEN e HORTON, 2009). As células foram coletadas por arrefecimento das placas em gelo, suspendendo as células aderentes com um raspador de células no tampão A (150 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7,4, 25 µg/ml digitonina, coquetel de inibidor de protease e de fosfatase, 20 mM NEM). Foram coletados 200 µL de lisado total em tubos *Eppendorf* e a amostra restante foi recolhida num homogeneizador de vidro. Em seguida, as células foram homogeneizadas com um pistilo e centrifugadas à 4°C 10.000 rpm durante 30 min. A fração solúvel (fração contendo o citosol) foi coletado em tubo falcon com adição de acetona gelada, armazenado em freezer durante 1 h e o *pellet* da fração particulada (fração contendo organelas) armazenado em gelo. Após esse período, a fração solúvel foi centrifugada à 4°C 5000 rpm durante 30 min e a acetona descartada. O tampão C (150 mM NaCl, 50 mM Hepes, 5mg/ml de desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 0,5% triton-x, coquetel inibidor de protease e de fosfatase, 20 mM NEM) foi adicionado a ambos os *pellet*, o da fração contendo o citosol e o da fração contendo as organelas. Em seguida, as amostras foram sonicadas a cada 10 min 3 vezes. Alíquotas de ambas as frações subcelulares foram coletadas para a dosagem de proteínas por BCA. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até o dia do *Western blotting*.

#### 4.6 Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL2266), obtidas no Rio de Janeiro Cell Bank (RJ, Brasil), foram cultivadas baseado em protocolo previamente publicado com pequenas modificações (COLLE *et al.*, 2016). Cultivas como monocamada em placas de poliestireno, as células SH-SY5Y foram mantidas em meio *Eagle's Dulbecco* modificado DMEM-F-12 suplementado com 2 mM glutamina, 100 unidades / mL de penicilina, 100 µg / mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 ° C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> realizando a troca do meio de cultura a cada 3 dias até atingirem a confluência de 80%. As suspensões celulares foram semeadas em placas de petri (100 × Placas de 20 mm) de 6 cavidades na densidade de 500.000 células por poço (células / cavidade), as quais foram

mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. As culturas de células SH-SY5Y foram expostas ao MPP<sup>+</sup> 1,5 mM dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS) estéril, ou apenas ao veículo por 24 e 48 h. Para coletar as proteínas totais das culturas, os poços foram lavados uma vez em PBS gelado e as células foram lisadas rapidamente por raspagem com o tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0,1% SDS, 20 mM de NEM suplementada com inibidor de proteases) rapidamente no gelo. Os lisados foram centrifugados (10.000 rpm, 10 min, 4° C), parte dos sobrenadantes recolhidos foi separada para dosagem de proteínas e o restante diluído em solução tampão para eletroforese em gel (100 mM Tris, 4 mM EDTA, 8% SDS, 20% glicerol, 8% β-mercaptoetanol, pH 6,8) e fervido por 5 min.

#### 4.7 Western blotting

As amostras processadas tiveram suas proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 10 e 12% e transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Realizado o bloqueio com *bovine serum albumin* (BSA) ou leite (5% em TBS-T), as membranas incubadas com anticorpos primários de interesse e as bandas de proteínas foram visualizadas com substratos de quimioluminescência (ECL) no aparelho Chemidoc ou em filmes de revelação fotográfica. As bandas de proteínas visualizadas foram analisadas por densitometria e quantificadas pelo programa ImageJ (NHI) ou Image Lab. O GAPDH, a β-actina e a β-tubulina foram utilizados como controle de carregamento de proteínas de acordo com a necessidade baseado no *immunoblotting* dos conjugados de SUMO (GUO *et al.*, 2013). Os anticorpos primários foram utilizados para detectar SUMO-2/3 (1:1000, Cell Signaling), SUMO-1 (1:1000, Cell Signaling), SENP3 (1:1000, Cell Signaling), Ubc9 (1:250, Santa Cruz), Drp-1 (1:1000, BD Biosciences), Mff (1:1000, Proteintech Sigma), actina (1:5000 Abcam), β-tubulina (1:5000 Sigma-Aldrich), GAPDH (1:10000 Abcam), VDAC (1: 5000, Cell Signaling).

#### 4.8 Dot blotting

A técnica de dot blotting utilizada foi adaptada de protocolo prévio (STOTT, 1989). Primeiramente as amostras processadas passaram por dosagem de proteínas e em seguida preparou-se uma solução com concentração proteica de 3 µg/µL em tampão azul (4% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 125 mM Tris-HCl, pH 6,4, e 0,004% azul de bromofenol). Diretamente em membrana de PVDF, foi pipetado 3 µL de cada amostra em triplicata. Aguardou-se tempo suficiente para que as amostras secassem em temperatura ambiente. Logo após, as membranas foram ativadas em metanol por 1 min e em seguida lavadas com TBS-T por 5 min três vezes. Realizado o bloqueio com BSA ou leite (5% em TBS-T), as membranas foram em seguida incubadas com os anticorpos de interesse HNE (1:1000, abcam) e MDA (1:1000, abcam). Os pontos de proteínas foram visualizadas com ECL no aparelho Chemidoc. Posteriormente, a membrana foi corada com *coomassie blue* para foto colorimétrica no aparelho Chemidoc. A análise semi-quantitativa dos níveis proteicos foi feita posteriormente por densitometria através do programa ImageJ (NHI). O resultado semi-quantificativo dos níveis proteicos de HNE e MDA foi calculado pela razão obtida com o carregamento de carga através da coloração por *coomassie blue*.

#### 4.9 Medida da atividade enzimática do complexo I mitocondrial

Os animais foram decaptados 1 e 6 h após a administração i.n de MPTP. O cérebro foi rapidamente coletado em uma placa de Petri colocada no gelo e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e o hipocampo foram dissecados, homogeneizados em solução de lise (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0,1% SDS, 20 mM NEM, suplementada com inibidor de proteases) rapidamente no gelo. Os lisados foram centrifugados (10.000 rpm, 20 min, 4°C), o sedimento foi descartado, parte dos sobrenadantes recolhidos foi separada para dosagem de proteínas e o restante foi mantido a -80°C até a determinação da atividade enzimática. A atividade do complexo I foi medida pela taxa de redução de ferricianeto dependente de NADH, e a absorbância foi monitorada a 420 nm ( $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), conforme descrito anteriormente (LATINI *et al.*, 2005) com pequenas modificações. As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol / min / mg de

proteína.

#### 4.10 Imunocitoquímica

Neurônios hipocampais foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  células/poço) em lamínulas de vidro (previamente tratadas em ácido nítrico fumegante e poli-L-lisina (0,1 mg/mL). Após 14 d.i.v., 30 min antes de completar o tempo de tratamento com MPP<sup>+</sup>, o corante marcador mitocondrial *mitotracker Red* foi adicionado às células na concentração de 100 nM diluído em meio de cultura da placa. O *mitotracker Red* é um corante que liga em grupo tióis nas mitocôndrias de células vivas (CHAZOTTE, 2011). Após 30 min, os neurônios foram lavados com PBS 1X e fixados com acetona gelada cuidadosamente pela parede. As placas foram colocadas no freezer por 5 min e posteriormente lavadas com PBS. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando meio de montagem contendo DAPI. As lâminas foram guardadas com proteção da luz para posterior análise em microscópio de fluorescência confocal no aumento de 100x (Leica – Henley's Laboratory).

#### 4.11 Análise Estatística

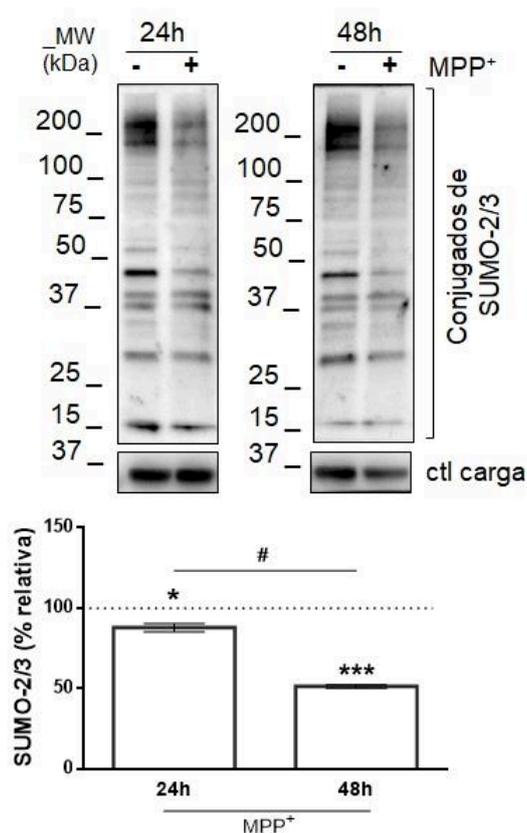
Comparações entre os grupos experimentais e o grupo controle (valor único 100%) representado pela linha pontilhada, foram realizadas pelo teste-t simples. Comparações entre os grupos experimentais de diferentes tempos ou foram realizadas pelo teste-t não pareado ou por ANOVA de uma via *Tukey* de comparação múltipla. Comparações entre os grupos experimentais de frações subcelulares, utilizou-se a ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni's de comparação múltipla. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas usando o software *GraphPad Prism 6*.  $P < 0,05$  foi considerado significativo. diferentes frações subcelulares.

## 5 RESULTADOS

## 5.1 Efeitos do MPP<sup>+</sup> sobre a SUMOilação e a fissão mitocondrial em modelos *in vitro* da DP

### 5.1.1 Efeito do MPP<sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 em cultura de SH-SY5Y

A SUMOilação tem sido sugerida como um mecanismo neuroprotetor frente a condições de estresse celular. Níveis elevados de SUMOilação foram observados durante a hibernação de esquilos (LEE *et al.*, 2007) e em modelos de isquemia prevenindo danos neuronais (CIMAROSTI *et al.*, 2008; CIMAROSTI *et al.*, 2012). Além disso, a ausência de SUMO-2/3 aumenta a vulnerabilidade neuronal à morte celular em modelo de POG (DATWYLER *et al.*, 2011). A busca pelo esclarecimento do papel da SUMOilação na patogênese da DP vem crescendo, porém o estudo dos efeitos da SUMOilação global em modelos de DP ainda é escasso na literatura visto seu potencial papel neuroprotetor. Assim, iniciamos nosso trabalho com a análise da SUMOilação global em modelo *in vitro* da DP. Primeiramente, analisamos os conjugados de SUMO-2/3 em cultura de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y expostas ao MPP<sup>+</sup>, toxina comumente utilizada em modelos da DP. Como observado na figura 10, a exposição ao MPP<sup>+</sup> a 1,5 mM por 24 e 48 h reduziu significativamente os níveis totais de conjugados de SUMO-2/3. A análise por teste-t mostrou ainda diferença significativa entre os tempos analisados.

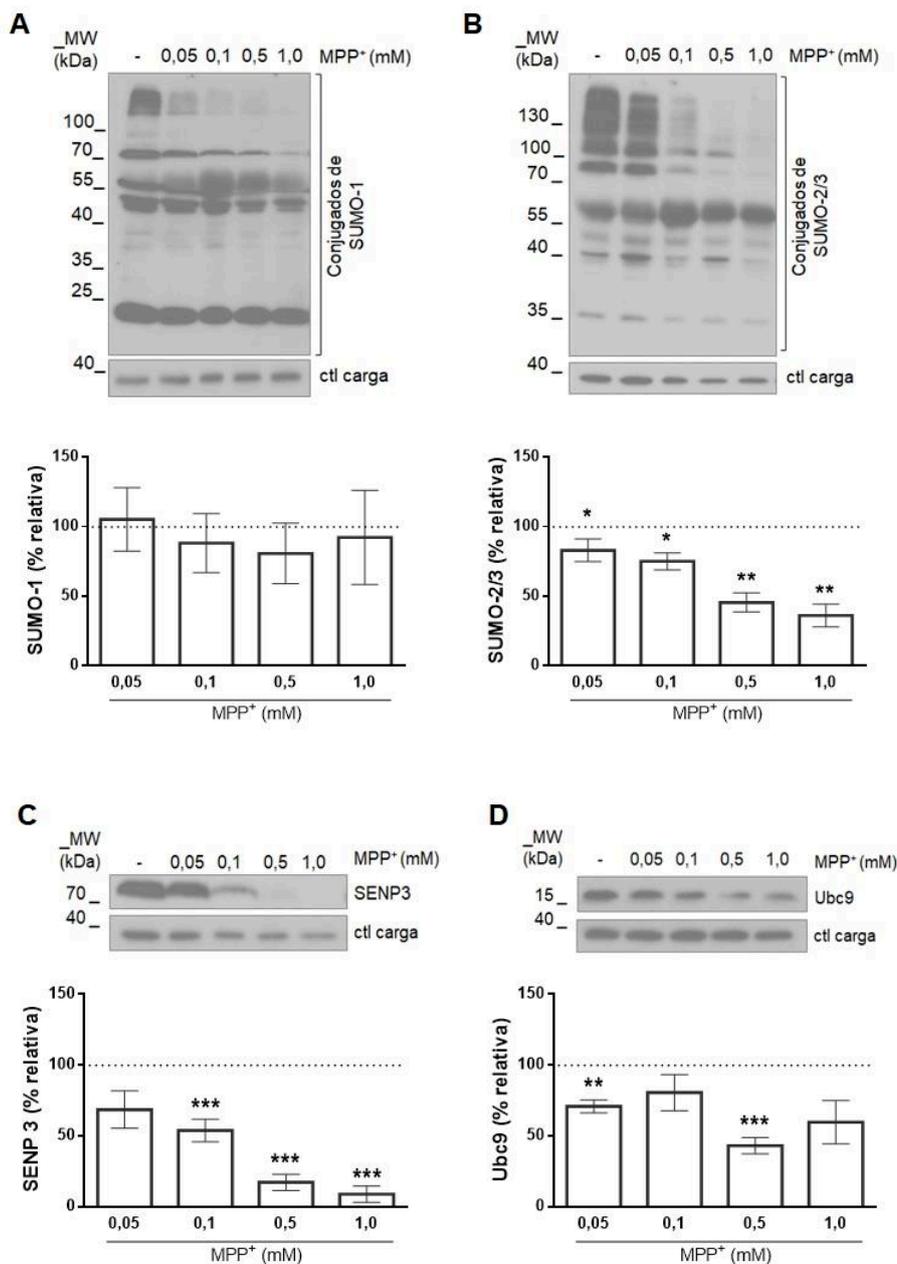


**Figura 10: O MPP<sup>+</sup> reduziu os níveis de conjugados de SUMO-2/3 em cultura de células SH-SY5Y.** Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram incubadas com MPP<sup>+</sup> 1,5 mM por 24 e 48 h. Os níveis de conjugados de SUMO-2/3 totais foram quantificados no lisado total de células. O GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo teste-t. #  $P < 0,05$  quando comparados entre si pelo teste-t não pareado.

### 5.1.2 Efeito do MPP<sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, da SENP3 e da Ubc9 em cultura primária de neurônios

A partir dos resultados obtidos em cultura de células SH-SY5Y com a toxina MPP<sup>+</sup>, buscamos analisar a SUMOilação global e algumas enzimas da sua maquinaria em cultura primária. Para isso, seguimos com experimentos em cultura primária de neurônios corticais de embriões de rato incubadas com diferentes concentrações de MPP<sup>+</sup>. Embora os níveis de conjugados de SUMO-1 não tenham sido alterados pelo MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM (Figura 11A e B), os níveis de conjugados de SUMO-2/3 mostraram-se reduzidos em todas as concentrações de toxina utilizadas (Figura 11B). O imunocontéudo da SENP3 não foi alterado de forma estatisticamente significativa 24 h após a adição de MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM ( $P = 0,09$ ), mas foi significativamente reduzido nas demais

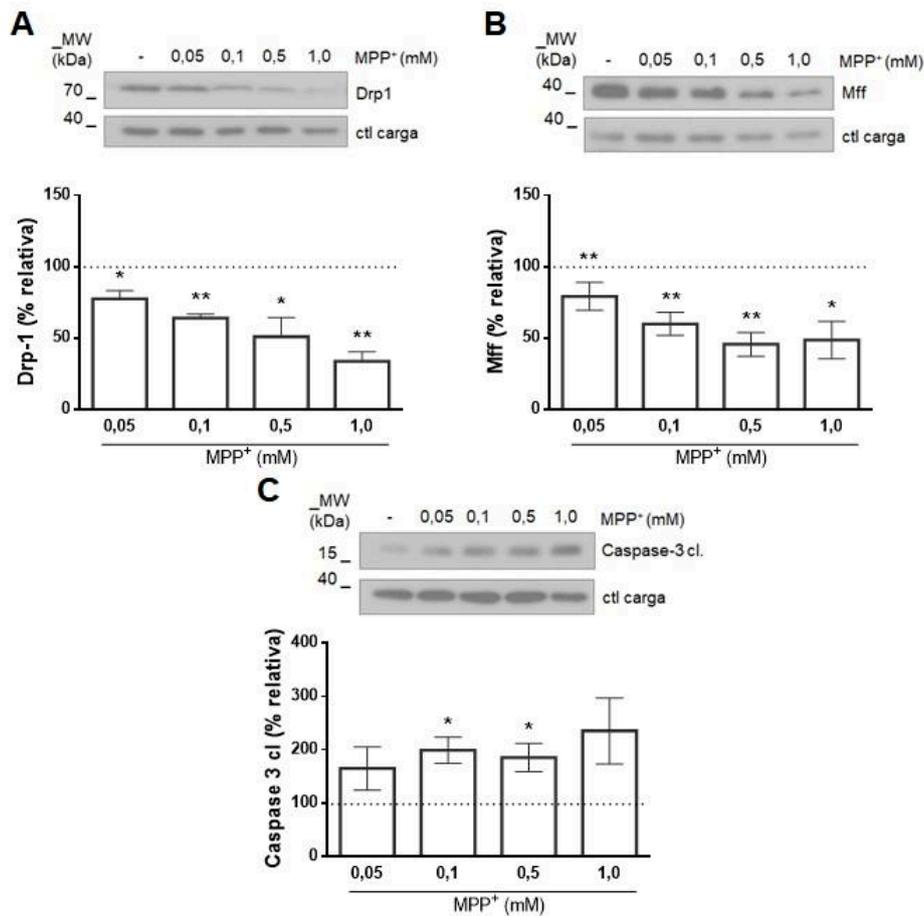
concentrações de MPP<sup>+</sup> utilizadas atingindo redução de 91% com MPP<sup>+</sup> à 1,0 mM. Pôde-se observar que o imunoconteúdo de Ubc9 foi reduzido pelo MPP<sup>+</sup> nas concentrações de 0,05 mM e 0,5 mM 24 h após a incubação com a toxina. O MPP<sup>+</sup> à 1,0 mM não alterou de forma significativa os níveis de Ubc9 ( $P = 0,07$ ) conforme observado na figura 11D.



**Figura 11: Os conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 e os níveis de SENP3 e Ubc9 foram reduzidos de forma concentração dependente pelo MPP<sup>+</sup> em cultura primária de neurônios.** Cultura primária de neurônios corticais DIV 14 foram tratadas com MPP<sup>+</sup> (0,05-1,0 mM) por 24 h e o lisado total de células analisado. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. O GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. Os dados representam a média ± EPM de 4 a 5 experimentos diferentes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparados ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t.

### 5.1.3 Efeito do MPP<sup>+</sup> nos níveis de Drp-1, Ubc9 e caspase-3 clivada em cultura primária de neurônios

Um processo de fissão mitocondrial excessivo está dentre os mecanismos moleculares envolvidos na disfunção mitocondrial que contribuem para a patogênese da DP (RAPPOLD *et al.*, 2014; RYAN *et al.*, 2015; REEVE *et al.*, 2018). Estudos demonstram que o MPP<sup>+</sup> é capaz de induzir o aumento da fragmentação mitocondrial dependente de Drp-1 com consequente morte neuronal (WANG *et al.*, 2011). Dessa forma, analisamos se o MPP<sup>+</sup> altera os níveis das proteínas Drp-1 e Mff, visto que a fissão mitocondrial ocorre pela ligação do Drp-1 ao receptor Mff na MME (35 quali). Além disso, verificamos os níveis da caspase-3 clivada como indicadora preditiva de morte neuronal (HARTMANN *et al.*, 2000) no nosso modelo *in vitro*. Como podemos observar na figura 12A e B, o MPP<sup>+</sup> reduziu o imunoconteúdo de Drp-1 e Mff em todas as concentrações de toxina utilizadas. Os níveis de caspase-3 clivada aumentaram em 99% e 85% 24 h após a exposição ao MPP<sup>+</sup> a 0,1 mM e 0,5 mM, respectivamente (Figura 12C). Tanto a concentração mais baixa de MPP<sup>+</sup> quanto a mais elevada (0,05 e 1,0 mM) não alteraram o imunoconteúdo de caspase-3 clivada.

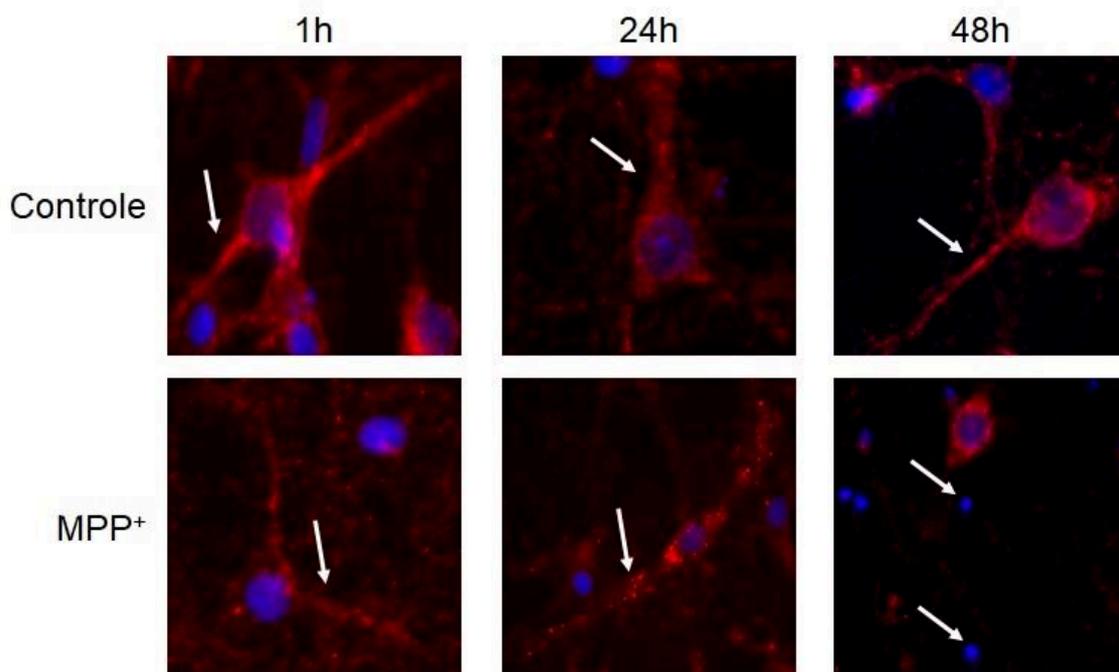


**Figura 12: O MPP<sup>+</sup> reduziu os níveis de Drp-1 e Mff em cultura primária de neurônios.** Cultura primária de neurônios corticais DIV 14 foram incubadas com MPP<sup>+</sup> (0,05-1,0 mM) por 24 h e o lisado total de células analisado. Quantificação e imunoblot representativo dos níveis de: A) Drp-1, B) Mff e C) caspase-3 clivada. O GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. Os dados representam a média ± EPM de 4 a 5 experimentos diferentes. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparados ao controle 100% (linha pontilhada) pelo teste-t.

#### 5.1.4 Efeito do MPP<sup>+</sup> no perfil da população mitocondrial em cultura primária de neurônios

A mitocôndria possui um importante papel na manutenção das sinapses (LEE *et al.*, 2018), estando comprometida nas sinapses dopaminérgicas na DP (RAPOLD *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram que a disfunção mitocondrial decorrida da doença precede a neurodegeneração (KNOTT *et al.*, 2008; YONG-KEE *et al.*, 2012). Dentre outros processos envolvidos nessa disfunção, o aumento da população mitocondrial é característico da DP (REEVE *et al.*, 2018). Apesar da análise das principais proteínas envolvidas no processo

de fissão mitocondrial, Drp-1 e Mff, não apresentarem aumento no seu imunoconteúdo, buscamos analisar qualitativamente a população mitocondrial. Além disso, optamos por utilizar MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM, visto que essa concentração não aumentou significativamente os níveis de caspase-3 clivada (Figura 12C), sugerindo baixa perda neuronal. Podemos observar na figura 13 que as imagens referentes ao controle possuem coloração vermelha (*mitotracker red*) mais contínua nos neurônios, representando maior quantidade de mitocôndrias alongadas. Por outro lado, as células expostas ao MPP<sup>+</sup> apresentam fragmentação da coloração vermelha, representando mitocôndrias menores e em maior número. Além disso, podemos observar núcleos picnóticos em azul (DAPI) 48 h após o tratamento a incubação com MPP<sup>+</sup>, sugerindo a perda neuronal por toxicidade do MPP<sup>+</sup>.

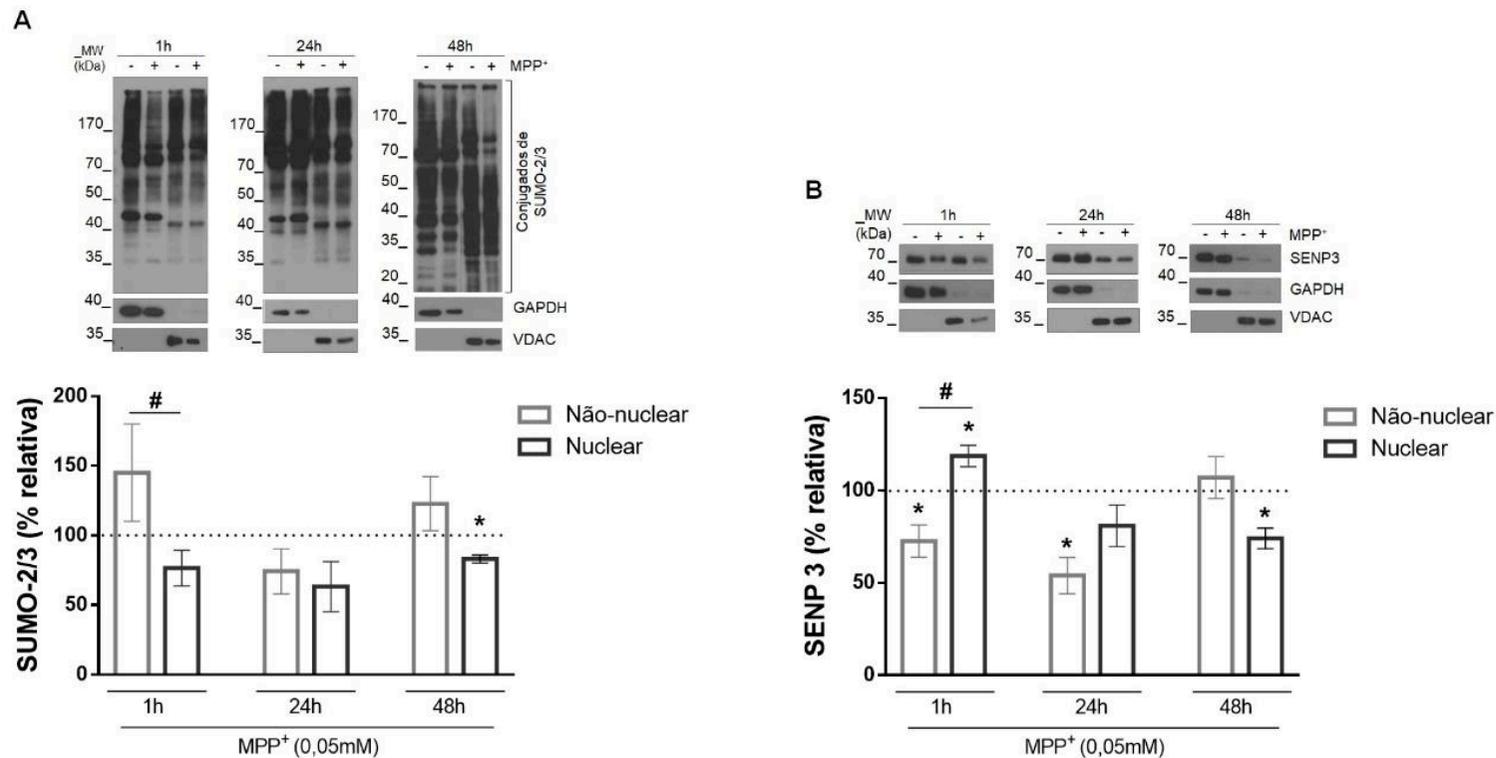


**Figura 13: O MPP<sup>+</sup> induziu a fragmentação mitocondrial em cultura primária de neurônios.** Cultura primária de neurônios hipocâmpais DIV 14 foram incubadas com MPP<sup>+</sup> 0,05 mM por 1, 24 e 48 h e as mitocôndrias (*mitotracker Red*) e núcleo marcados (DAPI). Análise qualitativa foi realizada por imagens de microscopia de fluorescência confocal no aumento de 100x.

#### 5.1.5 Efeito do MPP<sup>+</sup> nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 e da SUMO protease SENP3 em frações subcelulares de cultura neuronal

Em condições de estresse celular, a redução nos níveis de SENP3

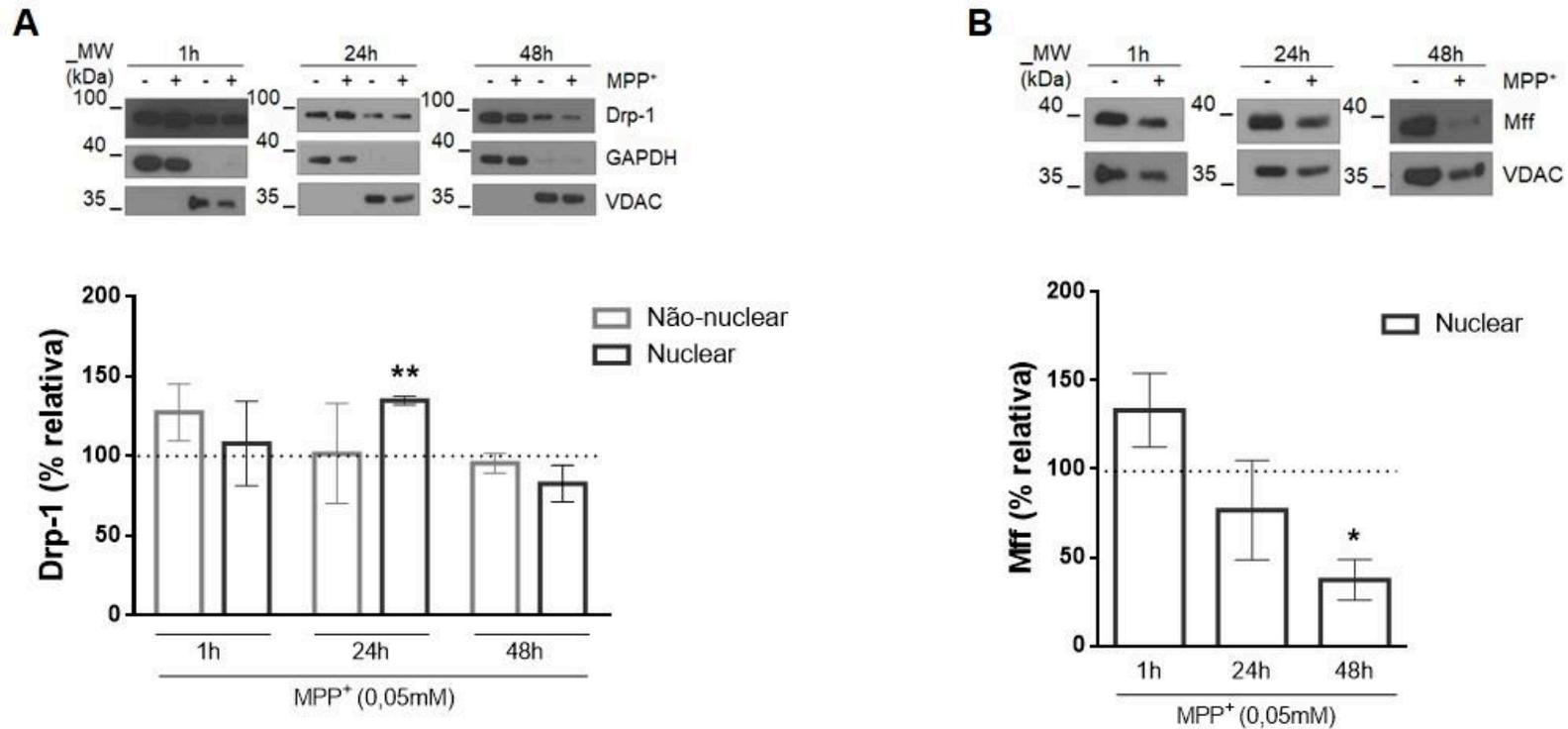
prolonga a SUMOilação da Drp-1 por SUMO-2/3, o que inibe sua translocação para a mitocôndria e o aumento da fissão mitocondrial, prevenindo liberação de citocromo *c* e a morte celular (GUO *et al.*, 2013). Por outro lado, a presença de SENP3 induz a de-SUMOilação da Drp-1, que facilita seu recrutamento pelo receptor Mff localizado na MME e consequente aumento da fissão mitocondrial (GUO *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2017). Além disso, Wang e colaboradores (2011) mostraram que ocorre um aumento rápido da fragmentação mitocondrial em modelo *in vitro* da DP, seguido de aumento e translocação de Drp-1 para a mitocôndria. Visto que o MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM induziu fragmentação mitocondrial (Figura 13) com baixo índice de perda neuronal (Figura 12C), partimos para análise das frações subcelulares de neurônios a fim de verificar os níveis de SENP3, Drp-1, Mff e dos conjugados de SUMO-2/3 no citosol e nas mitocôndrias. A partir do lisado total de neurônios expostos ao MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM realizamos o fracionamento subcelular e obtivemos a fração citosólica e a fração de organelas, contendo mitocôndrias. Os níveis dos conjugados de SUMO-2/3 não sofreram alterações estatisticamente significativas nas frações celulares 1 e 24 h após a incubação com a toxina (Figura 14A). Houve, porém, uma redução de 17% nos conjugados de SUMO-2/3 na fração nuclear após 48 h conforme demonstrado na figura 14A. A ANOVA de duas vias mostrou-nos uma redução significativa nos níveis dos conjugados de SUMO-2/3 entre as frações 1 h após o tratamento com MPP<sup>+</sup> ( $F(1,12) = 7,49$  e  $P < 0,05$ ). O imunoconteúdo de SENP3 reduziu em aproximadamente 27% na fração citosólica 1 h após a incubação com a toxina, enquanto na fração contendo as mitocôndrias o imunoconteúdo aumentou em 18% (Figura 14B), proporcionando ainda uma diferença significativa entre as frações pela ANOVA de duas vias ( $F(1,18) = 5,46$  e  $P < 0,05$ ). O imunoconteúdo de SENP3 na fração citosólica continuou reduzido 24 h após a incubação com MPP<sup>+</sup>, sem sofrer alterações significativas na fração mitocondrial. Podemos observar na figura 14B que o perfil se inverte 48 h após a incubação com MPP<sup>+</sup>, havendo uma redução do imunoconteúdo de SENP3 na fração mitocondrial sem haver alterações significativas na fração citosólica. A ANOVA de duas vias mostrou que os níveis proteicos de SENP3 não se alteraram entre as frações subcelulares 24 e 48 h após a exposição ao MPP<sup>+</sup>.



**Figura 14: O MPP<sup>+</sup> alterou diferentemente os conjugados de SUMO-2/3 e os níveis de SENP3 nas frações subcelulares de neurônios corticais.** Cultura primária de neurônios corticais DIV 14 foram incubadas com MPP<sup>+</sup> 0,05 mM por 1, 24 e 48 horas, o lisado total de células subfracionado em fração citosólica e fração mitocondrial para posterior análise. A - Quantificação dos níveis proteicos de conjugados de SUMO-2/3 e imunoblot representativo, B - quantificação dos níveis proteicos de SENP3 e imunoblot representativo. O GAPDH controle de carga de proteínas da fração citosólica e o VDAC da fração mitocondrial. Os dados representam a média ± EPM de 3-4 experimentos diferentes. \*  $P < 0,05$  quando comparados ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$  quando comparados entre frações subcelulares pela ANOVA de duas vias seguida do teste Bonferroni's de comparação múltipla.

#### 5.1.6 Efeito do MPP<sup>+</sup> nos níveis de Drp-1 e Mff em frações subcelulas de cultura neuronal

Os níveis de Drp-1 não foi alterado 1 e 48 h após o tratamento com MPP<sup>+</sup> em ambas as frações. Em 24 h, os níveis de Drp-1 elevam-se em 35% na fração mitocondrial conforme demonstrado na figura 15A. A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa nos níveis de Drp-1 entre as frações. Os níveis de Mff foram analisados apenas na fração mitocondrial por ser uma proteína constitutiva da MME. Conforme demonstrado na figura 15B, o MPP<sup>+</sup> não alterou os níveis de Mff 1 e 24 h após o tratamento, mas foram reduzidos em 62% após 48 h. A análise por ANOVA de uma via não mostrou alterações significativas entre os grupos.



**Figura 15: O MPP<sup>+</sup> alterou diferentemente os níveis de Drp-1 e Mff nas frações subcelulares de neurônios corticais.** Cultura primária de neurônios corticais DIV 14 foram tratadas com MPP<sup>+</sup> 0,05 mM por 1, 24 e 48 h, o lisado total de células subfracionado em fração citosólica e fração mitocondrial para posterior análise. Quantificação dos níveis proteicos e imunoblot representativo de: A) Drp-1 e B) Mff. O GAPDH foi utilizado como controle de carga de proteínas da fração citosólica e o VDAC da fração mitocondrial. Os dados representam a média ± EPM de 3-4 experimentos diferentes. \*  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparados ao controle 100% (linha pontilhada) pelo teste-t.

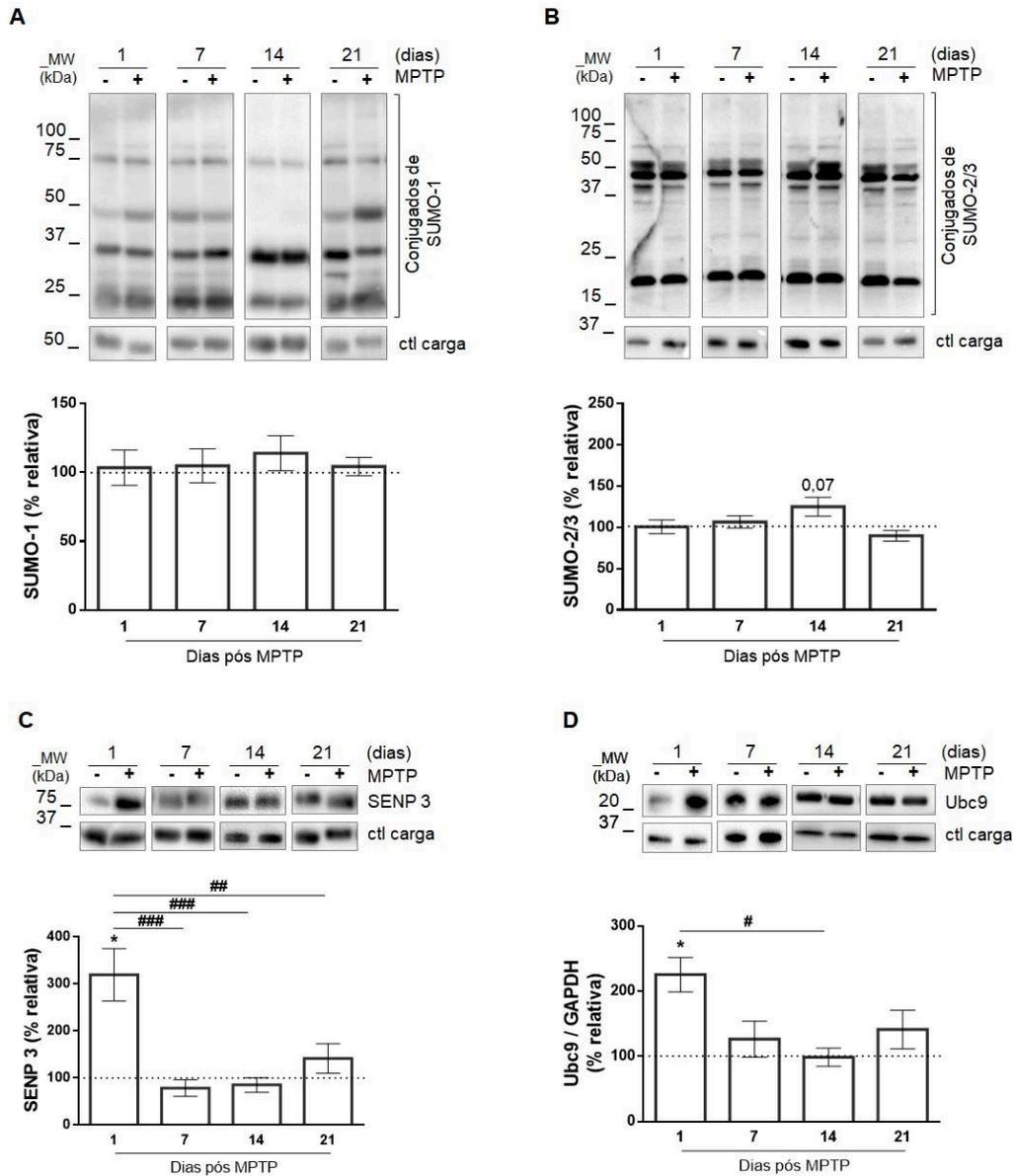
## 5.2 Efeitos do MPTP i.n. sobre a SUMOilação, a disfunção mitocondrial e o estresse celular em modelo *in vivo* da DP

### 5.2.1 Efeito do MPTP i.n. nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, níveis de SENP3 e Ubc9 diferentes dias após a administração da pró-neurotoxina

Devido à importância da disfunção mitocondrial na DP, compostos que atuam sobre as mitocôndrias, como a rotenona (WEETMAN *et al.*, 2013) e o MPTP (PREDIGER *et al.*, 2011; MATHEUS *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2013) são comumente utilizados. Weetman e colaboradores (2013) mostraram que a rotenona aumentou a conjugação de SUMO-1 em modelo *in vivo* da DP. Desenvolvido por Prediger e colaboradores (2006), o modelo de MPTP i.n. é geralmente utilizado para estudo da fase pré-motora da doença. Dados prévios do grupo demonstraram alterações comportamentais relacionadas a sintomas não motores e motores além de alterações dopaminérgicas em períodos pós administração de MPTP i.n. (PREDIGER *et al.*, 2006; MATHEUS *et al.*, 2012; SCHAMNE *et al.*, 2018). Entretanto, ainda não se têm informações sobre o perfil da SUMOilação global no modelo de MPTP i.n. Nesse sentido, buscamos avaliar os conjugados de SUMO e de enzimas envolvidas na SUMOilação no modelo de MPTP i.n.

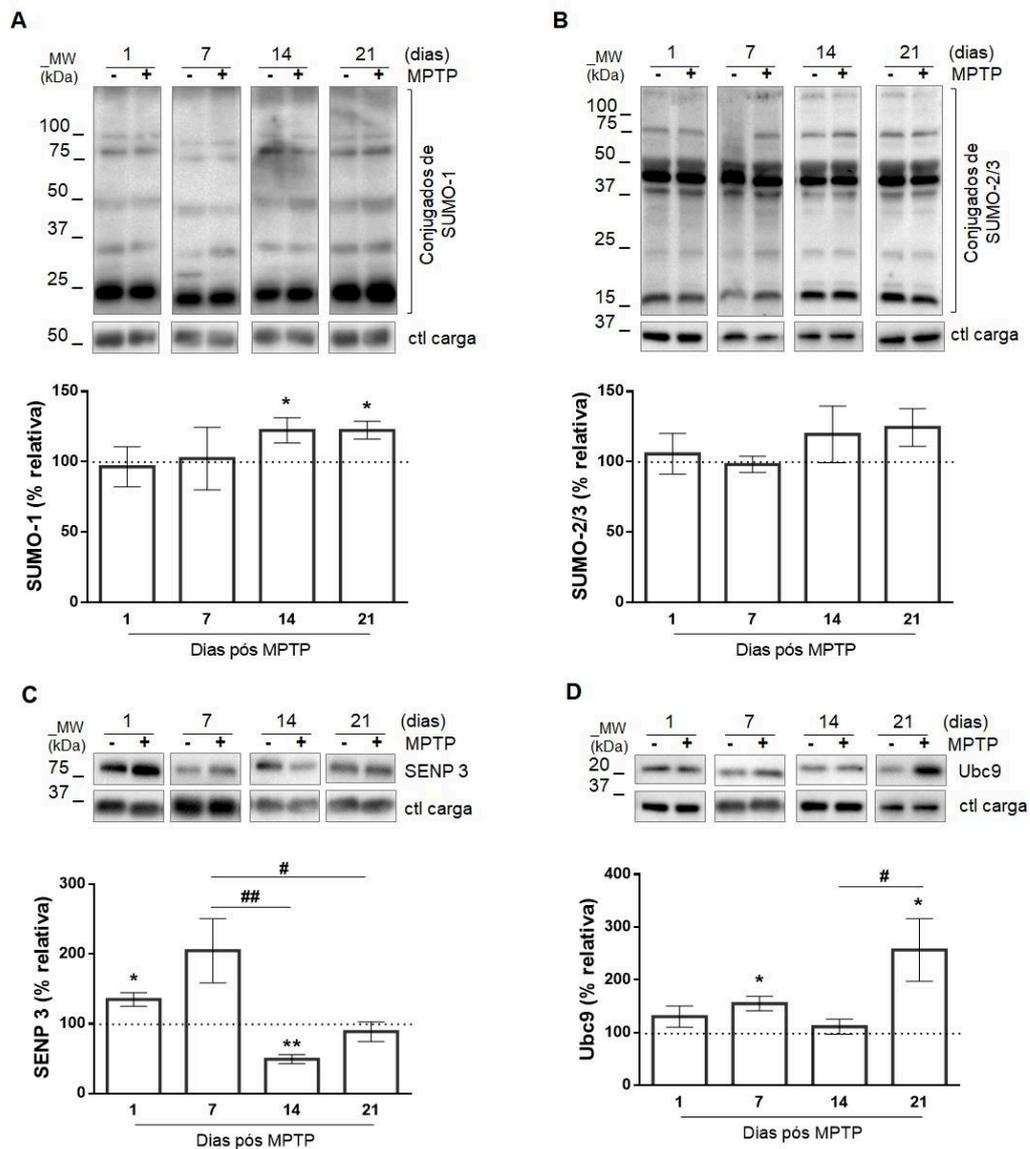
No bulbo olfatório, os conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 não foram alterados significativamente (Figura 16A e B) embora tenha havido uma redução aparente nos conjugados de SUMO-2/3 aos 14 dias (Figura 16B) após a administração de MPTP i.n. ( $P = 0,07$ ). A ANOVA de uma via não mostrou alterações significativas entre os grupos para ambos os conjugados totais de SUMO-1 e SUMO-2/3. Um dia depois da administração i.n. de MPTP ocorreu um aumento no imunoconteúdo da SENP3 de 219% (Figura 16C) e da Ubc9 de 125% (Figura 16D). Nos dias seguintes analisados, o imunoconteúdo de ambas as enzimas se mantiveram estatisticamente inalterados. A ANOVA de uma via para SENP3 nos mostra alterações significativas entre os grupos que receberam MPTP i.n., onde  $F(3, 17) = 11,56$  e  $P < 0,001$ . Podemos observar uma redução de SENP3 entre 1 e 7 dias, entre 1 e 14 dias e entre 1 e 21 dias após administração i.n. de MPTP (Figura 16C). A ANOVA de uma via para Ubc9, onde  $F(3, 22) = 4,14$  e  $P < 0,05$ , nos mostra uma redução estatisticamente significativa

entre 1 e 14 dias após administração i.n. de MPTP.



**Figura 16: O MPTP i.n. não alterou os conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP3 e Ubc9 no bulbo olfatório 1 dia pós administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório foi coletado 1, 7, 14 e 21 dias após a administração. O lisado bulbar foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  quando comparados entre si por ANOVA de uma via seguida pelo teste *Tukey* de comparação múltipla.

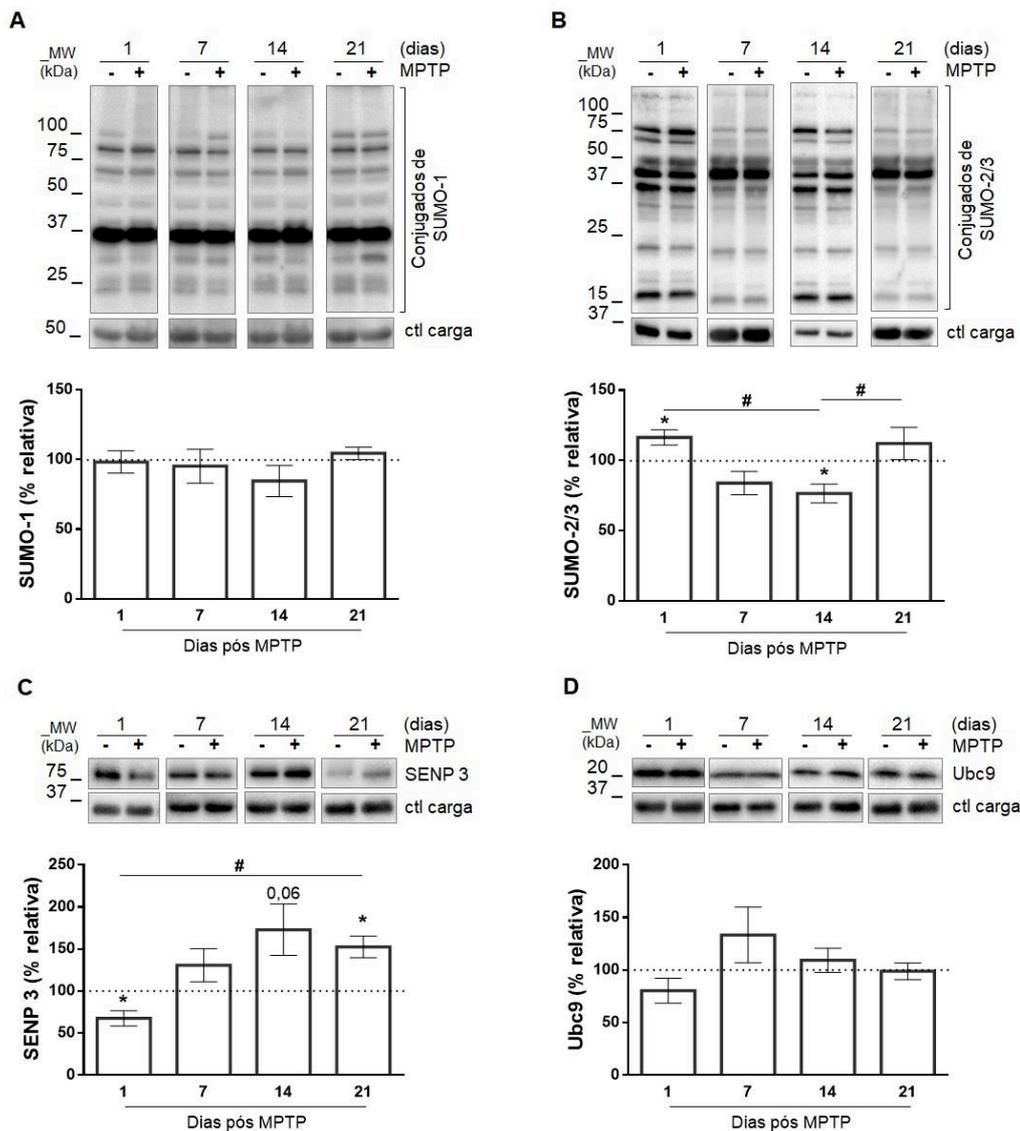
Na região do córtex pré-frontal de ratos que receberam administração i.n. de MPTP, o imunoconteúdo de conjugados de SUMO-1 mostraram-se significativamente elevados (22%) 14 e 21 dias após a administração da toxina (Figura 17A). Já os conjugados de SUMO-2/3 mostraram-se estatisticamente inalterados (Figura 17B). A análise por ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 entre os tempos após a administração i.n. de MPTP. Podemos observar alterações estatisticamente significativas nos níveis das enzimas SENP3 e Ubc9 em diferentes tempos na região cortical (Figura 17C e D). Um dia após a administração i.n. de MPTP, os níveis de SENP3 apresentaram-se elevados em 34% (Figura 17C). Um aumento aparente, porém não estatisticamente significativo ( $P = 0,08$ ), foi observado 7 dias após a administração i.n. de MPTP (Figura 17C). Quatorze dias após a administração i.n. de MPTP, os níveis de SENP3 foram reduzidos em 50% (Figura 17C). Nenhuma alteração estatisticamente significativa nos níveis de SENP3 foi observada no córtex pré-frontal 21 dias após a administração i.n. de MPTP. Os níveis de Ubc9 não sofreram alterações significativas 1 dia após a administração i.n. de MPTP, mas mostraram-se elevados em 55% após 7 dias (Figura 17D). Aos 14 dias da administração i.n. de MPTP, os níveis de Ubc9 apresentaram-se inalterados ao passo que aos 21 dias observou-se novamente um aumento de 156% (Figura 17D). A análise por ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas para SENP3 ( $F(3, 16) = 7,14$  e  $P < 0,01$ ) e Ubc9 ( $F(3, 24) = 4,0$  e  $P < 0,05$ ) entre os grupos submetidos ao MPTP i.n. Os níveis de SENP3 foram significativamente maiores após 7 dias do que aos 14 e 21 dias após a administração i.n. de MPTP (Figura 17C). Enquanto que os níveis de Ubc9 mostraram-se significativamente mais elevados 21 dias após a administração i.n. de MPTP do que aos 14 dias (Figura 17D).



**Figura 17: O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO-1 e os níveis de SENP3 e Ubc9 no córtex pré-frontal dias pós administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o córtex pré-frontal foi coletado 1, 7, 14 e 21 dias após a administração. O lisado cortical foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo teste-t. #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  quando comparados entre si por ANOVA de uma via seguida pelo teste *Tukey* de comparação múltipla.

Na região estriatal, os conjugados de SUMO-1 não foram alterados significativamente pelo MPTP i.n. (Figura 18A), porém a pró-neurotoxina alterou os conjugados de SUMO-2/3 (Figura 18B). Um dia após a

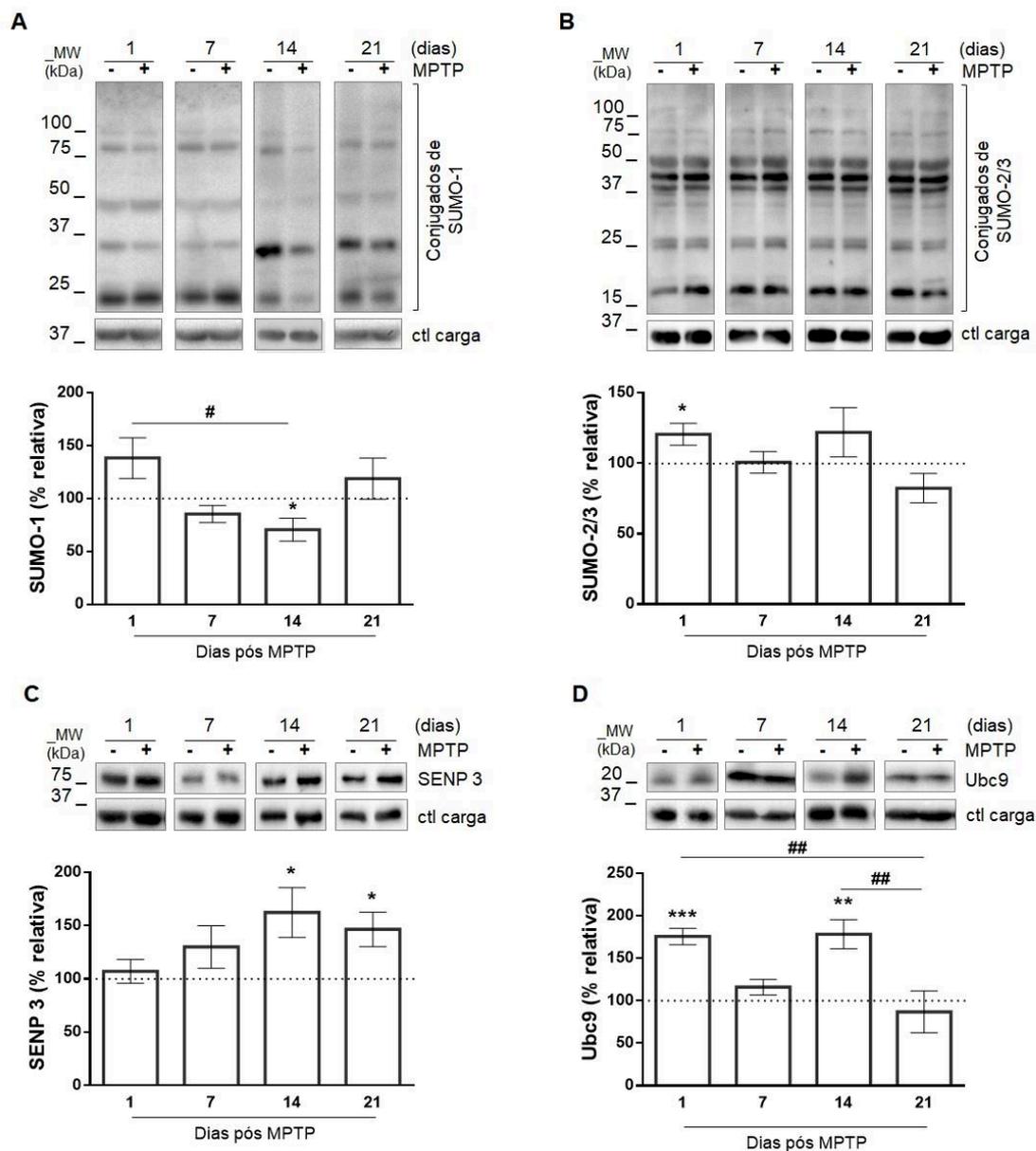
administração i.n. de MPTP os conjugados de SUMO-2/3 aumentaram em aproximadamente 16% e reduziram em 23% aos 14 dias (Figura 18B). Pela ANOVA de uma via, foram identificadas alterações significativas ( $F(3, 23) = 5,54$  e  $P < 0,01$ ) entre tempos de administração da toxina MPTP. Observou-se uma redução nos conjugados de SUMO-2/3 entre 1 e 14 dias e um aumento entre os dias 14 e 21 após a administração i.n. de MPTP. A análise dos níveis de SENP3 nos mostra alterações significativas em diferentes tempos após a administração i.n. de MPTP. Foi observado uma redução de 32% após 1 dia e um aumento de 52% após 21 dias (Figura 18C). Não houveram alterações estatisticamente significativas nos níveis de SENP3 7 e 14 dias após a administração i.n. de MPTP, apesar de observarmos um aumento aparente aos 14 dias ( $P = 0,06$ , Figura 18C). A análise por ANOVA de uma via, com  $F(3, 22) = 6,18$  e  $P < 0,01$ , mostra um aumento significativo dos níveis de SENP3 entre 1 e 21 dias após a administração i.n. de MPTP. Os níveis de Ubc9 não sofreram alterações significativas após a administração i.n. de MPTP nos tempos analisados assim como pela análise entre tempos pela ANOVA de uma via (Figura 18D).



**Figura 18: O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO-2/3 e níveis de SENP3 no estriado dias pós administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o estriado foi coletado 1, 7, 14 e 21 dias após a administração. O lisado estriatal foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B), conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$  quando comparados entre si por ANOVA de uma via seguida pelo teste *Tukey* de comparação múltipla.

Na região hipocampal de ratos que receberam administração i.n. de MPTP, observou-se uma redução de 20% nos conjugados de SUMO-1 após 14 dias (Figura 19A). Não foi observada nenhuma alteração nos demais tempos após a administração i.n. de MPTP. Na ANOVA de uma via, cujo F (3,

22) = 3,9 e  $P < 0,05$ , os conjugados de SUMO-1 foram significativamente reduzidos entre 1 e 14 dias após a administração i.n. de MPTP (Figura 19A). Os conjugados de SUMO-2/3 aumentaram 20% 1 dia após a administração i.n. de MPTP (Figura 19B). Nos demais dias analisados (7, 14 e 21), os conjugados de SUMO-2/3 permaneceram inalterados. Segundo a ANOVA de uma via não houveram diferenças significativas entre os tempos de administração i.n. de MPTP para os conjugados de SUMO-2/3 no hipocampo. Até 7 dias após a administração i.n. de MPTP, não foram observadas alterações significativas nos níveis de SENP3, havendo um aumento significativo após 14 e 21 dias de 62% e 46%, respectivamente (Figura 19C). Já os níveis de Ubc9 aumentaram em torno de 75% 1 e 14 dias após a administração i.n. de MPTP, enquanto que permaneceram próximo dos níveis basais aos 7 e 21 dias (Figura 19D). A ANOVA de uma via mostra redução significativa ( $F(3, 21) = 7,48$  e  $P < 0,01$ ) nos níveis de Ubc9 entre 1 e 21 dias e também entre 14 e 21 dias pós administração i.n. de MPTP (Figura 19D).

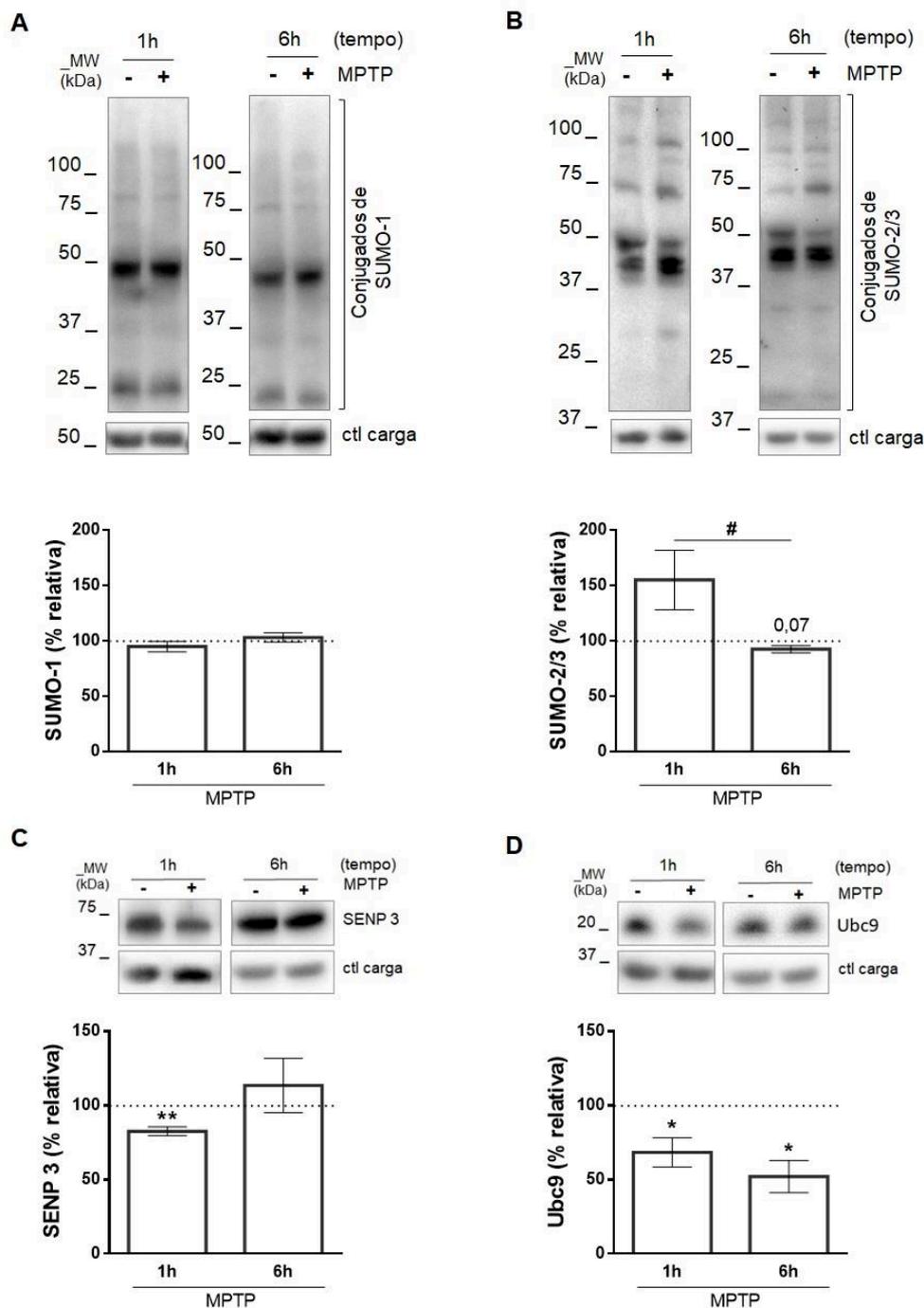


**Figura 19: O MPTP i.n. alterou conjugados de SUMO e níveis de SENP3 e Ubc9 no hipocampo dias pós administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o hipocampo foi coletado 1, 7, 14 e 21 dias após a administração. O hipocampal foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 6 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$  e ##  $P < 0,01$  quando comparados entre si por ANOVA de uma via seguida pelo teste *Tukey* de comparação múltipla.

### 5.2.2 Efeito da administração i.n. de MPTP nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, níveis de SENP3 e Ubc9 1 e 6 h após a administração da pró-neurotoxina

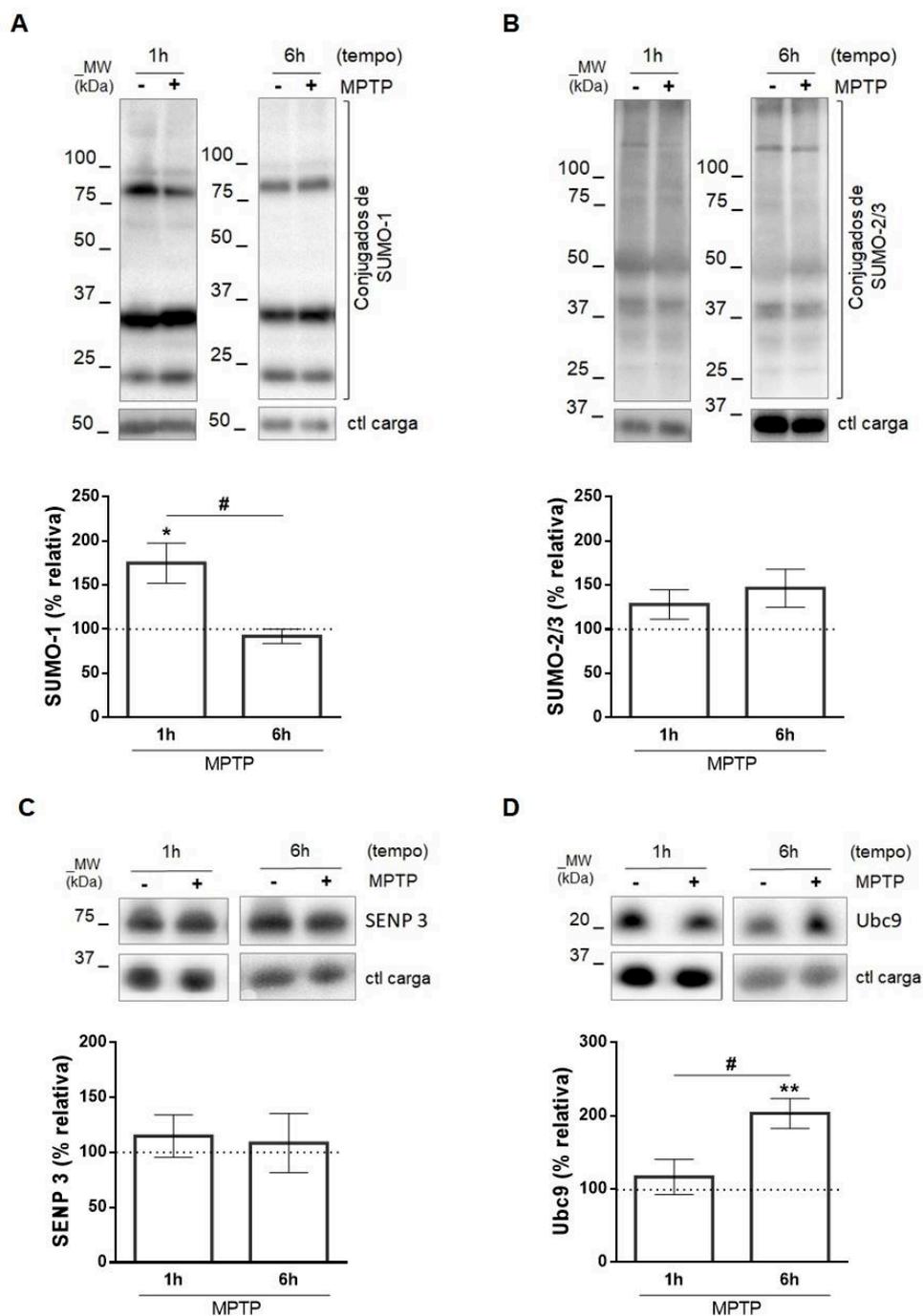
Além de alterações comportamentais, o modelo de MPTP i.n. também reproduz disfunções mitocondriais e estimula a produção de espécies reativas. Dados do grupo mostram que essas alterações ocorrem em períodos curtos de tempo após a administração i.n. de MPTP (MOREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018). Dessa forma, partimos para análise dos conjugados de SUMO e níveis de SENP3 e Ubc9 horas após a administração i.n. de MPTP.

Os conjugados de SUMO-1 (Figura 20A) e SUMO-2/3 (Figura 20B) não foram alterados significativamente na região do bulbo olfatório 1 e 6 h após a administração i.n. de MPTP. Observou-se uma redução aparente nos conjugados de SUMO-2/3 ( $P = 0,07$ ) em 6 h conforme demonstrado na figura 20B. Entretanto, o teste-t mostrou diferença significativa nos níveis dos conjugados de SUMO-2/3 entre os tempos de exposição (Figura 20B). Já os níveis de Ubc9 foram reduzidos em 1 e 6 h (Figura 20D), enquanto os níveis de SENP3 foram reduzidos em 1 h (Figura 20C).



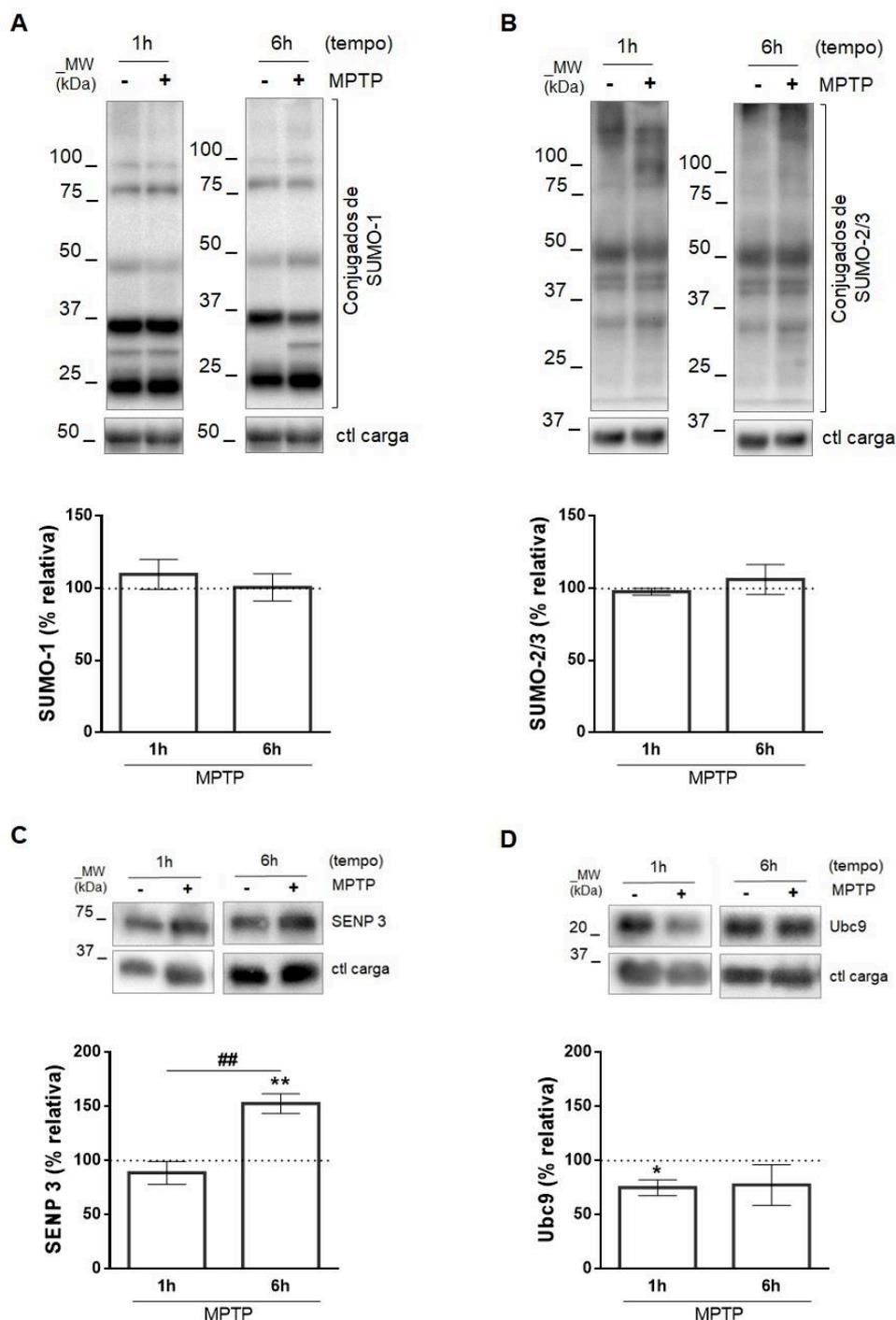
**Figura 20: O MPTP i.n. não alterou conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP3 e Ubc9 no bulbo olfatório horas após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório foi coletado 1 e 6 h após a administração. O lisado bulbar foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) e #  $P < 0,05$  quando comparados entre si pelo teste-t.

Na região do córtex pré-frontal, os conjugados de SUMO-1 foram elevados em 75% 1 h após a administração i.n. de MPTP, permanecendo inalterados em 6 h (Figura 21A). O teste-t mostrou diferença significativa nos conjugados de SUMO-1 entre os tempos analisados (Figura 21A). Os níveis de Ubc9 não foram alterados em 1 h, mas aumentaram em 85% 6 h após a administração i.n. de MPTP (Figura 21D). Houve diferença significativa nos níveis de Ubc9 entre os tempos analisados segundo teste-t. Os conjugados de SUMO-2/3 (Figura 21A) e níveis de SENP3 (Figura 21C) não foram alterados pelo MPTP i.n. 1 e 6 h após a administração.



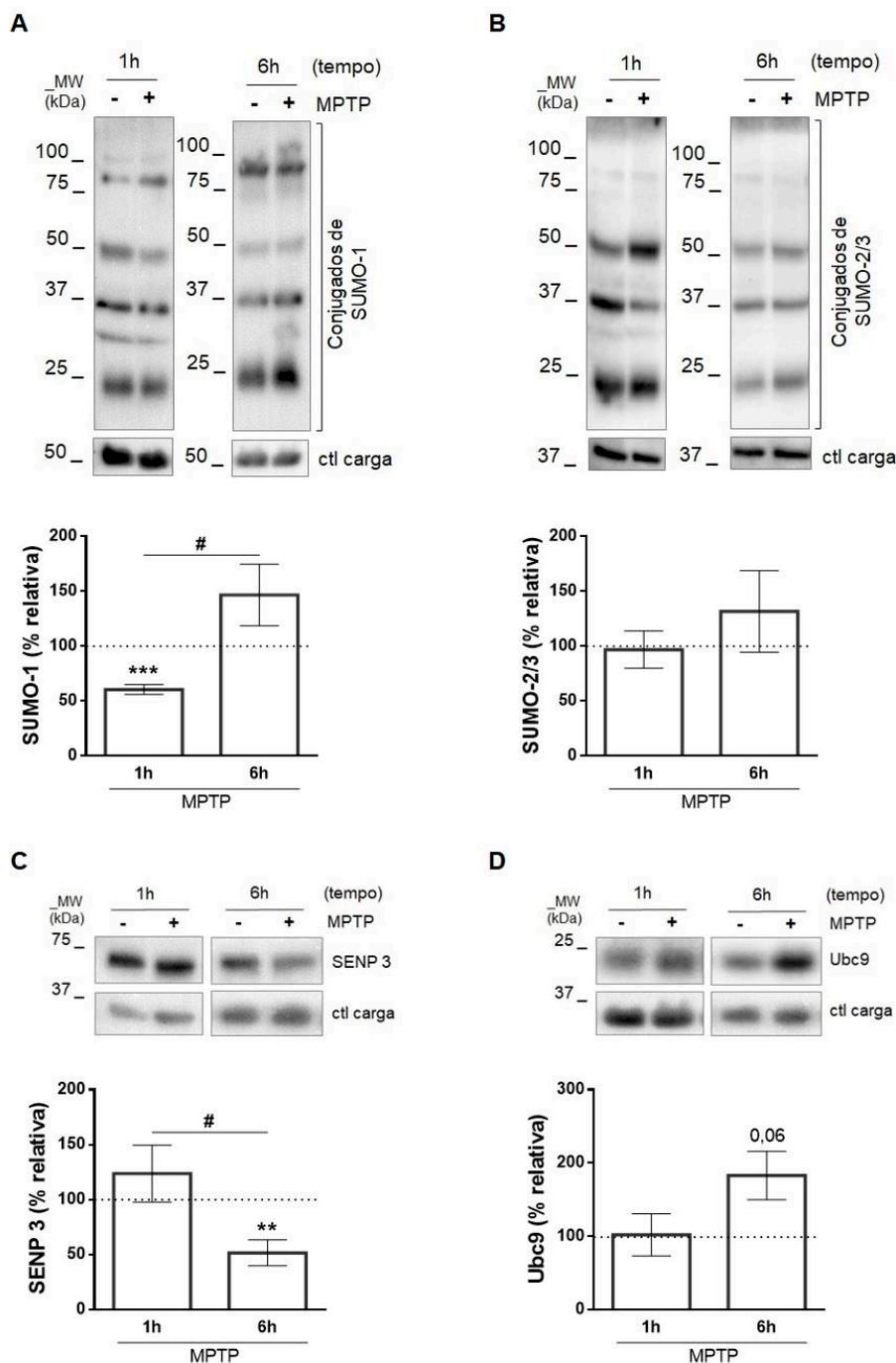
**Figura 21: O MPTP i.n. alterou os conjugados de SUMO-1 e os níveis de Ubc9 no córtex pré-frontal horas após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o córtex pré-frontal foi coletado 1 e 6 h após a administração. O lisado cortical foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) e #  $P < 0,05$  quando comparados entre si pelo teste-t.

Ao observar a figura 22, constatamos que os conjugados de SUMO-1 (Figura 22A) e SUMO-2/3 (Figura 22B) permaneceram inalterados no estriado 1 e 6 h após a administração i.n. de MPTP. Os níveis de SENP3 aumentaram 62% em 6 h (Figura 22C), sendo significativamente diferentes dos níveis de SENP3 em 1 h segundo test-t. Conforme demonstrado na figura 22D, os níveis de Ubc9 reduziram em 1 h permanecendo inalterados 6 h após a administração i.n. de MPTP.



**Figura 22: O MPTP i.n. não alterou conjugados de SUMO, mas alterou os níveis de SENP3 e Ubc9 no estriado horas após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o estriado foi coletado 1 e 6 h após a administração. O lisado estriatal foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) e ##  $P < 0,01$  quando comparados entre si pelo teste-t.

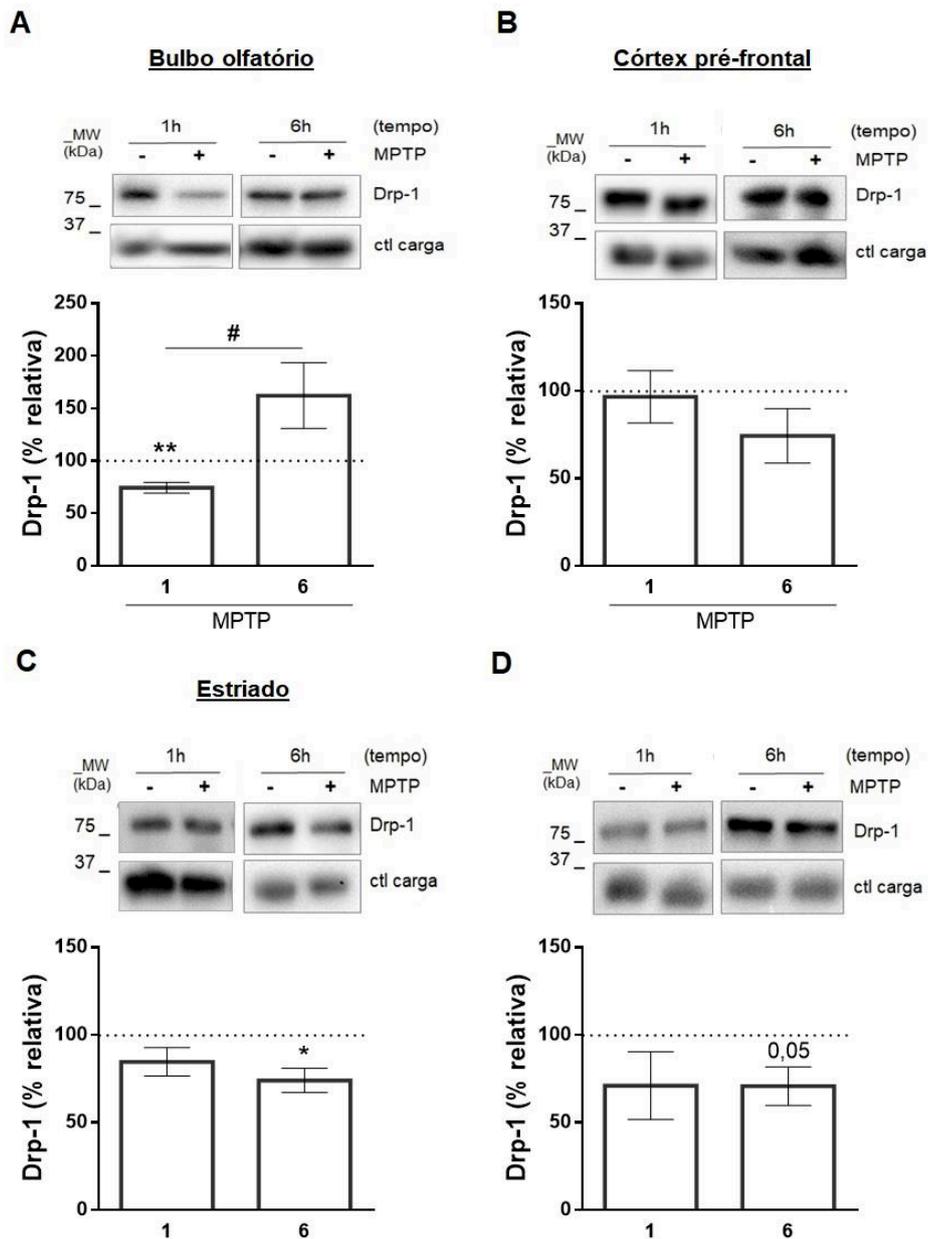
No tecido hipocampal, os conjugados de SUMO-2/3 (Figura 23B) e os níveis de Ubc9 (Figura 23D) não sofreram alterações estatisticamente significativas em 1 e 6 h após a administração i.n. de MPTP. Observamos um aumento aparente ( $P = 0,06$ ) nos níveis de Ubc9 em 6 h conforme demonstrado na figura 23. Os conjugados de SUMO-1 foram reduzidos em 1 h e mantiveram-se inalterados em 6 h (Figura 23A). O teste-t nos mostra uma diferença significativa nos conjugados de SUMO-1 entre os tempos analisados. Os níveis de SENP3 não foram alterados em 1 h, porém reduziram em 6 h após a administração i.n. de MPTP (Figura 23C). Como mostra a figura 23, há uma diferença significativa nos níveis de SENP3 entre os tempos analisados segundo o teste-t.



**Figura 23: O MPTP i.n. não alterou os conjugados de SUMO-2/3 e os níveis de Ubc9, mas alterou os conjugados de SUMO-1 e os níveis de SENP3 no hipocampo horas após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o hipocampo foi coletado 1 e 6 h após a administração. O lisado hipocampal foi processado e analisado por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo de: A) conjugados de SUMO-1, B) conjugados de SUMO-2/3, C) níveis de SENP3 e D) níveis de Ubc9. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) e #  $P < 0,05$  quando comparados entre si pelo teste-t.

### 5.2.3 Efeito da administração i.n. de MPTP nos níveis de Drp-1 e Mff horas após a administração da pró-neurotoxina

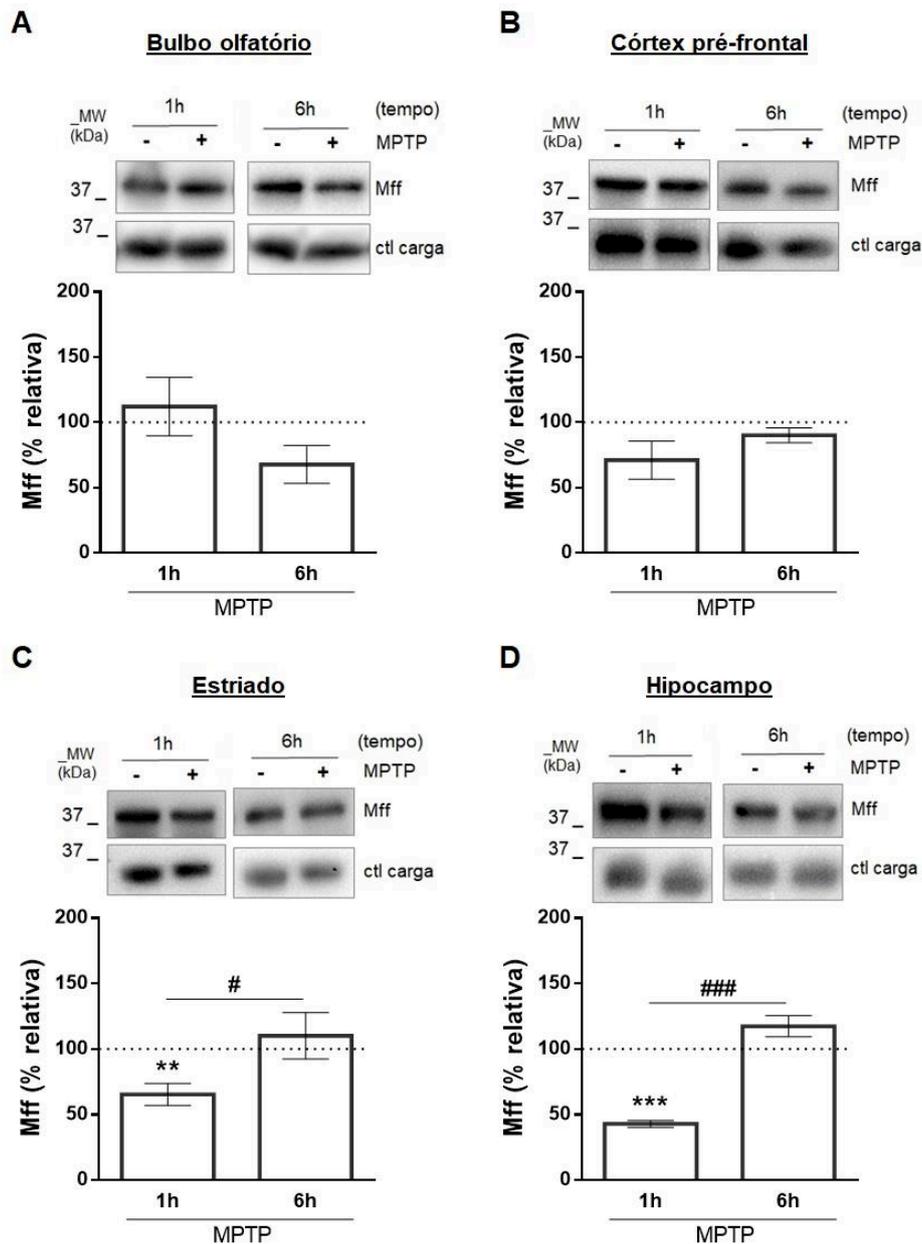
Conforme mencionado anteriormente, estudos demonstram que o aumento da fissão mitocondrial ocorre em estágios iniciais em modelos da DP (KNOTT *et al.*, 2008; YONG-KEE *et al.*, 2012). Embora dados na literatura mostrem que a administração intraperitoneal de MPTP aumente os níveis de Drp-1 (RAPOLD *et al.*, 2014), ainda se desconhece se o MPTP i.n. produziria os mesmos efeitos. Assim, buscamos analisar os níveis de Drp-1 e também do seu receptor Mff horas após a administração i.n. de MPTP. Os níveis de Drp-1 não foram alterados no córtex pré-frontal (Figura 24B) e no hipocampo (Figura 24D), apesar da redução aparente ( $P = 0,05$ ) observada no hipocampo em 6 h. No bulbo olfatório, observamos que o MPTP i.n. reduziu os níveis de Drp-1 em 1 h sem alterá-los em 6 h (Figura 24A). O teste-t nos mostra que os níveis de Drp-1 no bulbo olfatório são significativamente diferentes entre os tempos analisados (Figura 24A). O MPTP i.n. não alterou os níveis de Drp-1 no estriado em 1 h, mas os reduziu em 6 h conforme demonstrado na figura 24C.



**Figura 24: O MPTP i.n. não alterou os níveis de Drp-1 no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no bulbo olfatório e no estriado horas após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram coletados 1 e 6 h após a administração. O lisado de cada tecido foi processado e os níveis de Drp-1 foram analisados por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo dos níveis de Drp-1 no: A) bulbo olfatório, B) córtex pré-frontal, C) estriado e D) hipocampo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) e #  $P < 0,05$  quando comparados entre si pelo teste-t.

A figura 25 nos mostra que 1 h após a administração i.n. de MPTP os

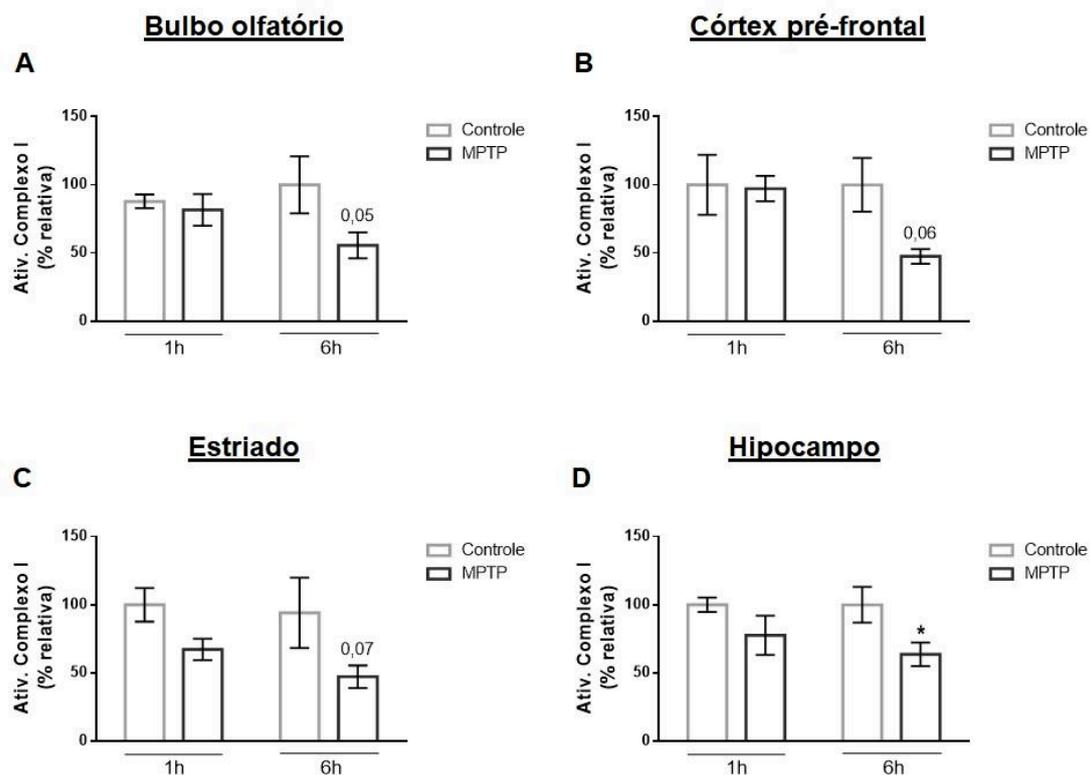
níveis de Mff foram reduzidos no estriado (Figura 25C) e no hipocampo (Figura 25D), permanecendo inalterados em 6 h. Em ambos os tecidos há diferença estatística dos níveis de Mff entre os tempos analisados de acordo com o test-t (Figuras 25C e D). No bulbo olfatório e no córtex pré-frontal os níveis de Mff não foram alterados pelo MPTP (Figuras 25A e B).



**Figura 25: O MPTP i.n. não alterou os níveis de Mff no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal, mas alterou no estriado e no hipocampo 1 h após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram coletados 1 e 6 h após a administração. O lisado de cada tecido foi processado e os níveis de Mff foram analisados por *Western blotting*. Quantificação e imunoblot representativo dos níveis de Mff no: A) bulbo olfatório, B) córtex pré-frontal, C) estriado e D) hipocampo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$  e ###  $P < 0,001$  quando comparados entre si por ANOVA de uma via seguida pelo teste *Tukey* de comparação múltipla.

#### 5.2.4 Efeito da administração i.n. de MPTP na atividade do complexo I mitocondrial horas após a administração da pró-neurotoxina

Como mencionado anteriormente, a disfunção mitocondrial está intimamente ligada à patogênese da DP. Diferentes compostos de ação inibitória do complexo I mitocondrial são utilizados em modelos da DP, como por exemplo o MPTP. Entretanto, esses compostos comprometem o estado energético da célula. No processo de SUMOilação, a ativação da SUMO é dependente de ATP. Visto que as mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento de ATP celular e o MPTP compromete seu funcionamento buscamos analisar a atividade do complexo I mitocondrial no modelo de MPTP i.n.. Na figura 26 podemos observar que o MPTP i.n. alterou significativamente a atividade do complexo I mitocondrial apenas no hipocampo em 6 h (Figura 26D) enquanto reduções aparentes foram observadas no bulbo olfatório ( $P = 0,05$ , Figura 26A), no córtex pré-frontal ( $P = 0,06$ , Figura 26B) e no estriado ( $P = 0,07$ , Figura 26C). A atividade do complexo I mitocondrial não foi alterada 1 h após a administração i.n. de MPTP em nenhum dos tecidos analisados.



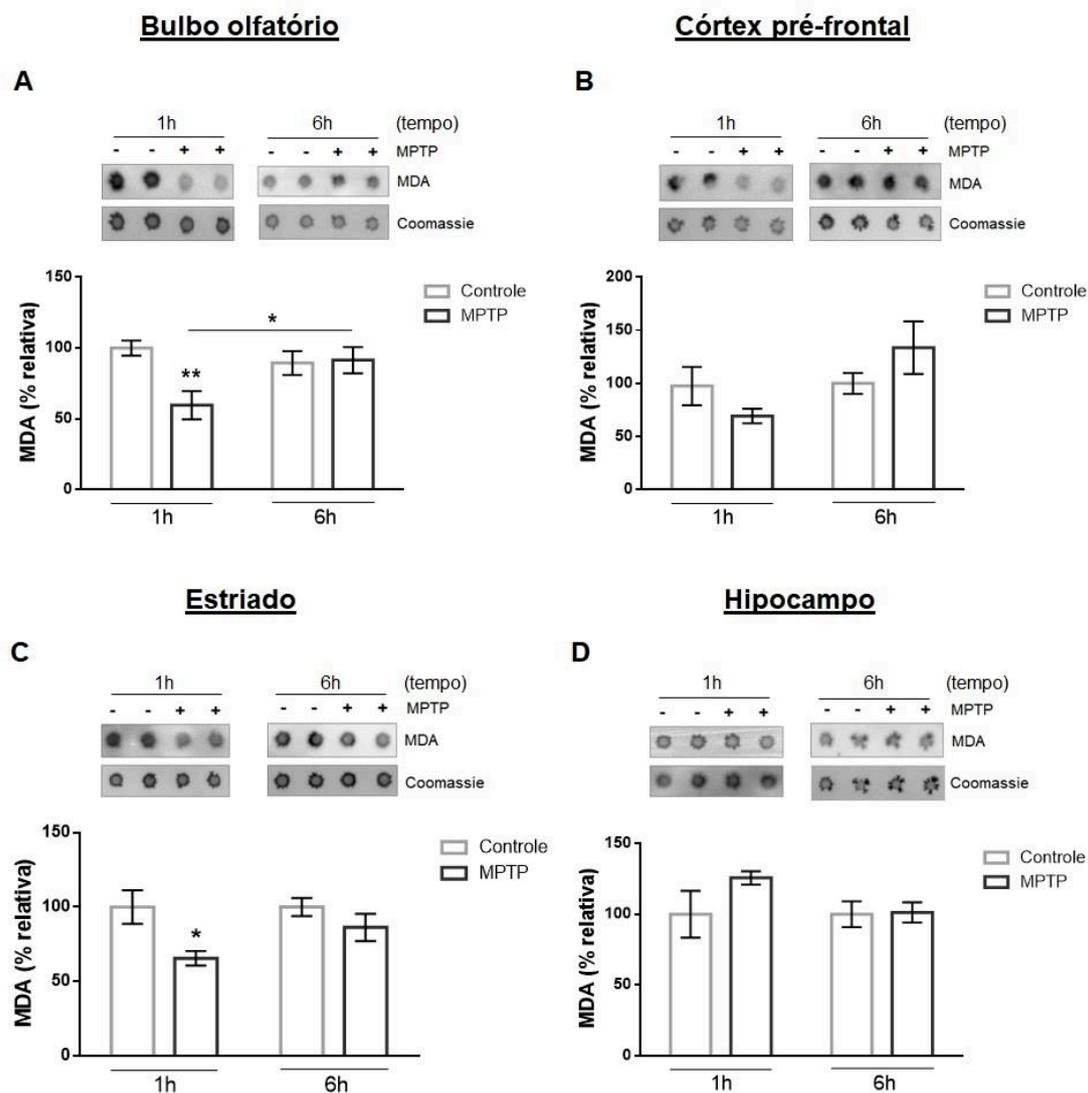
**Figura 26: O MPTP i.n. não inibiu a atividade do complexo I mitocondrial no bulbo olfatório, no córtex pré-frontal e no estriado, mas inibiu no hipocampo 6 h após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram coletados 1 e 6 h após a administração. O lisado de cada tecido foi processado e a medida da atividade do complexo I mitocondrial foi avaliada no: A) bulbo olfatório, B) córtex pré-frontal, C) estriado e D) hipocampo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t.

### 5.2.5 Efeito da administração i.n. de MPTP nos níveis de MDA e HNE horas após a administração da pró-neurotoxina

Outra característica da patogênese da DP é o estresse oxidativo (GUO *et al.*, 2018). Concentrações elevadas de ERs e produtos resultantes da peroxidação lipídica foram identificados em tecido cerebral post-mortem e em modelos experimentais da DP (CHAN *et al.*, 1991; GUO *et al.*, 2018). Em modelos de estresse celular, a SUMOilação demonstrou atividade neuroprotetora reduzindo as ERs e a peroxidação lipídica (KIM *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2017). Visto que o modelo de MPTP i.n. possui alta vulnerabilidade

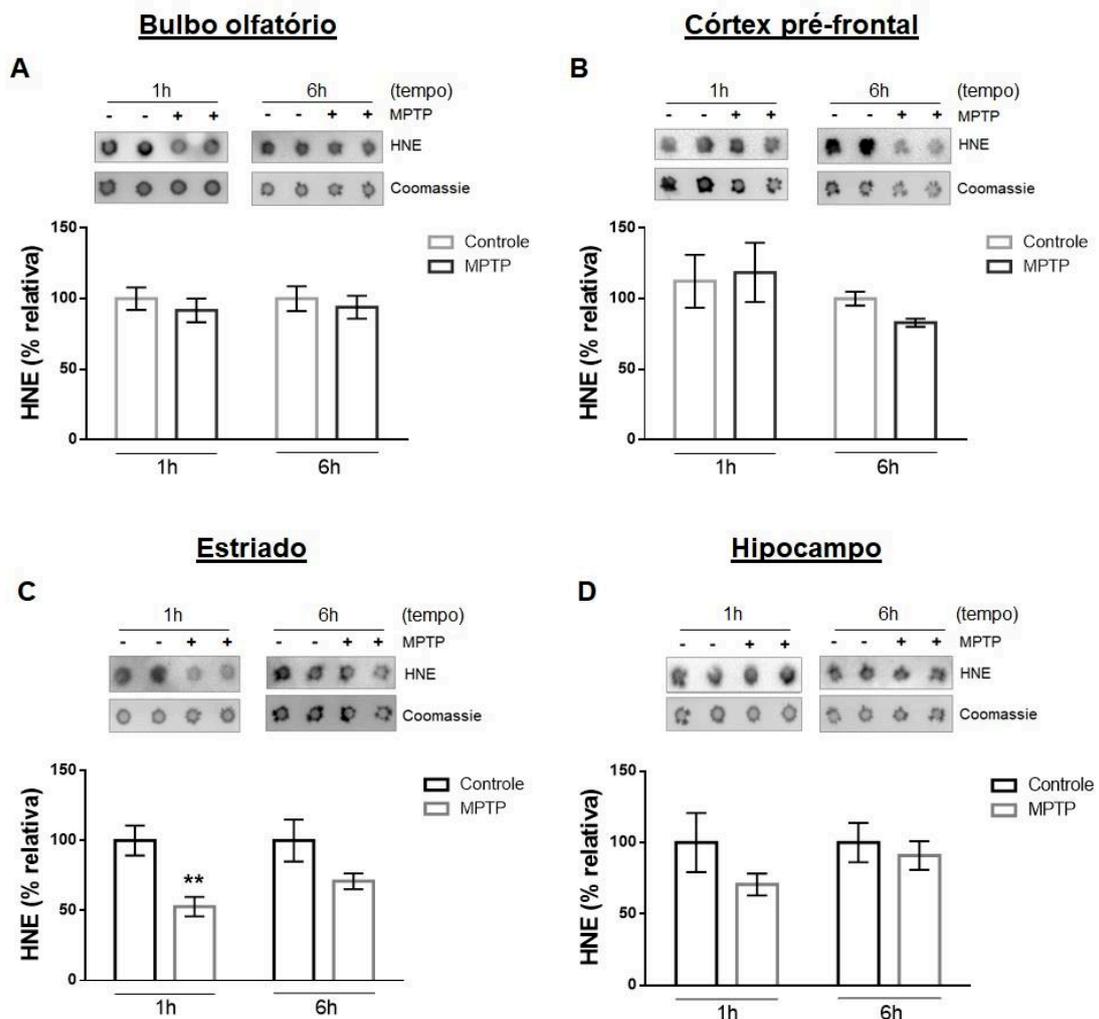
ao estresse celular (MARQUES *et al.*, 2018), analisamos os níveis de MDA e HNE, produtos da peroxidação lipídica.

O MPTP i.n. não alterou os níveis de MDA no córtex pré-frontal (Figura 27B) e no hipocampo (Figura 27D), mas reduziu os níveis de MDA após 1 h no bulbo olfatório (Figura 27A) e no estriado (Figura 27C). A ANOVA de duas vias mostra uma diferença significativa nos níveis de MDA entre 1 e 6 h no bulbo olfatório (Figura 27A).



**Figura 27: O MPTP i.n. não alterou os níveis de MDA no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no bulbo olfatório e no estriado 1 h após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram coletados 1 e 6 h após a administração. O lisado de cada tecido foi processado e os níveis de MDA foram avaliados por *dot blotting* no: A) bulbo olfatório, B) córtex pré-frontal, C) estriado e D) hipocampo. A coloração com *Coomassie blue* foi utilizada como controle de carregamento. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t. #  $P < 0,05$  quando comparados entre si por ANOVA de duas vias seguida pelo teste Bonferroni's de comparação múltipla.

Como podemos observar na figura 28, os níveis de HNE foram alterados pelo MPTP i.n. apenas no estriado 1 h após a administração da pró-neurotoxina (Figura 28C).

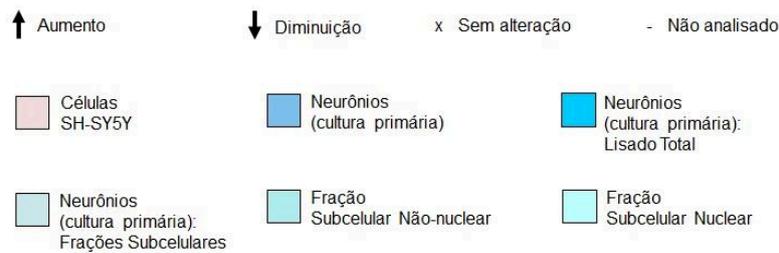


**Figura 28: O MPTP i.n. não alterou os níveis de HNE no bulbo olfatório, no córtex pré-frontal e no hipocampo, mas alterou no estriado 1 h após a administração.** Ratos Wistar machos adultos receberam MPTP (1,0 mg/narina) e o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram coletados 1 e 6 h após a administração. O lisado de cada tecido foi processado e os níveis de HNE foram avaliados por *dot blotting* no: A) bulbo olfatório, B) córtex pré-frontal, C) estriado e D) hipocampo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5 a 6 animais por grupo. \*\*  $P < 0,01$  quando comparado ao controle 100% (linha pontilhada) pelo test-t.

### 5.3 Resumos dos resultados obtidos

**Tabela 2:** Resultados deste estudo obtidos no modelo *in vitro* da DP.

MPP <sup>+</sup> ( <i>in vitro</i> )																												
Tempo	Sumo-1				Sumo-2/3				SEN3			Ubc9			Drp1			MFF			Caspase 3 cl							
	S	Neurônios:			S	Neurônios:			S	F:		S	F:		S	F:		S	F:		S	F:						
		L	Ñ	N		L	Ñ	N		L	Ñ		N	L		Ñ	N		L	Ñ		N	L	Ñ	N			
1h	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-
24h	-	x	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-
48h	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-



**Tabela 3:** Resultados deste estudo obtidos no modelo *in vivo* da DP.

MPTP INTRANASAL ( <i>in vivo</i> )																																				
Tempo	Sumo-1				Sumo-2/3				SEN3				Ubc9				Drp1				MFF				Ativação Complexo I				MDA				HNE			
	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H	B	C	E	H
1h	x	↑	x	↓	x	x	x	x	↓	x	x	x	↓	x	↓	x	↓	x	x	x	x	x	↓	↓	x	x	x	x	↓	x	↓	x	x	x	↓	x
6h	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	↑	↓	↑	↑	x	x	x	x	↓	x	x	x	x	x	x	x	x	↓	x	x	x	x	x	x	x	x
1D	x	x	x	x	x	x	↑	↑	↑	↑	↓	x	↑	x	x	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7D	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	↑	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14D	x	↑	x	↓	x	x	↓	x	x	↓	x	↑	x	x	x	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21D	x	↑	x	x	x	x	x	x	x	x	↑	↑	x	↑	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

↑ Aumento      ↓ Diminuição      x Sem alteração      - Não analisado

**B** Bulbo olfatório      **C** Córtex pré-frontal      **E** Estriado      **H** Hipocampo

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta para a literatura científica dados inovadores sobre parâmetros bioquímicos da patogênese da DP ao demonstrar o efeito do MPTP i.n. e do MPP<sup>+</sup> no processo de SUMOilação em modelos *in*

*vitro* e *in vivo*. Vemos crescer os indícios de que a DP esporádica tem origem fora do SNC reforçando a presença de sintomas não motores iniciais à doença (PREDIGER *et al.*, 2006). Assim, o interesse na identificação precoce da DP bem como em retardar o seu progresso tem crescido cada vez mais, porém muito ainda há de ser elucidado sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fase pré-motora da doença.

A MPT de proteínas pela SUMO mostrou estar correlacionada a disfunções neurodegenerativas e mecanismos de neuroproteção (CIMAROSTI *et al.*, 2012; FLOTHO e MELCHIOR, 2013; HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014; GUERRA DE SOUZA, PREDIGER e CIMAROSTI, 2016), tornando-se alvo de forte interesse na investigação neurocientífica. Algumas proteínas correlacionadas diretamente à DP já foram identificadas como alvos da SUMOilação (JUNQUEIRA *et al.*, 2019). Entretanto, pouco foi explorado sobre a SUMOilação em modelos utilizados para estudo da DP.

A pró-neurotoxina MPTP e seu metabólito MPP<sup>+</sup> são comumente utilizados para reproduzir mecanismos moleculares da DP esporádica. Particularmente, o modelo de MPTP i.n. nos permite reproduzir comportamentos que antecedem a disfunção motora (PREDIGER *et al.*, 2006; MATHEUS *et al.*, 2012; SCHAMNE *et al.*, 2018) além de parâmetros bioquímicos envolvidos nesse estágio da doença (CASTRO *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2018). Nesse sentido, este trabalho abrangeu o estudo da SUMOilação utilizando o MPP<sup>+</sup> e o MPTP i.n. como modelos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, da DP.

Assim, iniciamos nosso trabalho com a análise da SUMOilação total em modelo *in vitro* da DP primeiramente em cultura de células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y. As células SH-SY5Y não foram diferenciadas em células dopaminérgicas, porém mostraram-se positivas para TH (dados não mostrados). O modelo de toxicidade dopaminérgica do MPP<sup>+</sup> está centrado na sua captação por transportadores dopaminérgicos, acúmulo nas mitocôndrias, inibição do complexo I, com conseqüente depleção de ATP e aumento da produção de ERs provocando a morte celular. A SUMOilação atua como mecanismo neuroprotetor em condições de estresse celular fisiológico (LEE *et al.*, 2007) e em modelos de isquemia (CIMAROSTI *et al.*, 2008; CIMAROSTI *et al.*, 2012) nos quais mostrou conjugados de SUMO em níveis elevados. Poucos são os estudos encontrados na literatura sobre os aspectos da SUMOilação no

modelo celular até o presente momento. Dados não publicados demonstram que a superexpressão de Ubc9 em células dopaminérgicas tem ação citoprotetora frente à toxicidade do MPP<sup>+</sup> além de reduzir a produção de EROs. Dessa forma, era esperado uma redução nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 conforme obtivemos nas culturas de SH-SY5Y expostas ao MPP<sup>+</sup>. Assim, sugerimos que a redução da SUMOilação total por SUMO-2/3 possa estar correlacionada a mecanismos citotóxicos desencadeados pelo MPP<sup>+</sup>. Visto que o aumento da Ubc9 proporciona o processo de SUMOilação (GEISS-FRIEDLANDER e MELCHIOR, 2007), sugere-se que um aumento na conjugação por SUMO-2/3 possa prevenir danos celulares por essa toxina.

Posteriormente, analisamos em cultura primária de neurônios o efeito tóxico de uma curva de concentração de MPP<sup>+</sup> sobre os conjugados de SUMO, os níveis da protease SENP3 e da E2 Ubc9 em 24 h. Curiosamente, os conjugados de SUMO-1 não sofreram alterações pela exposição ao MPP<sup>+</sup>, enquanto os conjugados de SUMO-2/3 foram reduzidos sob todas as concentrações utilizadas, reproduzindo os dados obtidos em células SH-SY5Y. Paralelamente, a redução da Ubc9 contribuiu em parte para a redução nos níveis de SUMOilação por SUMO-2/3 sem afetar a conjugação por SUMO-1. Assim, sugerimos que o MPP<sup>+</sup> possa exercer uma toxicidade seletiva sobre a SUMOilação por SUMO-2/3 nesse modelo. No entanto, visto que a SENP3 possui preferência para de-SUMOilar conjugados de SUMO-2/3 *in vitro* (NAYAK e MULLER, 2014), a redução de SENP3 pelo MPP<sup>+</sup> não evitou que houvesse a redução desses conjugados. Uma vez que o MPP<sup>+</sup> induz aumento de ERs que podem desencadear a morte celular, o aumento nos níveis de caspase-3 clivada, considerada índice preditivo de morte celular, confirma a ação tóxica do composto.

Visto que o aumento de Ubc9 e dos conjugados de SUMO-1 contribuem para a neuroproteção da toxicidade pelo MPP<sup>+</sup> (dados não publicados) e condições de estresse celular (KIM *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2017), a redução da Ubc9 no nosso modelo pode ter prejudicado em parte a reação de autoproteção celular, pois os níveis de conjugados de SUMO-1 não foram alterados. Além disso, o conjunto de dados nesse modelo reforçam a ideia de que a neuroproteção pela SUMOilação no modelo de DP possa estar mais correlacionada à SUMO-2/3 do que à SUMO-1. Assim, sugerimos que uma

superexpressão de SUMO-2/3 e Ubc9 possam contribuir para a sobrevivência neuronal.

A disfunção mitocondrial observada na patogênese da DP compreende, dentre outros fatores, um desequilíbrio do processo de fissão e fusão mitocondrial (RAPOLD *et al.*, 2014; RYAN *et al.*, 2015; REEVE *et al.*, 2018). No nosso modelo, o MPP<sup>+</sup> provocou redução da Drp-1 e do Mff, as principais proteínas envolvidas no processo de fissão mitocondrial (OTERA *et al.*, 2010; LOSON *et al.*, 2013). Wang e colaboradores (2011) demonstraram que o MPP<sup>+</sup> induz aumento nos níveis de Drp-1 e consequente fragmentação mitocondrial em cultura de células SH-SY5Y. Por outro lado, Zhang e colaboradores (2019) não observaram alterações no nível total de Drp-1, porém o MPP<sup>+</sup> reduziu a fosforilação da proteína com consequente aumento da fissão mitocondrial. A proteína Drp-1 pode ser encontrada tanto no compartimento citosólico quanto na MME, porém o receptor Mff é constitutivo da MME. Assim, a redução nos níveis de Mff pode sugerir que o MPP<sup>+</sup> induziu uma queda na taxa de mitocôndrias no nosso modelo. Além disso, podemos correlacionar a perda neuronal observada pelo aumento dos níveis de caspase-3 clivada à redução dos níveis de Drp-1 e Mff.

Como mencionado anteriormente, o MPP<sup>+</sup> é capaz de induzir o processo de fissão mitocondrial e morte celular (WANG *et al.*, 2011; QI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019). No entanto, observou-se que o aumento da fragmentação mitocondrial provocado pela toxina precede a morte celular (WANG *et al.*, 2011). No nosso trabalho, o MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM não elevou os níveis de caspase-3 clivada, sugerindo que a toxina não induziu perda neuronal nessa concentração. Além disso, Marti e colaboradores (2015) demonstrou que o MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM foi capaz de induzir em um curto período de tempo (30 min – 5 h) a redução do potencial de membrana das vesículas sinápticas dopaminérgicas e também do neurotransmissor dopamina em cultura primária de células diferenciadas. Esses dados confirmam a toxicidade do MPP<sup>+</sup> a 0,05 mM sem causar aumento no índice de morte celular. Na nossa análise qualitativa, observamos já na primeira hora um aumento aparente da fragmentação mitocondrial nos neurônios expostos ao MPP<sup>+</sup> indo de encontro aos dados da literatura.

No processo de fissão mitocondrial, a proteína citosólica Drp-1 migra para a MME e se liga ao receptor Mff para que ocorra a fragmentação da organela

(OTERA *et al.*, 2010; LOSON *et al.*, 2013). Guo e colaboradores (2013) demonstraram que a Drp-1 tende a permanecer no citosol quando conjugada à SUMO-2/3, enquanto níveis elevados de SENP3 induzem a de-SUMOilação da Drp-1 que facilita sua migração para a MME. Assim, a Drp-1 de-SUMOilada aumenta a taxa de fissão mitocondrial, liberação de citocromo *c* e consequente morte celular. Nesse trabalho, a diferença observada nos níveis de conjugados de SUMO-2/3 entre as frações induzida pelo MPP<sup>+</sup> após 1 h, condiz com as alterações nos níveis de SENP3 em cada fração. Ou seja, considerando uma prevalência da ação de-SUMOilante da protease, onde há menor quantidade de SENP3 há mais SUMOilação, enquanto onde há maior quantidade de SENP3 há menos SUMOilação. Assim, sugerimos que possa haver uma maior quantidade de substratos conjugados com SUMO-2/3 na fração não-nuclear, incluindo a Drp-1. Nesse sentido, observaríamos maior quantidade de Drp-1 no citosol, porém não houve alterações nos níveis de Drp-1 em ambas as frações subcelulares. Assim, sugerimos que o MPP<sup>+</sup> não induziu a de-SUMOilação da Drp-1 e consequente translocação para a MME na primeira hora. No entanto, experimentos específicos seriam necessários para confirmar essa suposição.

Além disso, dados não publicados do grupo de Jeremy Henley demonstram que a SUMOilação do Mff é requerida para que ocorra sua ligação à Drp-1 em condições de estresse celular. Os altos níveis de SENP3 na fração nuclear podem contribuir para baixa taxa de SUMOilação de Mff e consequente processo de fissão a níveis basais. As MPTs podem sofrer regulação cruzada em algumas proteínas, potencializando ou anulando uma a outra. Por exemplo, a fosforilação do Mff interfere na sua SUMOilação em modelos de estresse celular (dados não publicados). Alguns estudos demonstram que a fosforilação da Drp-1 interfere no seu recrutamento para a MME (CHANG e BLACKSTONE, 2007; HAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2019). Assim, seria de interesse identificar possíveis reações cruzadas entre a fosforilação e a SUMOilação da Drp-1 no modelo de MPP<sup>+</sup>.

Já após 24 h, o MPP<sup>+</sup> reduziu a SENP3 na fração não-nuclear, mas não afetou significativamente os conjugados de SUMO-2/3. Entretanto, o MPP<sup>+</sup> induziu um aumento de Drp-1 na fração nuclear, que nos sugere que sua conjugação com SUMO-2/3 esteja reduzida no citosol e, possivelmente, uma maior quantidade de Drp-1 esteja disponível para ligar-se ao Mff e induzir o

processo de fissão mitocondrial. Por outro lado, com os níveis de SENP3 e SUMO-2/3 inalterados na fração nuclear, não podemos sugerir que as circunstâncias estejam favoráveis à interação do Mff com a Drp-1. Em 48 h, o MPP<sup>+</sup> reduziu os níveis de SENP3 na fração nuclear o que não condiz com a redução nos conjugados de SUMO-2/3. Embora as condições sejam favoráveis à SUMOilação do Mff, seus níveis também foram reduzidos pelo MPP<sup>+</sup>. Assim, podemos sugerir que o MPP<sup>+</sup> em 48 h induz mais provavelmente uma perda mitocondrial do que a fissão da organela. Além disso, observamos a presença de núcleos picnóticos na análise qualitativa de mitocôndrias em 48 h, que pode sugerir uma perda mitocondrial decorrente de morte celular.

Visto que a conjugação de Drp-1 e Mff com SUMO possui efeito contrário no processo de fissão mitocondrial, seria de grande relevância analisar a SUMOilação para cada proteína específica. Desse modo, nossas suposições poderiam ser esclarecidas com experimentos de co-localização por imagem ou *blotting* de imunoprecipitados de SUMO-2/3, Drp-1 e Mff, para sabermos o real estado de SUMOilação dessas proteínas frente à toxicidade do MPP<sup>+</sup>. Além disso, a análise de taxa mitocondrial, bem como da sua morfologia contribuiriam para maiores esclarecimentos sobre o efeito da toxicidade do MPP<sup>+</sup> na SUMOilação correlacionada ao processo de fissão mitocondrial no nosso modelo.

Pessoas com DP relatam apresentar disfunção olfatória, a qual não foi possível se correlacionar ao uso de anti-parkinsonianos. Ainda, dados prévios do nosso grupo no modelo de MPTP i.n. mostram uma disfunção olfatória de forma tempo dependente acompanhada de uma depleção nos níveis de TH e dopamina no bulbo olfatório. Os conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3 no bulbo olfatório não foram alterados pelo MPTP i.n. A SUMOilação é uma MPT muito dinâmica, cujo tempo de ocorrência não é determinado e a estabilidade do complexo SUMO-substrato pode variar de proteína-alvo para proteína-alvo. Por outro lado, observamos um aumento nos níveis das enzimas SUMO protease SENP3 e da SUMO conjugadora Ubc9 1 dia após a administração de MPTP i.n. Isso nos sugere que os conjugados totais de SUMO não se alteraram devido ao equilíbrio nos níveis dessas enzimas. Além disso, os níveis elevados de ambas as enzimas pode decorrer de uma dinâmica elevada de SUMOilação e de-SUMOilação, pois um conjunto relativamente pequeno de enzimas conjugadoras

e de-conjugadoras controla com precisão o status de milhares de proteínas-alvo.

A não observação de alterações nos conjugados totais de SUMO não descarta a alteração na SUMOilação de proteínas específicas. Podemos observar nos *blottings* representativos da figura 16 alterações de bandas específicas em diferentes pesos moleculares, sugerindo alterações na SUMOilação de substrato-específico que na quantificação de conjugados totais são mascarados.

Além disso, seria possível considerar que alterações de função ou localização de proteínas específicas no bulbo olfatório, durante essa possível dinâmica elevada de SUMOilação observada 1 dia após a administração i.n. de MPTP, estejam envolvidas com o déficit olfatório. Dados do grupo demonstram que a memória de reconhecimento social é afetada (PREDIGER *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2013) logo 1 dia após a administração i.n. de MPTP. Trata-se de um modo particular de memória olfatória de curto prazo mediada por pistas olfatórias (SAWYER, HENGELHOLD e PEREZ, 1984). Prediger e colaboradores (2006; 2009) demonstraram redução nos níveis de TH e dopamina no bulbo olfatório 1 dia após a administração i.n. de MPTP.

Além disso, dados prévios do grupo (PREDIGER *et al.*, 2009) mostram que o MPTP i.n. induziu uma ativação pronunciada de JNK (do inglês *c-Jun N-terminal kinase*), no bulbo olfatório, uma via de sinalização correlacionada à morte celular induzida pela pró-neurotoxina. Feligioni e colaboradores (2011) demonstraram que a superexpressão de Ubc9 e SUMO-1 induziu a ativação de JNK mediante estado de estresse oxidativo celular. Nesse contexto, podemos sugerir que seria interessante investigar se os elevados níveis de Ubc9 encontrados 1 dia após a administração i.n. de MPTP no bulbo olfatório estariam correlacionados a um aumento da ativação da via da JNK e consequente perda de neurônios dopaminérgicos nesse tecido. Por outro lado, Cartier e colaboradores (2019) demonstraram que a superexpressão de Ubc9 em células dopaminérgicas aumenta a estabilidade dos transportadores de dopamina (DATs) nas membranas sinápticas. Marti e colaboradores (2017) relatam que o MPP<sup>+</sup> induziu a externalização de DAT em neurônios dopaminérgicos, apesar de provocar a redução de dopamina no modelo de MPTP i.n. (PREDIGER *et al.*, 2011). Nesse sentido, seria interessante especular se o aumento nos níveis de Ubc9 encontrados no bulbo olfatório estariam correlacionados a um possível

mecanismo compensatório para estimular ou aumentar a estabilidade desses transportadores dos neurônios remanescentes. Nesse contexto, os níveis elevados da protease SENP3 um dia após a administração i.n de MPTP podem contribuir para ambas situações em um papel dual, reduzindo a SUMOilação de JNK e consequente morte neuronal, ou prejudicando a SUMOilação de DAT e consequente recaptção de dopamina nos neurônios sobreviventes. Novamente reforçamos a importância da identificação de alterações na SUMOilação de proteínas específicas.

Por outro lado, se olharmos para os demais períodos analisados, verificamos que não houveram alterações nos níveis dessas enzimas no bulbo olfatório. Fato curioso esse que sugere uma melhor investigação da dinâmica de SUMOilação em tempos mais curtos que precedam 1 dia a administração i.n. de MPTP na região do bulbo olfatório. As análises realizadas em 1 e 6 h no modelo de MPTP i.n. também não mostraram alterações dos conjugados de SUMO. A redução de ambas as enzimas SENP3 e Ubc9 em 1 h pode ter contribuído para um equilíbrio no processo de SUMOilação e de-SUMOilação. Porém, em 6 h a redução de Ubc9 tende a reduzir os conjugados de SUMO-2/3.

Na região do córtex pré-frontal, os níveis de conjugados de SUMO nos primeiros dias após administração i.n. de MPTP não foram reduzidos apesar do aumento dos níveis de SENP3. Entretanto, observa-se um aumento condizente nos conjugados de SUMO-1 ao passo que os níveis de SENP3 se reduzem 14 dias após a administração da toxina. Os níveis de Ubc9 são fortemente elevados em 21 dias contribuindo para o aumento de conjugação por SUMO-1 no córtex pré-frontal. Embora as alterações ocorridas nos níveis de SENP3 e Ubc9 em 14 e 21 dias, respectivamente, fossem favoráveis à SUMOilação, os conjugados de SUMO-2/3 não foram alterados de forma significativa. Dados prévios do grupo demonstram que os roedores apresentam déficit cognitivo 7 dias após a administração i.n. de MPTP. Observou-se uma queda no desempenho da memória de trabalho acompanhada por redução nos níveis de dopamina na região cortical (PREDIGER *et al.*, 2006). Já existem evidências da participação do córtex pré-frontal na memória de trabalho (FAW, 2003; PASSINGHAM e SAKAI, 2004). O processamento dessa informação envolve projeções dopaminérgicas provenientes da substância negra (ALEXANDER, DELONG e STRICK, 1986; FAW, 2003).

Neste trabalho observamos um aumento de SENP3, embora não significativo, que pode estar correlacionado à de-SUMOilação de DAT, como já discutido anteriormente. Por outro lado, o aumento de Ubc9 possa vir como resposta celular compensatória na tentativa de manter a estabilidade desse transportador na membrana sináptica para recaptação de dopamina. Além disso, se observarmos o *blotting* representativo na figura 17A, vemos alterações específicas de bandas nos conjugados de SUMO-1, que podem corresponder à SUMOilação de proteínas específicas correlacionadas a vias envolvidas na memória de trabalho. Para tais esclarecimentos, estudos mais específicos são necessários.

A depressão é uma co-morbidade na DP e sinais tipo-depressivo podem ser observados em modelos animais da doença (CASTRO *et al.*, 2013; SCHAMNE *et al.*, 2018; XIA *et al.*, 2018). Embora os mecanismos moleculares envolvidos na depressão estejam correlacionados a distúrbios em vias como a serotoninérgica, eles não estão totalmente esclarecidos (OSSOWSKA e LORENC-KOCI, 2013). Dados prévios do grupo mostram sinais tipo-depressivo no modelo de MPTP i.n. por volta do 14º dia após a administração da pró-neurotoxina (MOREIRA *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2013; SCHAMNE *et al.*, 2018). Estudos clínicos e estudos em modelos *in vivo* tem correlacionado o mau funcionamento dos receptores de serotonina 1A à depressão e à ansiedade (CELADA, BORTOLOZZI e ARTIGAS, 2013). Sabe-se que o receptor de serotonina 1A é alvo de SUMOilação e, apesar de não totalmente esclarecido, alguns autores sugerem que a conjugação do receptor com SUMO-1 provoca sua internalização (LI e MUMA, 2013). O córtex pré-frontal é uma região de alta inervação serotoninérgica sendo o principal modulador de suas funções (PUIG e GULLEDGE, 2011). O período em que observamos aumento nos níveis de conjugados de SUMO-1 no córtex pré-frontal correlaciona-se ao período de comportamentos tipo-depressivo no modelo de MPTP i.n. Dentre os inúmeros substratos possíveis de SUMO-1, seria de interesse investigar alterações nos níveis dos receptores serotoninérgicos 1A, bem como seu estado de SUMOilação por SUMO-1 no nosso modelo experimental de MPTP i.n., uma vez que não foi encontrado na busca literária. Essas análises poderiam contribuir para maiores esclarecimentos dos mecanismos moleculares envolvidos na depressão presente na DP.

Os níveis reduzidos de SENP3 contribuem para o aumento dos conjugados de SUMO-2/3 no estriado 1 dia após a administração i.n. de MPTP, ao passo que os conjugados de SUMO-2/3 se reduzem ao haver um aumento aparentemente nos níveis de SENP3 em 14 dias. Pouco se sabe a respeito das alterações moleculares presentes no estriado nas fases iniciais do modelo de MPTP i.n., sendo que a maioria dos estudos focam em déficits tardios, a partir do 14º dia. Castro e colaboradores (2013) observaram perda de equilíbrio dos animais 14 dias após a administração i.n. de MPTP, mas o déficit motor surgiu apenas em 21 dias, acompanhado de redução de TH na substância negra. Dados prévios do grupo demonstram redução dos níveis de dopamina a partir do 14º dia no estriado induzida pelo MPTP i.n. em roedores. Como mencionado anteriormente, o MPP<sup>+</sup> induz a externalização de DAT em neurônios dopaminérgicos (MARTI *et al.*, 2017), o que pode contribuir inicialmente para a manutenção de níveis de dopamina nos terminais e fenda sináptica. Essa evolução da disfunção dopaminérgica no estriado pode estar correlacionada à redução nos conjugados de SUMO-2/3 no estriado e ao aumento de SENP3 em 14 e 21 dias, respectivamente.

Além disso, Prediger e colaboradores (2006) observaram que o MPTP i.n. induziu déficit cognitivo relacionado ao aprendizado de tarefas rotineiras, o qual está correlacionado ao estriado. Esse déficit foi observado previamente aos déficits motores, no mesmo período em que observamos a redução nos conjugados de SUMO-2/3. Cabe investigar de forma mais aprofundada se a SUMOilação por SUMO-2/3 está direta ou indiretamente correlacionada a esse tipo de prejuízo cognitivo induzido pelo MPTP. Podemos observar no *blotting* representativo na figura 18B pequenas reduções específicas de bandas acima do peso molecular de 50 kDa em 14 dias que podem corresponder a conjugados de SUMO-2/3 com DAT ou TH, substratos alvo da SUMOilação.

Os conjugados totais de SUMO analisados horas após a administração i.n. de MPTP mantiveram-se inalterados no estriado, embora tenha havido um aumento expressivo de SENP3 em 6 h e uma redução de Ubc9 em 1 h. Reforçamos mais uma vez a relevância da análise de conjugação SUMO-proteína-específica, visto que há alterações nos conjugados de SUMO em pesos moleculares específicos (Figura 22A e B).

No primeiro dia após a administração i.n. de MPTP observamos no

hipocampo um aumento nos conjugados de SUMO-2/3, o que condiz com o aumento nos níveis da enzima conjugadora Ubc9. Curiosamente, observamos que a Ubc9 altera-se de forma intermitente, não necessariamente de acordo com os níveis de SUMOilação. Uma vez que os níveis de Ubc9 não foram alterados horas após a administração i.n. de MPTP, seria interessante observar se esse padrão se mantém ou não em períodos posteriores a 21 dias nesse modelo. Há ainda uma característica redução nos níveis de conjugados de SUMO-1 ao longo de 14 dias. Embora os níveis de Ubc9 tenham sido elevados no 14º dia, a ação da SENP3 como de-conjugadora possa ter prevalecido sobre os conjugados de SUMO-1 que encontraram-se reduzidos. Embora os conjugados de SUMO-2/3 não tenham sido reduzidos frente ao aumento nos níveis de SENP3 em 14 dias, talvez pelos níveis elevados de Ubc9, eles tendem a reduzir em 21 dias quando a Ubc9 volta aos níveis basais. Os níveis de SENP3 que foram reduzidos em 6 h aparentemente mostraram um aumento de forma temporal ao longo dos dias da exposição ao MPTP i.n.

Dados prévios do grupo demonstraram que a administração i.n. de MPTP induziu redução na recaptção de glutamato no hipocampo (MATHEUS *et al.*, 2012). Dessa forma, evidenciamos que o MPTP contribui com a excitotoxicidade glutamatérgica, característica já comprovada na patogênese da DP em diferentes modelos (MORAES *et al.*, 2019). A recaptção de glutamato na fenda sináptica é regulada principalmente pelos transportadores EAAT2 gliais (PREGNOLATO *et al.*, 2019). A redução da expressão desse transportador já foi demonstrada em modelos animais da DP (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, a localização subcelular do EAAT2 é alterada quando conjugado com SUMO-1 (FORAN *et al.*, 2014). Visto que o MPTP i.n. alterou os conjugados por SUMO-1 e os níveis das enzimas Ubc9 e SENP3, seria de interesse verificar se o MPTP i.n. altera os conjugados de EAAT2-SUMO-1 no hipocampo em diferentes tempos pós administração. Uma provável correlação desses conjugados à excitotoxicidade glutamatérgica pode possibilitar novas estratégias terapêuticas por meio da modulação da SUMOilação do EAAT2.

A inibição do complexo I mitocondrial é considerada o primeiro alvo do metabólito tóxico do MPTP, o MPP<sup>+</sup> (JAVITCH *et al.*, 1985). Embora tenhamos encontrado redução significativa da atividade do complexo I mitocondrial apenas no hipocampo, a atividade dessa enzima foi aparentemente prejudicada em

todos os demais tecidos. Nossos dados quase reproduzem dados prévios do grupo, que relatam que a inibição do complexo I mitocondrial no modelo de MPTP i.n. ocorre de forma aguda no bulbo olfatório e no estriado (MOREIRA *et al.*, 2010). Embora tenha ocorrido um provável déficit energético nessas estruturas, sugerimos que a disfunção mitocondrial não foi tamanha a ponto de prejudicar a SUMOilação nas horas iniciais do modelo de MPTP i.n., pois a ativação de SUMO é dependente de ATP (FLOTHO e MELCHIOR, 2013; HENLEY, CRAIG e WILKINSON, 2014).

Decorrente do estresse oxidativo provocado pelo MPTP/MPP<sup>+</sup>, a peroxidação lipídica também está correlacionada às disfunções iniciais observadas na patogênese da DP (MIZUNO *et al.*, 1989; PARKER, PARKS e SWERDLOW, 2008; NAVARRO *et al.*, 2009). O aumento de produtos resultantes da peroxidação lipídica, como o MDA e o HNE, é observado no cérebro de pacientes com DP (YORITAKA *et al.*, 1996). Além disso, em modelos de estresse celular, a SUMOilação demonstrou atividade neuroprotetora reduzindo ERs e a peroxidação lipídica (KIM *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2017). Dados prévios do grupo demonstram que a administração i.n. de MPTP elevou os níveis de TBARS (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*), no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal nas primeiras horas pós administração da pró-neurotoxina (FRANCO *et al.*, 2007). Estudos prévios também demonstram aumento de peroxidação lipídica induzido pelo MPTP em camundongos e macacos (SRIRAM *et al.*, 1997; HUNG e LEE, 1998). Entretanto, não foi possível observar tais alterações no nosso trabalho por meio da medida de MDA e HNE. Apesar de observarmos redução de MDA no bulbo olfatório e no estriado e de HNE no estriado em 1 h inesperadas, nenhuma alteração ocorreu em 6 h nesses e nos demais tecidos. Além disso, as alterações de peroxidação lipídica observadas no modelo de MPTP i.n., bem como a resposta antioxidante celular demonstram ser transientes (PREDIGER *et al.*, 2011). Assim, sugerimos uma avaliação mais especulativa, como novos alvos de medida de estresse celular e diferentes tempos de análise.

Como discutido anteriormente, o aumento da fragmentação mitocondrial precede a morte celular. Além disso, o MPTP induz morte celular por aumentar os níveis de Drp-1. Entretanto, o MPTP i.n. não provocou aumento nos níveis de Drp-1 horas após a administração. De forma contrária, observamos em alguns tecidos redução da Drp-1, o que não era esperado. A redução nos níveis de Drp-

1 é vista como neuroprotetora nos modelos de MPTP. A redução de Mff pode estar correlacionada à perda mitocondrial, seja pela necessidade das células eliminarem mitocôndrias disfuncionais, ou à própria morte celular. No estriado, podemos observar que a redução de Mff acompanha uma redução nos níveis de peroxidação lipídica. Visto que as mitocôndrias são a maior fonte de espécies reativas, sugerimos que houve perda mitocondrial no estriado nas horas iniciais após a administração i.n. de MPTP.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram pela primeira vez a alteração da SUMOilação em modelos *in vitro* de MPP<sup>+</sup> e *in vivo* de MPTP i.n. da DP. A redução da SUMOilação global e dos níveis de SENP3 e Ubc9 demonstram um novo mecanismo molecular de toxicidade do MPP<sup>+</sup>. Além disso, a descrição do perfil de SUMOilação em regiões cerebrais afetadas pelo MPTP i.n. nos mostra a alta dinâmica dessa MPT no modelo e proporciona diferentes correlações comportamentais e bioquímicas. Esse trabalho inovador abre portas para inúmeras investigações moleculares nos modelos da DP, principalmente no modelo de MPTP i.n., possibilitando ampliar o conhecimento de mecanismos moleculares envolvidos principalmente na patogênese da fase pré-motora da doença. Ressaltamos que a partir dos conjugados totais de SUMOilação podemos identificar alterações de conjugados SUMO-substrato específico. Isso possibilita estudos mais rebuscados e centralizados de proteínas específicas alteradas pela SUMOilação no processo de patogênese da DP.

## REFERÊNCIAS

ADORISIO, S. *et al.* . SUMO proteins: Guardians of immune system. *J Autoimmun*, v. 84, p. 21-28, 2017.

AHN, K. *et al.* . Ubc9 gene polymorphisms and late-onset Alzheimer's disease in the Korean population: a genetic association study. *Neurosci Lett*, v. 465, n. 3, p. 272-5, 2009.

ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*, v. 9, p. 357-81, 1986.

ALEXOUDI, A.; ALEXOUDI, I.; GATZONIS, S. Parkinson's disease pathogenesis, evolution and alternative pathways: A review. *Rev Neurol (Paris)*, v. 174, n. 10, p. 699-704, 2018.

ANANDHAN, A. *et al.* . Metabolic Dysfunction in Parkinson's Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. *Brain Res Bull*, v. 133, p. 12-30, 2017.

ARDITO, F. *et al.* . The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*, v. 40, n. 2, p. 271-280, 2017.

ARKINSON, C.; WALDEN, H. Parkin function in Parkinson's disease. *Science*, v. 360, n. 6386, p. 267-268, 2018.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today*, v. 21, n. 5, p. 802-18, 2016.

BAEZA, J.; SMALLEGAN, M. J.; DENU, J. M. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem Sci*, v. 41, n. 3, p. 231-244, 2016.

BALESTRINO, R.; MARTINEZ-MARTIN, P. Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, v. 373, p. 173-178, 2017.

BALTUSSEN, L. L.; ROSIANU, F.; ULTANIR, S. K. Kinases in synaptic development and neurological diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 84, n. Pt B, p. 343-352, 2018.

BENSON, M.; INIGUEZ-LLUHI, J. A.; MARTENS, J. Sumo Modification of Ion Channels. *Adv Exp Med Biol*, v. 963, p. 127-141, 2017.

BERNIER-VILLAMOR, V. *et al.* . Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, v. 108, n. 3, p. 345-56, 2002.

BERTHOLET, A. M. *et al.* . Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol Dis*, v. 90, p. 3-19, 2016.

BERTOLOTTO, C. *et al.* . A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, v. 480, n. 7375, p. 94-8, 2011.

- BETARBET, R. *et al.* . Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, v. 3, n. 12, p. 1301-6, 2000.
- BHAT, A. H. *et al.* . Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*, v. 74, p. 101-10, 2015.
- BLAUWENDRAAT, C.; NALLS, M. A.; SINGLETON, A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, v. 19, n. 2, p. 170-178, 2020.
- BOSCO, D. A. *et al.* . Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol*, v. 2, n. 5, p. 249-53, 2006.
- BRAAK, H. *et al.* . Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, v. 318, n. 1, p. 121-34, 2004.
- CAPPADOCIA, L.; LIMA, C. D. Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chem Rev*, v. 118, n. 3, p. 889-918, 2018.
- CAPPADOCIA, L.; PICHLER, A.; LIMA, C. D. Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nat Struct Mol Biol*, v. 22, n. 12, p. 968-75, 2015.
- CARTIER, E. *et al.* . The SUMO-Conjugase Ubc9 Prevents the Degradation of the Dopamine Transporter, Enhancing Its Cell Surface Level and Dopamine Uptake. *Front Cell Neurosci*, v. 13, p. 35, 2019.
- CASTRO, A. A. *et al.* . Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res*, v. 1513, p. 103-16, 2013.
- CELADA, P.; BORTOLOZZI, A.; ARTIGAS, F. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs*, v. 27, n. 9, p. 703-16, 2013.
- CHAKRABORTI, S.; CHAKRABARTI, P. Self-Assembly of Ferritin: Structure, Biological Function and Potential Applications in Nanotechnology. *Adv Exp Med Biol*, v. 1174, p. 313-329, 2019.
- CHAMBERLAIN, S. E. *et al.* . SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, v. 15, n. 6, p. 845-52, 2012.
- CHAN, P. *et al.* . Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem*, v. 57, n. 1, p. 348-51, 1991.
- CHANG, C. C. *et al.* . Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation. *Mol Cell*, v. 42, n. 1, p. 62-74, 2011.
- CHANG, C. R.; BLACKSTONE, C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, v. 282, n. 30, p. 21583-7, 2007.

- CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc*, v. 2011, n. 8, p. 990-2, 2011.
- CHEN, H. *et al.* . Smoking duration, intensity, and risk of Parkinson disease. *Neurology*, v. 74, n. 11, p. 878-84, 2010.
- CHEN, S. *et al.* . Progress in the Discovery of Small Molecule Modulators of DeSUMOylation. *Curr Issues Mol Biol*, v. 35, p. 17-34, 2020.
- CHUNG, S. Y. *et al.* . Parkin and PINK1 Patient iPSC-Derived Midbrain Dopamine Neurons Exhibit Mitochondrial Dysfunction and alpha-Synuclein Accumulation. *Stem Cell Reports*, v. 7, n. 4, p. 664-677, 2016.
- CIECHANOVER, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem*, v. 24, n. 1, p. 27-53, 1984.
- CIMAROSTI, H. *et al.* . Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2012.
- CIMAROSTI, H. *et al.* . Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 2, p. 280-9, 2008.
- CIRIA, M. *et al.* . Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Upstream of Notch and SUMO Pathways. *Stem Cells Dev*, v. 26, n. 13, p. 973-985, 2017.
- COLLE, D. *et al.* . Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. *Mol Neurobiol*, v. 53, n. 2, p. 1280-1295, 2016.
- COSTELLO, S. *et al.* . Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*, v. 169, n. 8, p. 919-26, 2009.
- DATWYLER, A. L. *et al.* . SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 31, n. 11, p. 2152-9, 2011.
- DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of alpha-synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 42, n. 1, p. 33-50, 2016.
- DEMARQUE, M. D. *et al.* . Sumoylation by Ubc9 regulates the stem cell compartment and structure and function of the intestinal epithelium in mice. *Gastroenterology*, v. 140, n. 1, p. 286-96, 2011.
- DEMARTINO, G. N. *et al.* . ATP-dependent mechanisms for protein degradation in mammalian cells. *Revis Biol Celular*, v. 20, p. 181-96, 1989.
- DEXTER, D. T. *et al.* . Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet*, v. 2, n. 8569, p. 1219-20, 1987.
- DI MONTE, D. *et al.* . Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-

methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 137, n. 1, p. 303-9, 1986.

DIECKHOFF, P. *et al.* . Smt3/SUMO and Ubc9 are required for efficient APC/C-mediated proteolysis in budding yeast. *Mol Microbiol*, v. 51, n. 5, p. 1375-87, 2004.

DRAZIC, A. *et al.* . The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1864, n. 10, p. 1372-401, 2016.

DWORKIN, J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, v. 24, p. 47-52, 2015.

ECKERMANN, K. SUMO and Parkinson's disease. *Neuromolecular Med*, v. 15, n. 4, p. 737-59, 2013.

ELROUBY, N. Analysis of Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Targets Reflects the Essential Nature of Protein SUMOylation and Provides Insight to Elucidate the Role of SUMO in Plant Development. *Plant Physiol*, v. 169, n. 2, p. 1006-17, 2015.

ENCHEV, R. I.; SCHULMAN, B. A.; PETER, M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 16, n. 1, p. 30-44, 2015.

FAW, B. Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. *Conscious Cogn*, v. 12, n. 1, p. 83-139, 2003.

FELIGIONI, M. *et al.* . Crosstalk between JNK and SUMO signaling pathways: deSUMOylation is protective against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell injury. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28185, 2011.

FELIGIONI, M.; NISHIMUNE, A.; HENLEY, J. M. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. *Eur J Neurosci*, v. 29, n. 7, p. 1348-56, 2009.

FILICHA, E. *et al.* . Inhibition of Drp1 mitochondrial translocation provides neural protection in dopaminergic system in a Parkinson's disease model induced by MPTP. *Sci Rep*, v. 6, p. 32656, 2016.

FLOTHO, A.; MELCHIOR, F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*, v. 82, p. 357-85, 2013.

FORAN, E. *et al.* . Sumoylation of the astroglial glutamate transporter EAAT2 governs its intracellular compartmentalization. *Glia*, v. 62, n. 8, p. 1241-53, 2014.

FOSTER, J. D.; VAUGHAN, R. A. Phosphorylation mechanisms in dopamine transporter regulation. *J Chem Neuroanat*, v. 83-84, p. 10-18, 2017.

FRANCO-SERRANO, L. *et al.* . Multifunctional Proteins: Involvement in Human Diseases and Targets of Current Drugs. *Protein J*, v. 37, n. 5, p. 444-453, 2018.

FRANCO, J. *et al.* . Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sci*, v. 80, n. 20, p. 1906-14, 2007.

FUJINO, G. *et al.* . Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen

species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol*, v. 27, n. 23, p. 8152-63, 2007.

GAINETDINOV, R. R. *et al.* . Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem*, v. 69, n. 3, p. 1322-5, 1997.

GAO, X. *et al.* . Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, v. 76, n. 10, p. 863-9, 2011.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 12, p. 947-56, 2007.

GERMAN, C. L. *et al.* . Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev*, v. 67, n. 4, p. 1005-24, 2015.

GOMEZ-LAZARO, M. *et al.* . 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med*, v. 44, n. 11, p. 1960-9, 2008.

GREEN, E. D.; WATSON, J. D.; COLLINS, F. S. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*, v. 526, n. 7571, p. 29-31, 2015.

GUERRA DE SOUZA, A. C.; PREDIGER, R. D.; CIMAROSTI, H. SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease. *J Neurochem*, v. 137, n. 5, p. 673-86, 2016.

GUO, C. *et al.* . SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J*, v. 32, n. 11, p. 1514-28, 2013.

GUO, C. *et al.* . SENP3-mediated deSUMOylation of Drp1 facilitates interaction with Mff to promote cell death. *Sci Rep*, v. 7, p. 43811, 2017.

GUO, J. D. *et al.* . Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int J Mol Med*, v. 41, n. 4, p. 1817-1825, 2018.

HAN, X. J. *et al.* . CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol*, v. 182, n. 3, p. 573-85, 2008.

HAN, Z. J. *et al.* . The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *Int J Oncol*, v. 52, n. 4, p. 1081-1094, 2018.

HARDWICK, L. J. A.; AZZARELLI, R.; PHILPOTT, A. Cell cycle-dependent phosphorylation and regulation of cellular differentiation. *Biochem Soc Trans*, v. 46, n. 5, p. 1083-1091, 2018.

HARTMANN, A. *et al.* . Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 6, p. 2875-80, 2000.

HASEGAWA, E. *et al.* . A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, v. 337, n. 1, p. 69-74, 1997.

- HAUFFA, B. P. Clinical implications of pulsatile hormone signals. *Growth Horm IGF Res*, v. 11 Suppl A, p. S1-8, 2001.
- HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 16, n. 2, p. 79-84, 2010.
- HAYASHI, T. *et al.* . Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res*, v. 280, n. 2, p. 212-21, 2002.
- HENLEY, J. M.; CARMICHAEL, R. E.; WILKINSON, K. A. Extranuclear SUMOylation in Neurons. *Trends Neurosci*, v. 41, n. 4, p. 198-210, 2018.
- HENLEY, J. M.; CRAIG, T. J.; WILKINSON, K. A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiol Rev*, v. 94, n. 4, p. 1249-85, 2014.
- HERRAIZ, T. Evaluation of the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to toxic pyridinium cations by monoamine oxidase (MAO) enzymes and its use to search for new MAO inhibitors and protective agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*, v. 27, n. 6, p. 810-7, 2012.
- HLUSHCHENKO, I.; KOSKINEN, M.; HOTULAINEN, P. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, v. 73, n. 9, p. 435-41, 2016.
- HOCHSTRASSER, M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, v. 2, n. 8, p. E153-7, 2000.
- HOEGE, C. *et al.* . RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, v. 419, n. 6903, p. 135-41, 2002.
- HOLDEN, P.; HORTON, W. A. Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Res Notes*, v. 2, p. 243, 2009.
- HONG, W. C.; AMARA, S. G. Differential targeting of the dopamine transporter to recycling or degradative pathways during amphetamine- or PKC-regulated endocytosis in dopamine neurons. *FASEB J*, v. 27, n. 8, p. 2995-3007, 2013.
- HOPPE, J. B.; SALBEGO, C. G.; CIMAROSTI, H. SUMOylation: Novel Neuroprotective Approach for Alzheimer's Disease? *Aging Dis*, v. 6, n. 5, p. 322-30, 2015.
- HORBAY, R.; BILYY, R. Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis*, v. 21, n. 12, p. 1327-1335, 2016.
- HUNG, H. C.; LEE, E. H. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med*, v. 24, n. 1, p. 76-84, 1998.
- IKEDA, K. *et al.* . Dopamine Transporter Imaging in Parkinson Disease: Progressive Changes and Therapeutic Modification after Anti-parkinsonian Medications. *Intern Med*, v. 58, n. 12, p. 1665-1672, 2019.
- INDO, H. P. *et al.* . A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2015.
- IYER, R. S. *et al.* . A functional SUMO-motif in the active site of PIM1 promotes its

- degradation via RNF4, and stimulates protein kinase activity. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 3598, 2017.
- JANKOVIC, J. Immunologic treatment of Parkinson's disease. *Immunotherapy*, v. 10, n. 2, p. 81-84, 2018.
- JAVITCH, J. A. *et al.* . Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 - tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, n. 7, p. 2173-7, 1985.
- JOHNSON, G. V.; STOOHOFF, W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 24, p. 5721-9, 2004.
- JOZA, N. *et al.* . Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, v. 410, n. 6828, p. 549-54, 2001.
- JUNG, H. Y. *et al.* . SUMO-1 delays neuronal damage in the spinal cord following ischemia/reperfusion. *Mol Med Rep*, v. 15, n. 6, p. 4312-4318, 2017.
- JUNQUEIRA, S. C. *et al.* . Post-translational modifications of Parkinson's disease-related proteins: Phosphorylation, SUMOylation and Ubiquitination. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, v. 1865, n. 8, p. 2001-2007, 2019.
- KALIA, L. V.; KALIA, S. K. alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, v. 28, n. 4, p. 375-81, 2015.
- KAMYNINA, E.; STOVER, P. J. The Roles of SUMO in Metabolic Regulation. *Adv Exp Med Biol*, v. 963, p. 143-168, 2017.
- KAZLAUSKAITE, A. *et al.* . Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J*, v. 460, n. 1, p. 127-39, 2014.
- KIM, H. J. *et al.* . SUMO1 attenuates stress-induced ROS generation by inhibiting NADPH oxidase 2. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 410, n. 3, p. 555-62, 2011.
- KNOTT, A. B. *et al.* . Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, v. 9, n. 7, p. 505-18, 2008.
- KRUMOVA, P. *et al.* . Sumoylation inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity. *J Cell Biol*, v. 194, n. 1, p. 49-60, 2011.
- KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. Advances in the development of SUMO specific protease (SENPs) inhibitors. *Comput Struct Biotechnol J*, v. 13, p. 204-11, 2015.
- LAND, M. *et al.* . Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics*, v. 15, n. 2, p. 141-61, 2015.
- LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, v. 25, n. 1, p. 59-70, 2018.
- LANGSTON, J. W. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis*, v. 7, n. s1, p. S11-S19, 2017.
- LATINI, A. *et al.* . 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience*, v. 135, n. 1, p. 111-20, 2005.

- LEE, A. *et al.* . Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration. *Curr Opin Physiol*, v. 3, p. 82-93, 2018.
- LEE, Y. *et al.* . PINK1 Primes Parkin-Mediated Ubiquitination of PARIS in Dopaminergic Neuronal Survival. *Cell Rep*, v. 18, n. 4, p. 918-932, 2017.
- LEE, Y. J. *et al.* . Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 27, n. 5, p. 950-62, 2007.
- LI, B. D. *et al.* . Comparison of the Efficacy of Different Drugs on Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease: a Network Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*, v. 45, n. 1, p. 119-130, 2018.
- LI, Q.; MUMA, N. A. Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT(1)A receptor: characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT(1)A receptors. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 11, p. 2542-53, 2013.
- LI, Y. *et al.* . Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 1, p. 259-64, 2003.
- LI, Z. *et al.* . The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, v. 119, n. 6, p. 873-87, 2004.
- LIDDLE, R. A. Parkinson's disease from the gut. *Brain Res*, v. 1693, n. Pt B, p. 201-206, 2018.
- LITZMAN, J. Treatment of antibody immunodeficiency. *Vnitr Lek*, v. 65, n. 2, p. 126-130, 2019.
- LOHRUM, M. A. *et al.* . C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol*, v. 21, n. 24, p. 8521-32, 2001.
- LOSON, O. C. *et al.* . Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, v. 24, n. 5, p. 659-67, 2013.
- LUNATI, A.; LESAGE, S.; BRICE, A. The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, v. 174, n. 9, p. 628-643, 2018.
- LUO, H. B. *et al.* . SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, n. 46, p. 16586-91, 2014.
- LUO, J. *et al.* . Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. *Neuromolecular Med*, v. 15, n. 4, p. 692-706, 2013.
- MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, v. 9, n. 12, p. 2277-93, 2007.
- MAPA, M. S. T.; LE, V. Q.; WIMALASENA, K. Characteristics of the mitochondrial and cellular uptake of MPP+, as probed by the fluorescent mimic, 4'I-MPP. *PLoS One*, v. 13, n. 8, p. e0197946, 2018.

MARQUES, N. F. *et al.* . Atorvastatin Prevents Early Oxidative Events and Modulates Inflammatory Mediators in the Striatum Following Intranasal 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Administration in Rats. *Neurotox Res*, v. 33, n. 3, p. 549-559, 2018.

MARTI, Y. *et al.* . Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopaminergic and serotonergic neurons. *Mol Cell Neurosci*, v. 83, p. 37-45, 2017.

MARTINS, W. C.; TASCA, C. I.; CIMAROSTI, H. Battling Alzheimer's Disease: Targeting SUMOylation-Mediated Pathways. *Neurochem Res*, v. 41, n. 3, p. 568-78, 2016.

MASATO, A. *et al.* . Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegener*, v. 14, n. 1, p. 35, 2019.

MATHEUS, F. C. *et al.* . Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Behav Brain Res*, v. 235, n. 2, p. 263-72, 2012.

MATIC, I. *et al.* . Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell*, v. 39, n. 4, p. 641-52, 2010.

MATTOSCI, D. *et al.* . The SUMO conjugating enzyme UBC9 as a biomarker for cervical HPV infections. *Ecancermedalscience*, v. 9, p. 534, 2015.

MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, v. 135, n. 6 Pt 1, p. 1457-70, 1996.

MEVISSSEN, T. E. T.; KOMANDER, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu Rev Biochem*, v. 86, p. 159-192, 2017.

MICHAELI, S. *et al.* . Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts. *Mov Disord*, v. 22, n. 3, p. 334-40, 2007.

MIKOLAJCZYK, J. *et al.* . Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs. *J Biol Chem*, v. 282, n. 36, p. 26217-24, 2007.

MIZUNO, Y. *et al.* . Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 163, n. 3, p. 1450-5, 1989.

MOHAN, R.; JOHN, A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*, v. 67, n. 6, p. 395-403, 2015.

MORAES, B. J. *et al.* . Modified Glutamatergic Postsynapse in Neurodegenerative Disorders. *Neuroscience*, 2019.

MORAES, F.; GOES, A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ*, v. 44, n. 3, p. 215-23, 2016.

MOREIRA, E. L. *et al.* . Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Bail confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 117, n. 12, p. 1337-51, 2010.

NAVARRO, A. *et al.* . Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med*, v. 46, n. 12, p. 1574-80, 2009.

NAYAK, A.; MULLER, S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. *Genome Biol*, v. 15, n. 7, p. 422, 2014.

NGUYEN, H. N. *et al.* . LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, v. 8, n. 3, p. 267-80, 2011.

NI, H. M.; WILLIAMS, J. A.; DING, W. X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol*, v. 4, p. 6-13, 2015.

NICKEL, A.; KOHLHAAS, M.; MAACK, C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*, v. 73, p. 26-33, 2014.

NIE, M. *et al.* . Genetic and proteomic evidence for roles of Drosophila SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One*, v. 4, n. 6, p. e5905, 2009.

NIRANJAN, R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol*, v. 49, n. 1, p. 28-38, 2014.

OCHABA, J. *et al.* . PIAS1 Regulates Mutant Huntingtin Accumulation and Huntington's Disease-Associated Phenotypes In Vivo. *Neuron*, v. 90, n. 3, p. 507-20, 2016.

OH, Y. *et al.* . Human Polycomb protein 2 promotes alpha-synuclein aggregate formation through covalent SUMOylation. *Brain Res*, v. 1381, p. 78-89, 2011.

OHTAKE, F.; TSUCHIYA, H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem*, v. 161, n. 2, p. 125-133, 2017.

OSSOWSKA, K.; LORENC-KOCI, E. Depression in Parkinson's disease. *Pharmacol Rep*, v. 65, n. 6, p. 1545-57, 2013.

OTERA, H. *et al.* . Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, v. 191, n. 6, p. 1141-58, 2010.

PANDEY, M.; RAJAMMA, U. Huntington's disease: the coming of age. *J Genet*, v. 97, n. 3, p. 649-664, 2018.

PARK, J. S.; DAVIS, R. L.; SUE, C. M. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep*, v. 18, n. 5, p. 21, 2018.

PARKER, W. D., JR.; PARKS, J. K.; SWERDLOW, R. H. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res*, v. 1189, p. 215-8, 2008.

PASSINGHAM, D.; SAKAI, K. The prefrontal cortex and working memory: physiology and brain imaging. *Curr Opin Neurobiol*, v. 14, n. 2, p. 163-8, 2004.

PATWARDHAN, P.; MILLER, W. T. Processive phosphorylation: mechanism and biological importance. *Cell Signal*, v. 19, n. 11, p. 2218-26, 2007.

PEREZ-PARDO, P. *et al.* . Gut bacterial composition in a mouse model of Parkinson's disease. *Benef Microbes*, v. 9, n. 5, p. 799-814, 2018.

PFANDER, B. *et al.* . SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*, v. 436, n. 7049, p. 428-33, 2005.

PICHLER, A. *et al.* . SUMO conjugation - a mechanistic view. *Biomol Concepts*, v. 8, n. 1, p. 13-36, 2017.

PILLA, E. *et al.* . A novel SUMO1-specific interacting motif in dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) that is important for enzymatic regulation. *J Biol Chem*, v. 287, n. 53, p. 44320-9, 2012.

PREDIGER, R. D. *et al.* . The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*, v. 17, n. 5, p. 489-507, 2011.

PREDIGER, R. D. *et al.* . Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, v. 17, n. 2, p. 114-29, 2010.

PREDIGER, R. D. *et al.* . The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, v. 202, n. 2, p. 391-403, 2006.

PREDIGER, R. D. *et al.* . Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1170, p. 629-36, 2009.

PREGNOLATO, S. *et al.* . Glutamate Transport and Preterm Brain Injury. *Front Physiol*, v. 10, p. 417, 2019.

PRINCZ, A.; TAVERNARAKIS, N. The role of SUMOylation in ageing and senescent decline. *Mech Ageing Dev*, v. 162, p. 85-90, 2017.

PUIG, M. V.; GULLEDGE, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol*, v. 44, n. 3, p. 449-64, 2011.

PYATIGORSKAYA, N. *et al.* . High nigral iron deposition in LRRK2 and Parkin mutation carriers using R2\* relaxometry. *Mov Disord*, v. 30, n. 8, p. 1077-84, 2015.

QI, X. *et al.* . A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci*, v. 126, n. Pt 3, p. 789-802, 2013.

RANDOLPH, S. A. Ischemic Stroke. *Workplace Health Saf*, v. 64, n. 9, p. 444, 2016.

RAPPOLD, P. M. *et al.* . Drp1 inhibition attenuates neurotoxicity and dopamine release deficits in vivo. *Nat Commun*, v. 5, p. 5244, 2014.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, v. 24, n. 5, p. 981-90, 2012.

- REE, R.; VARLAND, S.; ARNESEN, T. Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Exp Mol Med*, v. 50, n. 7, p. 90, 2018.
- REEVE, A. K. *et al.* . Mitochondrial dysfunction within the synapses of substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*, v. 4, p. 9, 2018.
- REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson's Disease. *Med Clin North Am*, v. 103, n. 2, p. 337-350, 2019.
- RICHARD, P.; VETHANTHAM, V.; MANLEY, J. L. Roles of Sumoylation in mRNA Processing and Metabolism. *Adv Exp Med Biol*, v. 963, p. 15-33, 2017.
- RUDNICK, G. *et al.* . The SLC6 transporters: perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction. *Pflugers Arch*, v. 466, n. 1, p. 25-42, 2014.
- RYAN, B. J. *et al.* . Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*, v. 40, n. 4, p. 200-10, 2015.
- RYAN, B. J.; NISSIM, A.; WINYARD, P. G. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biol*, v. 2, p. 715-24, 2014.
- SAEKI, Y. Ubiquitin recognition by the proteasome. *J Biochem*, v. 161, n. 2, p. 113-124, 2017.
- SAI, T.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Biochemical evaluation of the neurotoxicity of MPTP and MPP(+) in embryonic and newborn mice. *J Toxicol Sci*, v. 38, n. 3, p. 445-58, 2013.
- SAITOH, H.; HINCHEY, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*, v. 275, n. 9, p. 6252-8, 2000.
- SANTOS, D. B. *et al.* . Succinobucol, a Non-Statin Hypocholesterolemic Drug, Prevents Premotor Symptoms and Nigrostriatal Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, v. 54, n. 2, p. 1513-1530, 2017.
- SAWYER, T. F.; HENGHOLD, A. K.; PEREZ, W. A. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav Neurosci*, v. 98, n. 5, p. 908-13, 1984.
- SCHAEFFER, E.; BERG, D. Dopaminergic Therapies for Non-motor Symptoms in Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, v. 31, n. 7, p. 551-570, 2017.
- SCHAMNE, M. G. *et al.* . The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. *Neurotox Res*, v. 34, n. 4, p. 808-819, 2018.
- SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, v. 60, p. 288-91, 1993.
- SCURR, L. L.; HAFERKAMP, S.; RIZOS, H. The Role of Sumoylation in Senescence. *Adv Exp Med Biol*, v. 963, p. 215-226, 2017.
- SEO, J. H. *et al.* . The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not

phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol Biol Cell*, v. 16, n. 1, p. 348-57, 2005.

SHINBO, Y. *et al.* . Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ*, v. 13, n. 1, p. 96-108, 2006.

SRIRAM, K. *et al.* . Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res*, v. 749, n. 1, p. 44-52, 1997.

STEFFAN, J. S. *et al.* . SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, v. 304, n. 5667, p. 100-4, 2004.

STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods*, v. 119, n. 2, p. 153-87, 1989.

STREICH, F. C., JR.; LIMA, C. D. Capturing a substrate in an activated RING E3/E2-SUMO complex. *Nature*, v. 536, n. 7616, p. 304-8, 2016.

SU, H. L.; LI, S. S. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene*, v. 296, n. 1-2, p. 65-73, 2002.

SUBRAMANIAM, S. *et al.* . Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science*, v. 324, n. 5932, p. 1327-30, 2009.

SUBRAMANIAN, G. *et al.* . Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA*, v. 286, n. 18, p. 2296-307, 2001.

TAIRA, T. *et al.* . DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*, v. 5, n. 2, p. 213-8, 2004.

TAKAHASHI, K. *et al.* . SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice. *Neurosci Lett*, v. 441, n. 1, p. 90-3, 2008.

TANAKA, T.; NAKATANI, T.; KAMITANI, T. Negative regulation of NEDD8 conjugation pathway by novel molecules and agents for anticancer therapy. *Curr Pharm Des*, v. 19, n. 22, p. 4131-9, 2013.

TANNER, C. M. *et al.* . Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, v. 119, n. 6, p. 866-72, 2011.

TATHAM, M. H. *et al.* . Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, v. 276, n. 38, p. 35368-74, 2001.

TILOKANI, L. *et al.* . Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, v. 62, n. 3, p. 341-360, 2018.

VARSHAVSKY, A. The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation. *Annu Rev Biochem*, v. 86, p. 123-128, 2017.

VICENTE MIRANDA, H. *et al.* . Posttranslational modifications of blood-derived alpha-synuclein as biochemical markers for Parkinson's disease. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 13713, 2017.

- VIERSTRA, R. D. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol*, v. 160, n. 1, p. 2-14, 2012.
- WANG, X. *et al.* . DLP1-dependent mitochondrial fragmentation mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in neurons: implications for Parkinson's disease. *Aging Cell*, v. 10, n. 5, p. 807-23, 2011.
- WEETMAN, J. *et al.* . Increased SUMO-1 expression in the unilateral rotenone-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, v. 544, p. 119-24, 2013.
- WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*, v. 428, n. 2, p. 133-45, 2010.
- WILKINSON, K. A.; NAKAMURA, Y.; HENLEY, J. M. Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain Res Rev*, v. 64, n. 1, p. 195-212, 2010.
- WILSON, N. R.; HOCHSTRASSER, M. The Regulation of Chromatin by Dynamic SUMO Modifications. *Methods Mol Biol*, v. 1475, p. 23-38, 2016.
- WRIGHT, C. M. *et al.* . UBC9 Mutant Reveals the Impact of Protein Dynamics on Substrate Selectivity and SUMO Chain Linkages. *Biochemistry*, v. 58, n. 6, p. 621-632, 2019.
- WU, P.; NIELSEN, T. E.; CLAUSEN, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, v. 36, n. 7, p. 422-39, 2015.
- XIA, Y. *et al.* . Relationship Between the Anxious Symptoms and the Neurotransmitter in Parkinson's Mice with Different Dosages of MPTP. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 61, 2018.
- YALCIN, Z.; SELENZ, C.; JACOBS, J. J. L. Ubiquitination and SUMOylation in Telomere Maintenance and Dysfunction. *Front Genet*, v. 8, p. 67, 2017.
- YIN, Y. *et al.* . SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes Dev*, v. 26, n. 11, p. 1196-208, 2012.
- YOKOYAMA, S. *et al.* . A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, v. 480, n. 7375, p. 99-103, 2011.
- YONG-KEE, C. J. *et al.* . Mitochondrial dysfunction precedes other sub-cellular abnormalities in an in vitro model linked with cell death in Parkinson's disease. *Neurotox Res*, v. 21, n. 2, p. 185-94, 2012.
- YORITAKA, A. *et al.* . Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 7, p. 2696-701, 1996.
- YOU, H. *et al.* . Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, v. 373, n. 1, p. 111-135, 2018.
- YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, v. 337, n. 6098, p. 1062-5, 2012.
- YUAN, H. *et al.* . Small ubiquitin-related modifier paralogs are indispensable but functionally redundant during early development of zebrafish. *Cell Res*, v. 20, n. 2, p. 185-96, 2010.

YUN, S. M. *et al.* . SUMO1 modulates Abeta generation via BACE1 accumulation. *Neurobiol Aging*, v. 34, n. 3, p. 650-62, 2013.

ZALTIERI, M. *et al.* . Mitochondrial Dysfunction and alpha-Synuclein Synaptic Pathology in Parkinson's Disease: Who's on First? *Parkinsons Dis*, v. 2015, p. 108029, 2015.

ZHANG, Q. *et al.* . ROCK1 induces dopaminergic nerve cell apoptosis via the activation of Drp1-mediated aberrant mitochondrial fission in Parkinson's disease. *Exp Mol Med*, v. 51, n. 10, p. 116, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* . Recent Advance in the Relationship between Excitatory Amino Acid Transporters and Parkinson's Disease. *Neural Plast*, v. 2016, p. 8941327, 2016.

ZHANG, Y. Q.; SARGE, K. D. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 374, n. 4, p. 673-8, 2008.

ZHENG, N.; SHABEK, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem*, v. 86, p. 129-157, 2017.

ZHOU, L. *et al.* . Neddylation: a novel modulator of the tumor microenvironment. *Mol Cancer*, v. 18, n. 1, p. 77, 2019.