

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

Ericks Sousa Soares

Efeitos da SUMOilação em modelos animais da doença de Huntington, da doença de Parkinson e de déficit cognitivo

Florianópolis 2023 Ericks Sousa Soares

Efeitos da SUMOilação em modelos animais da doença de Huntington, da doença de Parkinson e de déficit cognitivo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Cimarosti Coorientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Florianópolis 2023

Soares, Ericks Sousa Efeitos da SUMOilação em modelos animais da doença de Huntington, da doença de Parkinson e de déficit cognitivo / Ericks Sousa Soares ; orientadora, Helena Iturvides Cimarosti, coorientador, Rui Daniel Schröder Prediger, 2023. 141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

 Farmacologia. 2. Neurofarmacologia. 3. SUMOilação. 4.
Doenças neurodegenerativas. I. Cimarosti, Helena Iturvides. II.
Prediger, Rui Daniel Schröder. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título. Ericks Sousa Soares

Efeitos da SUMOilação em modelos animais da doença de Huntington, da doença de Parkinson e de déficit cognitivo

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 20 de abril de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima Christian Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Carla Ines Tasca Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Camila Ângela Zanella Harvard Medical School / Brigham and Women's Hospital

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

Insira neste espaço a

assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a assinatura digital

Profa. Dra. Helena Cimarosti Orientadora

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado a todos os cientistas brasileiros que são luz em meio ao negacionismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Helena, por toda a confiança, ajuda e amizade ao longo desses quatro anos no laboratório.

Ao meu coorientador, Rui, por todo o conhecimento compartilhado, especialmente em relação aos experimentos *in vivo*. Ao meu supervisor em Göttingen, Tiago, por ter me recebido no laboratório, pela ajuda com os experimentos *in vitro* e por ter possibilitado a realização de experimentos que, de outra forma, não teriam sido realizados. À Patrícia, não somente pela colaboração com os animais YAC128, mas também por toda a amizade durante minha estadia em Göttingen. À Ana Lúcia e ao Mansur pela parceria com as proteínas de autofagia e lentivírus, respectivamente.

À banca examinadora desta Tese, Camila, Fernanda, Carla, Katiane e Alfeu, pelo aceite e pelas sugestões ao trabalho.

À minha família, especialmente minha mãe Marcicleide, meus irmãos Marcelle e Ronald e minha vó Nazaré, por acreditarem em mim. Ao meu namorado, Fabio Luis, pelo companheirismo e paciência.

Aos amigos do LINq, que sempre estiveram a meu lado dando o apoio que eu precisava para prosseguir: Carolina, Gustavo, Jaquelini e Letícia. À Camila e Stella, antigas membras do laboratório, que me ensinaram boa parte das técnicas aqui utilizadas.

Aos meus amigos de mestrado/doutorado, Filipe, Marcella e Marina, que sou imensamente grato pela amizade e colaboração desde 2017.

A todos que conheci no Departamento de Neurodegeneração Experimental e que me receberam tão bem: Rapha e Ricardo (eternos vizinhos da Am Vogelsang 3), Alice, Anita, Anka, Avika, Christiane, Dani, Daniel, Elif, Elly, Gonçalo, Heba, Jackeline, Jurgita, Leonie, Liana, Luis, Mohammed, Monica, Patrícia, Rita, Sonja, Sussane e Viviana.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pelo convívio diário e auxílio constante sempre que precisei: Andreia, Daiane, Lucas, Luciana, Pedro e Sérgio. Aos professores do Departamento, por todo o conhecimento compartilhado. Ao Prof. Leandro e suas alunas, Isabel e Luciana, pela doação de escopolamina e auxílio com os animais e cirurgia.

Às técnicas do LAMEB, Bibiana, Elis, Flavia, Laise e Maísa, pela dedicação e prontidão em sempre me ajudar. À SIPG pela agilidade e facilidade em resolver quaisquer pendências. Aos amigos do CCB que tornaram a realização deste trabalho possível, ajudando com experimentos e doando reagentes e tempo: Raquel, Bruna, Caíbe, Cibele, Eveline, Priscila. Aos amigos que, sem os quais, não teria chegado até aqui: Luiza, Rose, Gabriele, Franco, Angélica, Maurício, Camila.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho, e ao programa CAPES-PrInt por tornar possível o período sanduíche em Göttingen.

"Olhe para as estrelas e não para os seus pés. Lembre-se de olhar para o alto, para as grandes perguntas e para as possibilidades que estão lá fora." (Hawking, 2017)

RESUMO

A SUMOilação é uma modificação pós-traducional indispensável para diversos processos biológicos. Por meio dela, proteínas SUMO ligam-se a substratos alvo em uma via enzimática de três passos, sendo reversível pela ação de proteases específicas, chamadas de SENPs. Estudos demonstram que a SUMOilação encontra-se desregulada em várias condições humanas como as doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela perda progressiva e irreversível de neurônios, déficits na autofagia e estresse oxidativo, levando ao surgimento de sintomas motores e não motores que impactam a vida de pacientes. Considerando o potencial efeito neuroprotetor da SUMOilação, o objetivo deste trabalho foi investigar seu envolvimento na doença de Huntington (DH) e o efeito do knockdown de SENP3 em modelos in vitro e in vivo da doença de Parkinson (DP) e no déficit cognitivo induzido por escopolamina. Nossos dados demonstram desregulação na maquinaria proteica da SUMOilação e em proteínas associadas à autofagia em camundongos YAC128, utilizados como modelo para a DH. No modelo in vitro da DP, utilizando rotenona, o *knockdown* de SENP3 reduziu os níveis da proteína de fissão Drp1, enquanto aumentou os níveis de OPA1, assim como diminuiu a produção de superóxido e a morte celular. No modelo in vivo, o knockdown reverteu danos cognitivos e motores ocasionados pela administração intranasal de MPTP. De forma similar, os prejuízos cognitivos causados pela escopolamina também foram diminuídos pelo knockdown de SENP3. Nossos dados evidenciam a importância da SUMOilação na manutenção da homeostase celular e o potencial neuroprotetor desta modificação.

Palavras-chave: doença de Huntington, doença de Parkinson, escopolamina, *knockdown* de SENP3, neurodegeneração.

ABSTRACT

SUMOylation is a post-translational modification essential for various biological processes. SUMO proteins bind to target substrates in a three-step enzymatic pathway, which is reversible by the action of specific proteases, known as SENPs. Studies have shown that SUMOylation is dysregulated in several human disorders, such as neurodegenerative diseases characterised by the progressive and irreversible loss of neurons, and deficits in autophagy and oxidative stress, leading to the emergence of motor and non-motor symptoms that impact patients' lives. Considering the potential neuroprotective effect of SUMOylation, the aim of this study was to investigate its involvement in Huntington's disease (HD) and the effect of SENP3 knockdown in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease (PD) and scopolamine-induced cognitive deficits. Our data demonstrate dysregulation in the protein machinery of SUMOylation and autophagy-related proteins in the YAC128 mice model for HD. In the in vitro model of PD, using rotenone, SENP3 knockdown reduced the levels of the fission protein Drp1 while increased the levels of OPA1, as well as decreased superoxide production and cell death. Furthermore, in the in vivo model, SENP3 knockdown reversed cognitive and motor impairments caused by the intranasal administration of MPTP. Similarly, cognitive deficits caused by scopolamine were also reduced by SENP3 knockdown. Our data highlight the importance of SUMOylation in maintaining cellular homeostasis and the neuroprotective potential of this modification.

Keywords: Huntington's disease, neurodegeneration, Parkinson's disease, scopolamine, SENP3 knockdown, SUMOylation,

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I
Figura 1 – SUMOilação: distribuição, isoformas, vias e efeitos
Figura 2 – Etapas do processo de autofagia
Figura 3 – Delineamento experimental para investigação da SUMOilação e autofagia em
camundongos YAC128 para o estudo da doença de Huntington 37
Figura 4 – SUMO-2/3 e Ubc9 diminuem no córtex pré-frontal de camundongos YAC128
Figura 5 - Níveis de Beclina-1 aumentam no córtex pré-frontal de camundongos WT e
YAC128 de 6 meses
Figura 6 - Níveis de SUMO-2/3 aumentam e de Ubc9 diminuem no hipocampo de
camundongos YAC128 fêmeas
Figura 7 – Níveis de Beclina-1 diminuem no hipocampo de camundongos YAC128 41
Figura 8 – Níveis de SUMO-2/3 e Ubc9 diminuem no estriado de camundongos YAC128
Figura 9 – Níveis de Beclina-1 diminuem no estriado de camundongos WT e YAC128 de
6 meses

Capítulo II

Figura 1 – Via de neurotoxicidade do MPTP 5	4
Figura 2 - Modificações pós-traducionais e mecanismos moleculares da doença d	e
Parkinson	5
Figura 3 - Delineamento experimental para investigação do efeito do knockdown er	n
modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da doença de Parkinson	9
Figura 4 – Células H4 positivas para GFP após transfecção 7	0
Figura 5 – O knockdown de SENP3 diminui os níveis de SENP3 e aumenta os níveis do)S
conjugados de SUMO-2/3 7	1
Figura 6 - O knockdown de SENP3 diminui os níveis de Drp1 e aumenta os níveis d	le
OPA1 em células H4 expostas à rotenona	2
Figura 7 – O knockdown de SENP3 diminui a fluorescência mitocondrial em células H	4
expostas à rotenona	3
Figura 8 - O knockdown de SENP3 diminui a produção de superóxido em células H	4
expostas à rotenona	4

Figura 9 - O knockdown de SENP3 diminui a morte em células H4 expostas à rotenona
Figura 10 – O <i>knockdown</i> de SENP3 não afeta a discriminação olfatória de ratos no modelo do MPTP i n
Figure 11 $-$ 0 knockdown de SENP3 não afeta a anedonia em ratos no modelo do MPTP
Figura $12 - \Omega$ knockdown de SENP3 protege a memória de reconhecimento contra danos
cognitivos em ratos no modelo do MPTP i.n
Figura 13 – O <i>knockdown</i> de SENP3 protege a memória espacial contra danos cognitivos
em ratos no modelo do MPTP i.n. 78
Figura 14 - O knockdown de SENP3 não afeta a atividade locomotora exploratória de
ratos no modelo do MPTP i.n
Figura 15 - O knockdown de SENP3 melhora o controle motor de ratos no modelo do
MPTP i.n
Figura 16 – O knockdown de SENP3 melhora o equilíbrio motor de ratos no modelo do
MPTP i.n
Figura 17 - O knockdown de SENP3 não afeta a marcha de ratos no modelo do MPTP
i.n
Figura 18 - O knockdown de SENP3 reverte os danos no equilíbrio e força motora de
ratos no modelo do MPTP i.n
Figura 19 – Expressão de GFP por lentivírus para o knockdown de SENP3 no estriado
dorsolateral de ratos
Figura 20 – O knockdown de SENP3 aumenta os níveis de conjugados de SUMO-2/3 no
estriado dorsolateral de ratos no modelo do MPTP i.n

Capítulo III

Figura 1 – Fases de formação de memórias
Figura 2 – Transmissão da informação por meio da formação hipocampal
Figura 3 - Delineamento experimental para investigação do knockdown de SENP3 sobre
as memórias de reconhecimento e espacial de ratos tratados com escopolamina 104
Figura 4 - O knockdown de SENP3 não afeta a locomoção espontânea de ratos Wistar
Figura 5 - O knockdown de SENP3 protege a memória de reconhecimento contra danos
cognitivos induzidos por escopolamina em ratos

Figura 6 - O knockdown de SENP3 protege a memória espacial contra danos co	gnitivos
induzidos por escopolamina em ratos	107
Figura 7 – Expressão de GFP por lentivírus para o knockdown de SENP3 no hip	ocampo
dorsal de ratos	108
Figura 8 – O knockdown de SENP3 aumenta os níveis de conjugados de SUMO)-2/3 no
hipocampo dorsal de ratos tratados com escopolamina	109

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μΜ	Micromolar
Ψ	Resíduo hidrofóbico grande
102	Oxigênio singlete
3Rs	Substituição, Redução e Refinamento
6-OHDA	6-hidroxidopamina
А	Adenina
ABCE1	ATP Binding Cassette Subfamily E Member 1
ACo	Acetilcolina
AMPA	Ácido propriônico α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazo
AMS	Atrofia multissistêmica
ANOVA	Análise de variância
Arc	Proteína associada ao citoesqueleto
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
Atg14	Proteína relacionada à autofagia 14
ATP	Adenosina trifosfato
ATP3A2	ATPase tipo 13A2
BAC	Bacterial Artificial Chromosome

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
С	Citosina
CA	Corno de Ammon
САТ	Catalase
CBP	Proteína de ligação ao CREB
CCL	Comprometimento cognitivo leve
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar/modificado
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CL	Corpos de Lewy
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metil transferase
COVID-19	Coronavirus disease
CREB	Proteína de ligação responsiva ao monofosfato cíclico de adenosina
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT	Transportador de dopamina
DDP	Demência da doença de Parkinson
DH	Doença de Huntington

DJ-1	Proteína deglicase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
Drp1	Dynamin-related protein
DRPLA	Atrofia dentatorubro-palidoluisiana
E	Aspartato ou glutamato
ECL	Substrato de quimioluminescência
EDL	Estriado dorsolateral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF	Fator de iniciação eucariótica
EPC	Equipamento de proteção coletiva
EPI	Equipamento de proteção individual
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FADH2	Dinucleotídeo de flavina-adenina
Fis	Proteína de fissão
fMRI	Ressonância magnética funcional
FVB	Friend leukemia virus B
G	Guanina

GD	Giro denteado
GFP	Green fluorescente protein
GPx	Glutationa peroxidase
GST	Glutationa S-transferase
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Hora
H2O2	Peróxido de hidrogênio
НАТ	Histona acetiltransferase
HD	Hipocampo dorsal
HEK293	Human embryonic kidney cells
Htt	Huntingtina
Httex 1	Éxon 1 da huntingtina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IP	Iodeto de propídeo
K	Lisina
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L-DOPA L-3,4	Dihidroxifenilalanina
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
LTD	Depressão de longa duração

LTP	Potenciação de longa duração
M1/5	Receptor muscarínico
MAO-B	Monoamina oxidase B
MAPL	Mitochondria-associated protein
Mff	Fator de fissão mitocondrial
Mfn	Mitofusina
mg	Miligrama
mHtt	Huntingtina mutante
min	Minuto
miRNA	Micro ácido ribonucleico
MJD	Doença de Machado-Joseph
mL	Mililitro
MLD	Memória de longa duração
mM	Micromolar
mm	Milímetro
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPT	Modificação pós-traducional
МРТР	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR	Mammalian target of rapamycin
nAChR	Receptor nicotínico colinérgico
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NEM	N-etilmaleimida
NIID	Doença de inclusões intranucleares neuronais
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPC	Complexo do poro nuclear
° C	Grau Celsius
02–	Radicais superóxido
OH–	Hidroxila
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1
p300	Proteína associada ao adenovírus E1A
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salino
PCAF	Fator associado ao CPB/p300
PFA	Paraformaldeído
PIAS	Protein Inhibitor Of Activated STAT 1 (Signal Transducer And
	Activator of Transcription 1)
PINK1	PTEN-induced kinase 1
poliGln	Poliglutamina

PSP	Paralisia supranuclear progressiva
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RanBP2	RAN binding protein 2
RanGAP1	Proteína ativadora de Ran GTPase
Rhes	Ras homolog enriched in striatum
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
S	Segundo
SAE	Complexo de enzimas de ativação de SUMO
SCA1	Ataxia espinocerebelar tipo 1
SCM	SUMO consensus motif
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SENP	Protease SUMO-específica
shRNA	Short hairpin ácido ribonucleico
SIM	SUMO-interacting motifs
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SQSTM1/p62	Sequestossomo1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
Tat	Transativador da transcrição
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris com Tween-20

tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
U	Uracila
Ubc9	Enzima conjugadora de SUMO
VcS	Via colateral de Schafer
VP	Via perforante
Vps15	Proteína adaptadora de fosfoinositídeo 3-quinase
Vps34	Fosfoinositídeo 3-quinase
WT	Wild type
X	Aminoácido
YAC	Yeast Artificial Chromosome

Capítulo I	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 PROTEÍNAS E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS	25
1.2 SUMOILAÇÃO	26
1.2.1 Histórico	26
1.2.2 Via bioquímica e implicações celulares	27
1.2.3 SUMOilação e neurodegeneração	29
1.3 DOENÇA DE HUNTINGTON	30
1.3.1 Autofagia e DH	31
1.3.2 Modelos <i>in vivo</i> para o estudo da DH	32
1.4 JUSTIFICATIVA	33
1.5 HIPÓTESE	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 GERAL	34
2.2 ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
3.2 ANIMAIS	34
3.3 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	34
3.3.1 Processamento dos tecidos	35
3.3.2 Determinação de proteínas	35
3.3.3 Dot blotting e Western blotting	35
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.5.1 Investigação dos níveis de proteínas SUMO-2/3 e Ubc9 no córte frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128	ex pré- 36
3.5.2 Investigação dos níveis de proteínas Beclina-1 e SQSTM1 no córte frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128	e x pré- 36
4 RESULTADOS	37
4.1 NÍVEIS DE SUMO-2/3 E UBC9 DIMINUEM NO CÓRTEX PRÉ-FRONT CAMUNDONGOS YAC128	AL DE 37
4.2 NÍVEIS DE BECLINA-1 AUMENTAM NO CÓRTEX PRÉ-FRONTA CAMUNDONGOS WT E YAC128 DE 6 MESES	AL DE

SUMÁRIO

	,	
	4.3 NIVEIS DE SUMO-2/3 AUMENTAM E NIVEIS DE UBC9 DIMINUEM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS VAC128 FÊMEAS	NO 30
	4.4 NÍVEIS DE BECLINA-1 DIMINUEM NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONO	GOS
	YAC128	40
	4.5 NIVEIS DE SUMO-2/3 E UBC9 DIMINUEM NO ESTRIADO CAMUNDONGOS YAC128	DE 41
	4.6 NÍVEIS DE BECLINA-1 E SQSTM1 DIMINUEM NO ESTRIADO CAMUNDONGOS WT E YAC128	DE 42
5 1	DISCUSSÃO	43
6 (CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
C٤	pítulo II	50
11	NTRODUÇÃO	50
	1.1 DOENÇA DE PARKINSON	50
	1.1.1 Neuropatologia e sintomatologia	51
	1.1.2 Fatores de risco	51
	1.1.3 Tratamento farmacológico	52
	1.1.4 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo	53
	1.1.5 Modelos experimentais	53
	1.2 SUMOILAÇÃO E DP	54
	1.2.1 Manipulação de proteínas SUMO e proteínas-alvo	56
	1.3 JUSTIFICATIVA	56
	1.4 HIPÓTESE	57
2 (OBJETIVOS	57
	2.1 GERAL	57
	2.2 ESPECÍFICOS:	57
3 I	MATERIAL E MÉTODOS	57
	3.1 MODELO IN VITRO DA DP	57
	3.1.1 Cultivo celular	57
	3.1.2 Transfecção e exposição à rotenona	58
	3.1.3 Western blotting	58
	3.1.3 Imunocitoquímica	59
	3.1.4 Ensaio de viabilidade celular	59

3.2.3 Lentivírus e cirurgia estereotáxica	60
3.2.4 Administração i.n. de MPTP	
3.2.5 Avaliações comportamentais	
3.2.6 Avaliações bioquímicas	
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
3.4.1 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre os níve e proteínas mitocondriais Drp1 e OPA1, produção de superóxio fluorescência mitocondrial e viabilidade celular em células rotenona	is de SUMO-2/3 lo mitocondrial, H4 expostas à 67
3.4.2 Avaliação do tempo de transdução lentiviral para <i>knock</i> em ratos	<i>down</i> de SENP3 67
3.4.3 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre a fu comportamento tipo anedônico em ratos expostos ao MPTP	nção olfatória e 68
3.4.4 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre os defic ratos expostos ao MPTP	eits cognitivos de 68
3.4.5 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre os def ratos expostos ao MPTP	icits motores de 68
3.4.6 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre os n conjugados de SUMO-2/3 e Drp1	íveis de SENP3, 68
4 RESULTADOS	
4.1 O <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 DIMINUI OS NÍVEIS DE SENP OS NÍVEIS DE SUMO-2/3 EM CÉLULAS H4	² 3 E AUMENTA 69
4.2 O <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 NÃO AFETA A FUNÇÃO OI COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO DE RATOS NO MPTP I.N.	LFATÓRIA E O MODELO DO 75
4.3 O <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 DIMINUI PREJUÍZOS COGNITIV NO MODELO DO MPTP I.N.	VOS DE RATOS 77
4.4 O <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 DIMINUI DÉFICITS MOTORES MODELO DO MPTP I.N	DE RATOS NO
4.5 O <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 DIMINUI NÍVEIS DE SENP3 E CONJUGADOS DE SUMO-2/3 NO EDL DE RATOS NO MODELO	AUMENTA OS O DO MPTP I.N. 82
5 DISCUSSÃO	
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	
Capítulo III	
1 INTRODUÇÃO	
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MEMÓRIA	

1.1.1 Memória de trabalho	
1.1.2 Memória de Longa Duração	
1.2 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO	97
1.3 A VIA COLINÉRGICA E A MEMÓRIA	
1.4 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA VIA COLINÉRGICA	99
1.4.1 Escopolamina	99
1.5 JUSTIFICATIVA	100
1.6 HIPÓTESE	100
2 OBJETIVOS	101
2.1 GERAL	101
2.2 ESPECÍFICOS:	101
3 MATERIAL E MÉTODOS	101
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	101
3.2 ANIMAIS	101
3.3 LENTIVÍRUS E CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	101
3.4 ESCOPOLAMINA	101
3.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	102
3.5.1 Campo aberto	102
3.5.2 Reconhecimento de objetos	102
3.5.3 Labirinto em Y	102
3.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	102
3.6.1 Imunohistoquímica	102
3.6.2 Western blotting	102
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	103
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	103
3.8.1 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre os níveis de conjugados de SUMO-2/3.	SENP3, 103
3.8.2 Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SENP3 sobre as memo reconhecimento e espacial de ratos tratados com escopolamina	órias de 103
4 RESULTADOS	104
4.1 EFEITO DO <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 NA LOCOMOÇÃO ESPON DOS ANIMAIS	TÂNEA 104
4.2 EFEITO DO <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 NA MEMÓRI RECONHECIMENTO DOS ANIMAIS	A DE
4.3 EFEITO DO <i>KNOCKDOWN</i> DE SENP3 NA MEMÓRIA ESPACIA ANIMAIS	L DOS

4.4 EFEITO DO KNOCKDOWN DE SENP3 NOS NÍVEIS DE SENF	P3 E SUMO-2/3
5 DISCUSSÃO	
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	
7 CONCLUSÕES GERAIS	
8 LIMITAÇÕES	113
9 PERSPECTIVAS	
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICE A	
ANEXO A	
ANEXO B	

Capítulo I – Pequenas modificações, grandes impactos: Relação entre SUMOilação e doença de Huntington

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Neuroquímica do Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenado pela Profa. Dra. Helena Cimarosti, Laboratório de Neuroplasticidade do Departamento de Ciências Morfológicas da UFSC, coordenado pela Profa. Dra. Patrícia de Souza Brocardo, e Laboratório de Neurobiologia da Depressão, coordenado pela Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNAS E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Em 1838, o químico holandês Gerardus Johannes Mulder (1802-1880) e o químico sueco Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) utilizaram pela primeira vez o termo "proteína". De lá para cá, muitos avanços foram feitos e já sabe-se que uma única célula possui cerca de 42 milhões de moléculas de proteína (HO; BARYSHNIKOVA; BROWN, 2018). Atualmente, são consideradas proteínas todas as macromoléculas covalentes, à base de carbono, formadas pela combinação de 70 ou mais aminoácidos.

A tradução de proteínas em organismos eucariotos ocorre após a duplicação e transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), contando com o ribossomo 80s, o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e o RNA de transferência (tRNA) como principais componentes. O tRNA é responsável pelas ligações códon-anticódon e, após a ativação do mRNA, cerca de 12 fatores de iniciação eucariótica (eIFs) reconhecem a fita de mRNA até encontrar o seu códon de iniciação da tradução da fita (MERRIK, 2018; FREDRICK & IBBA, 2009). A fase de alongamento é marcada por ciclos de decodificações, formações de ligações peptídicas e translocações de sítios, sendo facilitada por fatores de alongamento (RODNINA, 2018). O último estágio da tradução é chamado de terminação. Enquanto a cadeia polipeptídica é formada, três códons específicos (UAA, UAG e UGA) são lidos e ocorre a interrupção do complexo ribossômico formado para a proteína em formação. Por fim, fatores de liberação reconhecem os códons de parada e facilitam a transferência de sítio para a liberação da cadeia peptídica, os quais passam pelo processo de reciclagem mediado pela proteína ABCE1 (*ATP Binding Cassette Subfamily E Member 1*) (HELLEN, 2018).

O proteoma é composto por diversos tipos de proteínas, comumente classificadas de acordo com as características de suas estruturas e sequências: globulares e solúveis (enzimas citoplasmáticas), proteínas de membrana (receptores) e fibrosas (colágeno) (STOLLAR; SMITH, 2020). Além de seus inúmeros efeitos biológicos, as

proteínas sintetizadas podem ser modificadas de diversas formas por eventos conhecidos como modificações pós-traducionais (MPTs) (RAMAZI; ALLAHVERDI; ZAHIRI, 2020), que adicionam grupos químicos (p. ex. fosfatos) ou complexos (p. ex. carboidratos) às proteínas, alterando suas funções, localização, estruturas e também aumentando a diversidade do proteoma (CONIBEAR, 2020). Dentre as MPTs mais estudadas destacam-se a fosforilação, acetilação, ubiquitinação, metilação, glicosilação e a SUMOilação (RAMAZI; ZAHIRI, 2021).

1.2 SUMOILAÇÃO

A conjugação reversível de proteínas SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) a resíduos de lisina (K) de proteínas alvo é um processo chamado de SUMOilação. Essa MPT ocorre por meio de uma via enzimática de três passos (CHANG; YEH, 2020), alterando a localização, estabilidade e atividade de proteínas, assim como modificando a expressão de genes, reparo de DNA e processamento de RNA (CHEN et al., 2021; VAREJÃO et al., 2020).

1.2.1 Histórico

Matunis e colaboradores (1996) e Mahajan e colaboradores (1997) foram os primeiros a descreverem a participação da proteína SUMO em mecanismos de cromatina. Eles descobriram primeiramente que a SUMO influenciava a transferência de uma proteína ativadora de Ran GTPase (RanGAP1) para o citoplasma de complexos de poros nucleares (NPC), havendo então duas isoformas desta proteína, com 65 e 90 kDa. Matunis e colaboradores (1996) haviam identificado a proteína por análise de imunotransferência, onde o anticorpo utilizado reconheceu uma proteína que se assemelhava a outras três proteínas, sem homologia com RanGAP1, sugerindo aos autores três possibilidades: 1) uma proteína de codificação genética exclusivamente relacionada à RanGAP1; 2) uma proteína alternativa produzida pelo gene RanGAP1; e 3) uma MPT específica pela proteína do estudo.

De forma complementar, Mahajan e colaboradores (1997) identificaram o peso da nova proteína, calculado em 11,5 kDa, percebendo certa homologia com a ubiquitina, como domínio central globular compacto e região N-terminal conservada utilizada para ligação covalente a outras proteínas. Além disso, a SUMO e a ubiquitina são produzidas como proteínas precursoras que requerem clivagem e ativação antes de serem conjugadas a outras proteínas. Pela técnica de *Western blotting* eles verificaram que a proteína tratava-se de uma conjugação pós-traducional dependente de adenosina trifosfato (ATP) de RanGAP1 65 kDa em RanGAP1 90 kDa, visto que o anticorpo para a nova proteína reagiu fortemente à RanGAP 90 kDa, Assim, a nova proteína foi nomeada como SUMO.

1.2.2 Via bioquímica e implicações celulares

O processo de conjugação de proteínas SUMO, conhecido como SUMOilação, consiste na ligação de uma proteína SUMO a uma lisina específica em uma proteína alvo (CUBEÑAS-POTTS; MATUNIS, 2013).

Até o presente momento, cinco isoformas de SUMO foram descritas em mamíferos (Figura 1). SUMO-1 e SUMO-2/3 (assim chamada devido à grande similaridade compartilhada entre as isoformas 2 e 3 (JANSEN; VERTEGAAL, 2021)) são altamente expressas no sistema nervoso central (SNC) e estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, respectivamente (ANDERSON et al., 2017; GUO et al., 2013; LUO et al., 2017). SUMO-4 e SUMO-5, por sua vez, foram descritas mais recentemente, com expressão limitada a alguns tecidos: a primeira é encontrada em linfonodos, placenta, baço e rins, com função relacionada a diabetes e resposta ao estresse, enquanto que a segunda é encontrada em leucócitos do sangue periférico e testículos, relacionada à regulação de corpos nucleares na leucemia promielocítica (LIANG et al., 2016; WILSON, 2017).

A via da SUMO (Figura 1) é iniciada por sua maturação pelas proteases SUMOespecificas (SENPs) responsáveis pela exposição da região di-glicina. Posteriormente, a proteína é ativada pelo complexo de enzimas de ativação de SUMO 1 e 2 (SAE1/2) e conjugada pela enzima conjugadora de SUMO (Ubc9), estando pronta para ligar-se a alvos proteicos. Uma vez ligada, com ou sem o auxílio de ligases E3 (*Ras homolog enriched in striatum* (Rhes), PIAS, *RAN binding protein 2* (RanBP2), *mitochondriaassociated protein* (MAPL), Topors, ZATT, etc.), a SUMO modifica a proteína alvo. A ligação ocasiona alterações inter/intramoleculares que terão impacto na localização, atividade e estabilização da proteína-alvo. Mecanismos de apoptose celular, resposta ao estresse, estabilidade proteica, transporte intracelular, manutenção e transmissão sináptica estão relacionados à SUMOilação (HAY, 2005; HENLEY; CARMICHAEL; WILKINSON, 2018).

Uma característica fundamental da SUMOilação, que a diferencia de outras MPTs, é a sua reversibilidade. No processo de desconjugação, ou deSUMOilação, há a

participação de nove SENPs (GUO; HENLEY, 2014). Cada uma destas possui afinidade para maturar ou deSUMOilar diferentes isoformas de SUMO. SENP3, por exemplo, é encontrada em mitocôndrias com importância para processos neuronais e sinapses, possui preferência por deSUMOilar as isoformas SUMO-2/3, as quais são maturadas principalmente por SENP2 e 5 (HENLEY; CRAIG; WILKINSON, 2014).

Os substratos alvos podem ser modificadas tanto por uma única SUMO (monoSUMOilação) como por múltiplas SUMOs (multi-SUMOilação) ou uma cadeia de diversas SUMOs (poli-SUMOilação) (WILKINSON; HENLEY, 2010). Além de possuir o resíduo de lisina como receptor para que a conjugação ocorra, o alvo proteico precisa ter afinidade direta com o complexo SUMO-Ubc9 ou então ser reconhecido por uma ligase E3, responsável por sinalizar e atrair o complexo (FLOTHO; MELCHIOR, 2013; WILKINSON; HENLEY, 2010). A ligação também é caracterizada pela seleção da lisina alvo por meio de três mecanismos: 1) localização da lisina na região consenso de SUMOilação (*SUMO consensus motif* - SCM), composta pela sequência Ψ KxE (Ψ , resíduo hidrofóbico grande; K, lisina alvo; X, aminoácido qualquer; E, aspartato ou glutamato) (PICHLER et al., 2017); 2) presença da região SIM (*SUMO-interacting motifs*) na proteína-alvo próximo à lisina que atrai o complexo (CHANG et al., 2011); e 3) rearranjo da proteína-alvo e Ubc9, por ligases E3, para que a ligação com SUMO seja possível (FLOTHO; MELCHIOR, 2013).



Figura 1 – SUMOilação: distribuição, isoformas, via e efeitos

Proteínas SUMO são encontradas em diversos organismos, como leveduras, *Caenorhabditis elegans*, plantas e mamíferos. Em mamíferos são encontradas 5 diferentes isoformas. A via bioquímica inicia-se com a maturação da proteína por SENPs, ativação pelo complexo SAE1/SAE2, conjugação por Ubc9 e ligação, com o auxílio de ligases E3, a substratos com resíduos de lisina. Esta conjugação, chamada de SUMOilação, ocasiona vários efeitos celulares. A desconjugação é realizada por SENPs. Legenda: AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; GG, região diglicina; K, lisina; SAE1/SAE2, enzima ativadora de SUMO subunidade 1 e 2; SENPs, proteases SUMO específicas; SUMO, *small ubiquitin-like modifier*; Ubc9, enzima conjugadora de SUMO. Fonte das estruturas das proteínas e imagens: SwissModel.expasy.org e Biorender.com.

1.2.3 SUMOilação e neurodegeneração

A SUMOilação tem sido vista em doenças cardiovasculares (SHETTY; RANGREZ; FREY, 2020) e câncer (KROONEN; VERTEGAAL, 2020), assim como em muitos processos neurodegenerativos (PRINCZ; TAVERNARAKIS, 2020).

As doenças neurodegenerativas compreendem uma ampla gama de condições que acometem o ser humano, caracterizadas principalmente pela perda e disfunção de células e fibras nervosas do SNC. Muitos estudos buscam compreender a relação entre a SUMOilação e doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP), as duas maiores causas de neurodegeneração. Atualmente tem crescido também o interesse em se investigar seu envolvimento com outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Huntington (DH).

1.3 DOENÇA DE HUNTINGTON

George Huntington (1850-1916) foi um jovem médico norte-americano que, aos 22 anos de idade, publicou um trabalho intitulado "*On chorea*", relatando casos de demência e coreia¹ em pacientes de meia-idade da mesma família. Huntington disse que a progressão da doença levava à demência e morte, e que ela "nunca pula uma geração para se manifestar novamente na próxima" (BHATTACHARYYA, 2016). Graças a seu pioneirismo na descrição, a doença (ou coreia) de Huntington (DH) foi assim nomeada em sua homenagem.

Proteínas possuem em suas estruturas porções de glutamina, variando de dez a várias unidades. Mutações fazem com que tais porções, ou tratos, tornem-se muito longos, isto é, causam expansões nas cadeias de poliglutamina (poliGln). Tais expansões são características de diversas desordens neurodegenerativas hereditárias, chamadas de doenças de poliGln, dentre as quais a mais conhecida é a DH, uma desordem neurodegenerativa dominante autossômica monogênica. A neurodegeneração ocorre em diversas áreas cerebrais, como córtex pré-frontal, hipocampo e, especialmente, nos neurônios de projeção do estriado, resultando em hipercinesia (motilidade patologicamente excessiva) (BARRON; HURLEY; PARSONS, 2021; SCHAFFERT; CARTER, 2020). Por se tratar de uma doença neurodegenerativa, a DH também é marcada por disfunção mitocondrial (HAN et al., 2011) e autofágica (MARTIN et al., 2015), que contribuem diretamente para o agravamento dos sintomas. Sintomas cognitivos e psiguiátricos são relatados nos pacientes, que possuem cerca de 10-20 anos de expectativa de vida após o diagnóstico (HAWTON et al., 2019). O risco de herdar a doença é igual para homens e mulheres. Com os avanços nos estudos genéticos, em 1993 a principal causa da doença foi descoberta: uma mutação na repetição CAG do gene da huntingtina (htt) (braço curto do cromossomo 4 - 4p16.3) (WEXLER; WILD; TABRIZI, 2016). Esse gene codifica a Htt, uma grande proteína de 348 kDa, expressa no citoplasma e núcleo de neurônios (PRINCZ; TAVERNARAKIS, 2020), essencial para o

¹ Síndrome marcada por movimentos involuntários arrítmicos, rápidos, repentinos, não repetitivos e com distribuição variável.

desenvolvimento embrionário e neural e envolvida no trânsito de RNA, transporte vesicular e transcrição (FIELDS et al., 2021).

Quando uma expansão na repetição dos trinucleotídeos CAG (trato de poliGln) acontece no gene *htt*, a proteína Htt torna-se mais suscetível à agregação (TESTA; JANKOVIC, 2019), tanto no citoplasma quanto no núcleo, afetando a dinâmica mitocondrial, função sináptica, transporte axonal, processos de transcrição e transdução e morte neuronal (MCCOLGAN; TABRIZI, 2018; RANGEL-BARAJAS; REBEC, 2018). A esta forma mutante dá-se o nome de Htt mutante (mHtt).

1.3.1 Autofagia e DH

Autofagia é um processo fisiológico essencial para a manutenção da homeostase celular. Ela ocorre por meio da degradação de componentes celulares indesejados para a célula, conforme mostra a Figura 2 (MARTIN et al., 2015).

O processo é iniciado pela ligação do Sequestossomo1 (SQSTM1), também conhecido como p62, a proteínas poliubiquitinadas direcionando-as para a degradação. Um complexo formado por Beclina-1, proteína relacionada à autofagia 14 (Atg14), proteína adaptadora de fosfoinositídeo 3-quinase (Vps15) e fosfoinositídeo 3-quinase (Vps34) inicia o processo de indução de uma membrana lipídica dupla de isolamento, chamada de fagóforo, que começa a expandir até isolar o material indesejado, passando a ser chamada posteriormente de autofagossomo. A etapa de fusão é marcada pela fusão do lisossomo, agora chamado de autolisossomo. O substrato presente no autolisossomo é degradado por meio de hidrolases, que também degradam a membrana interna do autolisossomo, fazendo com que o conteúdo degradado volte ao citoplasma e seja reciclado (PARK et al., 2013). A acumulação da mHtt tem sido vista como prejudicando o processo autofágico, resultando em acúmulo de agregados proteicos e agravando a neurodegeneração (CROCE; YAMAMOTO, 2019).





A autofagia é iniciada pela identificação de componentes celulares que devem ser degradados, por meio da proteína SQSTM1. A indução da formação de uma membrana lipídica dupla de isolamento, chamada de fagóforo, é realizada pelo complexo formado por Beclina-1, Atg14, Vps34 e Vps15, que se alonga dando origem ao autofagossomo. Após a fusão com o lisossomo ele passa a ser chamado de autolisossomo e, por meio da ação de hidrolases, acontece a degradação e reciclagem dos componentes celulares. Estruturas das proteínas: SwissModel.expasy.org. Legenda: Atg14, proteína relacionada à autofagia 14; SQSTM1, sequestossomo 1; Vps15, proteína adaptadora de fosfoinositídeo 3-quinase; Vps34, fosfoinositídeo 3-quinase.

1.3.2 Modelos in vivo para o estudo da DH

Os modelos experimentais animais para estudo da DH baseiam-se, sobretudo, em modelos transgênicos com repetições de trinucleotídeos.

Os camundongos transgênicos R6 foram o primeiro modelo genético a reproduzir a patogênese da doença, com uma expansão somente no éxon 1 da Htt (Httex1), sendo amplamente utilizados em estudos das fases avançadas da DH devido a um fenótipo acelerado e tempo de sobrevivência curto (LI; POPOVIC; BRUNDIN, 2005). Posteriormente, foram criados modelos baseados na inserção do gene *htt* humano completo em seus genomas por meio de cromossomos artificiais de bactérias ou leveduras, chamados de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) e YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), respectivamente (HODGSON et al., 1999; WEGRZYNOWICZ et al., 2015).

No modelo YAC, destacam-se os camundongos YAC128, animais FVB (*friend leukemia virus B*) derivados da linhagen Swiss singeneica, com 128 repetições no

trinucleotídeo CAG, fenótipo acelerado e tempo de vida mais longo. Eles são marcados por atrofia estriatal, degeneração cortical, neurogênese hipocampal diminuída, déficits cognitivos e motores, com fenótipo semelhante à doença em humanos (GHILAN et al., 2014).

Portanto, as similaridades entre o fenótipo dos camundongos YAC128 e a condição humana fazem deste modelo uma excelente ferramenta para compreender melhor a fisiopatologia da doença e para testar potenciais estratégias terapêuticas a fim de modificar a progressão da DH.

1.4 JUSTIFICATIVA

MPTs são muito importantes na DH, especialmente devido ao *clearance* e toxicidade da Htt com expansões de poliGln. As funções fisiológicas da Htt (*wild type* – WT) também são moduladas por MPTs (WANG; LIN; QIN, 2010). Modificações nos primeiros 17 aminoácidos do Httex1, por exemplo, são importantes na modulação de processos e funções celulares.

Sabe-se que a SUMOilação da mHttex1 melhora a expressão da Htt, aumenta sua solubilidade e facilita sua manipulação e purificação (CHIKI et al., 2021). Estudos apontam que a SUMOilação induz a degradação de proteínas com poliGln, mediada por autofagia. Em outras doenças, como nas DA e DP, a SUMOilação parece ser neuroprotetora (MANDEL; AGARWAL, 2022). Na DH, entretanto, ainda não está claro o seu papel e nem se as inclusões de mHtt são realmente tóxicas, com algumas evidências mostrando que estas poderiam ser eventos neuroprotetores, Logo, as proteínas SUMO poderiam também estar envolvidas na patogênese da DH (LIEBELT; VERTEGAAL, 2016) e interagindo com proteínas relacionadas à autofagia como forma de prevenir o dano neuronal (LIEBELT; VERTEGAAL, 2016; VIJAYAKUMARAN; POUNTNEY, 2018).

1.5 HIPÓTESE

Com base no acima exposto, a hipótese deste Capítulo é de que SUMOilação é afetada negativamente na DH e que isto potencializa a disfunção autofágica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o envolvimento da SUMOilação e autofagia em um modelo *in vivo* da DH.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis das proteínas SUMO-2/3 e Ubc9 no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128;
- Avaliar os níveis das proteínas relacionadas à autofagia, Beclina-1 e SQSTM1, no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC (nº 4502210318) (Anexo A). O tamanho da amostra foi calculado para o uso mínimo de animais suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, de acordo com os princípios dos 3Rs: Substituição, Redução e Refinamento (*Replacement, Reduction, Refinement*) e as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem FVB/N, machos e fêmeas, WT e transgênicos (YAC128), com 3 e 6 meses de idade. Os animais foram provenientes da colônia local do Laboratório de Neuroplasticidade da UFSC, onde eram mantidos em gaiolas plásticas padrão (47,5 cm x 33 cm x 5 cm), com seis animais por gaiola, em condições padronizadas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}$ C), ciclo de luz claro/escuro de 12 h (7:00/19:00) e água e comida *ad libitum*.

3.3 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Ao completar 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os encéfalos dissecados para coleta do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo.
3.3.1 Processamento dos tecidos

As três regiões cerebrais foram homogeneizadas com tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, N-etilmaleimida (NEM, inibidor de SENPs) 20 mM, suplementado com inibidor de proteases) rapidamente no gelo. Os lisados foram centrifugados (5.000 rpm, 10 min, 4° C) e os sobrenadantes recolhidos para dosagem de proteínas, *dot blotting* e *Western blotting*.

3.3.2 Determinação de proteínas

O conteúdo total de proteína foi determinado pelo método de Bradford (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998), baseado na interação entre o reagente de Bradford (corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, etanol e ácido fosfórico) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. As amostras foram incubadas com o reagente de Bradford, por 5 min à temperatura ambiente, e a absorbância medida a 590 nm. Os resultados das amostras foram comparados com os resultados das soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

3.3.3 Dot blotting e Western blotting

As amostras foram diluídas em solução tampão para eletroforese em gel (Tris 100 mM, EDTA 4 mM, SDS 8%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 5%, pH 6,8). Para a técnica de dot blotting, as amostras foram preparadas com concentração proteica de 3 $\mu g/\mu L$ e pipetadas diretamente sobre membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (3 µL). Antes da ativação da membrana em metanol, aguardou-se tempo suficiente para que as amostras secassem, a temperatura ambiente. Enquanto que, para a técnica de Western blotting, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de 10 e 12%, e transferidas para membranas de PVDF. Todas as membranas foram bloqueadas em solução contendo leite desnatado ou BSA 5% em TBS-T (1 h, temperatura ambiente), lavadas com TBS-T por três vezes de 5 min e incubadas overnight, a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: SUMO-2/3 rabbit (1:1000; Cell Signaling Technology), Ubc9 mouse (1:500), Beclina-1 rabbit (1:1000; Cell Signaling Technology) e SQSTM1 mouse (1:500; Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários, anti-rabbit (1:5.000; Cell Signaling Technology) e anti-mouse (1:5.000; Santa Cruz Biotechnology). Como controle de carga utilizou-se Coomassie Blue (dot *blotting*) e β-actina *mouse* (1:5000; Cell Signaling Technology) (*Western blotting*). As bandas de proteínas foram visualizadas com substratos de quimioluminescência (ECL) no fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad, EUA), analisadas por densitometria e quantificadas pelos programas ImageJ (NHI, EUA) e Image Lab (Bio-Rad, EUA).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov– Smirnov. Para comparação de dois grupos utilizou-se o teste *t* de Student e para três ou mais grupos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e os valores de *P* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do software GraphPadPrism® versão 6.0 (San Diego, EUA).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental deste Capítulo está exemplificado na Figura 3.

3.5.1 Investigação dos níveis de proteínas SUMO-2/3 e Ubc9 no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128

A fim de investigar o envolvimento da SUMOilação na DH, após completar 3 ou 6 meses de idade, os camundongos YAC128, machos e fêmeas, foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. As estruturas foram homogeneizadas e os níveis das isoformas SUMO-2/3 e da enzima conjugadora Ubc9 foram analisados por meio da técnica de *dot blotting*.

3.5.2 Investigação dos níveis de proteínas Beclina-1 e SQSTM1 no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos YAC128

A fim de investigar o envolvimento de proteínas relacionadas com autofagia, e possíveis associações com a SUMOilação, na DH, camundongos YAC128 machos e fêmeas foram eutanasiados por deslocamento cervical, após completar 3 ou 6 meses de idade, para coleta do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. Estas estruturas foram homogeneizadas e os níveis das proteínas Beclina-1 e SQSTM1 analisados por meio da técnica de *Western blotting*.

Figura 3 – Delineamento experimental para investigação da SUMOilação e autofagia em camundongos YAC128 para o estudo da doença de Huntington



Após completarem 3 ou 6 meses de idade, camundongos YAC128 machos e fêmeas foram eutanasiados e tiveram o córtex pré-frontal, hipocampo e estriado coletados para análise dos níveis de SUMO-2/3 e Ubc9, pela técnica de *dot blotting*, e Beclina-1 e SQSTM1, pela técnica de *Western blotting*. Fonte da imagem de camundongo: BioRender.com. Legenda: SQSTM1, sequestossomo 1; SUMO, *small ubiquitin-like* modifier; Ubc9, enzima conjugadora de SUMO; YAC, *yeast artificial chromosome*.

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE SUMO-2/3 E UBC9 DIMINUEM NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS YAC128

A análise por *dot blotting* mostrou que fêmeas de 6 meses de idade, com genótipo positivo para a DH, possuíam níveis menores de SUMO-2/3 (Figura 4A), enquanto que os machos, também positivos, possuíam níveis menores de Ubc9 (Figura 4B).



Figura 4 - SUMO-2/3 e Ubc9 diminuem no córtex pré-frontal de camundongos YAC128

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do córtex pré-frontal, o qual foi processado para a técnica de *dot blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SUMO-2/3 (A) e Ubc9 (B). *Coomassie Blue* foi utilizado como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. **P* < 0,05 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa na diminuição dos níveis de SUMO-2/3 nas fêmeas (Figura 4A) (F (6, 42) = 3,472) e Ubc9 nos machos (Figura 4B) ((F (6, 42) = 2,802)), com P < 0,007 e P < 0,02, respectivamente.

4.2 NÍVEIS DE BECLINA-1 AUMENTAM NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS WT E YAC128 DE 6 MESES

Os níveis de Beclina-1, analisados por *Western blotting*, apresentaram aumento significativo, de acordo com a ANOVA, em animais WT e YAC128 de 6 meses de idade machos (Figura 5A e B) (F (1, 16) = 12,81) e fêmeas (Figura 5D e E) (F (1, 16) = 27,32), com P < 0,002. Não foram observadas diferenças nos níveis de SQSTM1 (Figura 5A e C, D e F).



Figura 5 – Níveis de Beclina-1 aumentam no córtex pré-frontal de camundongos WT e YAC128 de 6 meses

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do córtex pré-frontal, o qual foi processado para a técnica de *Western blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de Beclina-1 (A e B; D e E) e SQSTM1 (A e C; D e F). β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. ***P* < 0,002 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.3 NÍVEIS DE SUMO-2/3 AUMENTAM E NÍVEIS DE UBC9 DIMINUEM NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS YAC128 FÊMEAS

A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa no aumento dos níveis de SUMO-2/3 no hipocampo de fêmeas YAC128 de 3 meses (F (8, 56) = 6,492), com *P* < 0,0001 em comparação com os machos WT e YAC128 (Figura 6A). Também houve diminuição significativa nos níveis de Ubc9 (F (8, 56) = 2,925) em fêmeas YAC128 de 3 e 6 meses (P < 0,008) (Figura 6B).



Figura 6 – Níveis de SUMO-2/3 aumentam e de Ubc9 diminuem no hipocampo de camundongos YAC128 fêmeas

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do hipocampo, o qual foi processado para a técnica de *dot blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SUMO-2/3 (A) e Ubc9 (B). *Coomassie Blue* foi utilizado como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. **P* < 0,0001 quando comparado entre animais WT machos de 3 meses de idade e ***P* < 0,05 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.4 NÍVEIS DE BECLINA-1 DIMINUEM NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS YAC128

Novamente, no hipocampo dos camundongos YAC128, os níveis de Beclina-1 diminuíram significativamente, tanto em machos (Figura 7A e B) (F (1, 16) = 5,413) quanto em fêmeas de 3 e 6 meses (Figura 7D e E) (F (1, 16) = 6,118), com significância estatística de P < 0,03. Níveis de SQSTM1 não apresentaram diferenças (Figura 7A e C, D e F).



Figura 7 – Níveis de Beclina-1 diminuem no hipocampo de camundongos YAC128

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do hipocampo, o qual foi processado para a técnica de *Western blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de Beclina-1 (A e B; D e E) e SQSTM1 (A e C; D e F). β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. **P < 0,03 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.5 NÍVEIS DE SUMO-2/3 E UBC9 DIMINUEM NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS YAC128

No estriado, novamente foi observada diminuição dos níveis de SUMO-2/3 e Ubc9. Houve diferença significativa na diminuição de SUMO-2/3 em machos YAC128 (F (6, 42) = 4,046) (Figura 8A), com P < 0,002, e de Ubc9 em fêmeas YAC128 (F (6, 42) = 0,7223) (Figura 8B), com P < 0,01, pela ANOVA de duas vias.



Figura 8 – Níveis de SUMO-2/3 e Ubc9 diminuem no estriado de camundongos YAC128

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do estriado, o qual foi processado para a técnica de *dot blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SUMO-2/3 (A) e Ubc9 (B). *Coomassie Blue* foi utilizado como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. **P* < 0,05 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.6 NÍVEIS DE BECLINA-1 E SQSTM1 DIMINUEM NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS WT E YAC128

O estriado, por sua vez, foi marcado pela diminuição das proteínas relacionadas à autofagia. Os níveis de Beclina-1 diminuíram de forma significativa em animais WT e YAC128 de 6 meses machos (Figura 9A e B) (F (1, 16) = 8,231) e fêmeas (Figura 9D e E) (F (1, 16) = 13,99), com P < 0,01. De forma semelhante, os níveis de SQSTM1 também diminuíram em YAC128 fêmeas de ambas as idades analisadas (Figura 9D e F) (F (1, 16) = 4,751), com P < 0,01.



Figura 9 – Níveis de Beclina-1 diminuem no estriado de camundongos WT e YAC128 de 6 meses

Após completarem 3 ou 6 meses de idade, os animais foram eutanasiados para coleta do estriado, o qual foi processado para a técnica de *Western blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de Beclina-1 (A e B; D e E) e SQSTM1 (A e C; D e F). β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. *P < 0,01 e **P < 0,001 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Parte deste Capítulo foi publicada na Revista *IBRO Neuroscience Reports* como *Mini Review* intitulada "*SUMO-modifying Huntington's disease*" (DOI: 10.1016/j.ibneur.2022.03.002) (**Apêndice I**).

A maquinaria da SUMOilação envolve diferentes isoformas, logo, diferentes efeitos na Htt podem ser observados. Tanto SUMO-1 quanto SUMO-2 regulam a DH por meio de modificações, podendo ser fatores chave para novos alvos terapêuticos e tratamentos (CHEN et al., 2021).

SUMO-1 tem sido relacionada ao aumento da solubilidade e da toxicidade da Htt, lembrando que nem sempre a formação de inclusões citoplasmáticas é um predito de patogênese (SUBRAMANIAM et al., 2009). Já SUMO-2, em contrapartida, tem sido encontrada acumulada no estriado, uma das regiões cerebrais mais importantes na DH (O'ROURKE et al., 2013). Ela também tem sido relacionada com o aumento na agregação e toxicidade da Htt, assim como à deleção de lisinas modificadas, diminuindo a patologia (STEFFAN et al., 2004). Apesar de não ter sido possível observar imunomarcação para SUMO-1 nos experimentos deste trabalho, provavelmente devido à problemas com o anticorpo utilizado, observamos alterações significativas nos níveis da isoforma 2/3.

Devido a tais evidências do envolvimento da SUMOilação com a Htt, nos propomos a analisar os níveis de SUMO-2/3 e de sua enzima conjugadora em estruturas cerebrais de camundongos YAC128 mais jovens e mais velhos, com 3 e 6 meses de idade, respectivamente. Levando em conta as individualidades, diferenças e falta de estudos, realizamos tal análise em ambos os sexos. O córtex pré-frontal possui papel importante na memória de trabalho, onde projeções dopaminérgicas oriundas da *substantia nigra* processam informações (LARA; WALLIS, 2015). Nossos dados revelam diminuição dos níveis de SUMO-2/3 e Ubc9 no córtex pré-frontal de fêmeas (Figura 4A) e machos (Figura 4B) YAC128 de 6 meses, respectivamente, indicando comprometimento da SUMOilação em animais mais velhos. Desta forma, a neurodegeneração no córtex pré-frontal seria agravada com a idade, onde, a partir de 6 meses, a maquinaria proteica da SUMO começaria a ser afetada negativamente, contribuindo com o agravamento da doença.

Proteínas SUMO poderiam estar envolvidas na formação de inclusões para prevenir o dano neuronal (LIEBELT; VERTEGAAL, 2016). Ao avaliar os efeitos da SUMOilação na agregação de Htt e sua interação com lipídeos de membrana, usando a proteína de fusão glutationa S-transferase (GST)-Httex1 e Httex1, foi observado uma inibição na formação de fibrilas e de agregados quando o Httex1 estava SUMOilado (SEDIGHI; ADEGBUYIRO; LEGLEITER, 2020). Esses achados mostram que os agregados de Htt por SUMO diferem de outros tipos de agregação, já que a SUMOilação impediu a agregação, ligação e acúmulo de Htt. Outro estudo utilizando células de neuroblastoma, neuro2a, enriquecidas com a Htt WT ou com a mHtt em diferentes estágios de agregação, mostrou que a redução na SUMOilação poderia ser uma resposta adaptativa para auxiliar no sequestro do Httex1 solúvel, uma estratégia terapêutica para evitar a agregação (MOILY et al., 2017).

Além de seu papel chave no processamento de memórias e aprendizado, o hipocampo está também envolvido no processo de neurogênese (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Nossos dados mostram aumento de SUMO-2/3 no hipocampo de fêmeas YAC128 de 3 meses, em comparação com machos da mesma idade (Figura 6A), sem diferença para os demais grupos, sugerindo que na fase inicial da doença, esta isoforma seja mais recrutada no hipocampo de fêmeas do que de machos. Ainda nas fêmeas, os níveis de Ubc9 diminuíram tanto em 3 quanto em 6 meses (Figura 6B), o que pode coincidir com a diminuição da SUMO-2/3-ilação em outras estruturas cerebrais.

O hipocampo de pacientes da DH pode apresentar atrofia e disfunção, o que pode contribuir para os problemas de memória e aprendizado (GLIKMANN-JOHNSTON et al., 2019). A mHtt interfere na sinalização neural no hipocampo, gerando prejuízo na plasticidade sináptica, formação e armazenamento de memórias (BARRON; HURLEY; PARSONS, 2021). Dessa forma, nossos achados demonstram que a diminuição de SUMO-2/3 em fêmeas YAC128 possui correlação com a doença, uma vez que o modelo também apresenta déficits cognitivos.

O estriado possui diversas conexões ao longo do encéfalo, com inervações de neurônios dopaminérgicos, sendo essencial para o aprendizado, sistema de recompensa e tomada de decisões (COX; WITTEN, 2019). No estriado, os níveis de SUMO-2/3 diminuíram em animais YAC128 machos de 3 meses (Figura 8A). O estudo de O'Rourke e colaboradores (2013) relaciona SUMO-2 no estriado à acumulação patogênica da Htt, porém, como um fator neuroprotetor, ela poderia facilitar o *clearance* celular quando combinada com a ubiquitinação (CELEN; SAHIN, 2020). No entanto, tanto as vias da SUMO quanto da ubiquitina podem ser prejudicadas, interrompendo a homeostase celular. Considerando o modelo aqui utilizado, a diminuição dos níveis de SUMO-2/3 no estriado estão altamente relacionados com o agravamento dos sintomas da DH, os quais também desaparecem a partir dos seis meses de idade. Nesse sentido faz-se necessário a análise dos níveis de SUMO-2/3-ilação em animais ainda mais velhos.

A principal dificuldade em investigar efeitos específicos da SUMO sobre a Htt é a competição com outras MPTs. Ela compete com a ubiquitinação, por exemplo, pelas mesmas lisinas: 6, 9 e 15 da porção N-terminal da Htt (CELEN; SAHIN, 2020; SARGE; PARK-SARGE, 2011). É importante salientar que tanto a SUMOilação quanto a ubiquitinação são componentes do metabolismo celular e, já que ocorrem ao mesmo tempo, podem afetar uma à outra (DEGER; GERSON; KAYED, 2015). Tal dinâmica pode explicar o porquê da diminuição da SUMOilação no córtex pré-frontal e estriado e aumento no hipocampo.

A redução na toxicidade da mHtt tem sido relacionada à ubiquitinação, enquanto que a estabilização proteica, diminuição da agregação e o desequilíbrio transcricional são comumente relacionados à SUMOilação (EHRNHOEFER; SUTTON; HAYDEN, 2011). Steffan e colaboradores (2004), utilizando um modelo *in vitro*, observaram que um fragmento patogênico da Htt, Httex1p, é estabilizado quando encontra-se SUMOilado: sua agregação diminui e sua capacidade em impedir a transcrição proteica aumenta. O mesmo estudo também utilizou um modelo *in vivo* com *Drosophila*. Neste, a neurodegeneração foi aumentada pela SUMOilação e diminuída pela ubiquitinação de Httex1p. Quando ambas as MPTs são prevenidas pelas mutações nas lisinas da Httex1p, contudo, a patologia da DH é reduzida. A ativação do proteassoma, aumentando a ubiquitinação e promovendo a SUMOilação, poderia ser importante na diminuição, e até mesmo prevenção, do desenvolvimento da neurodegeneração (HUANG et al., 2018).

Além das isoformas da SUMO, outras proteínas associadas à SUMOilação também são alvo de estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da DH. Rhes, por exemplo, é uma pequena proteína G que, além de agir como uma ligase incomum para SUMO, visto que não possui similaridade com nenhuma outra SUMO ligase (LIEBELT; VERTEGAAL, 2016), desempenha diferentes ações na SUMOilação: aumenta a capacidade da Ubc9 para SUMOilar a mHtt e a SUMOilação cruzada entre SAE1/2 e Ubc9 (SERRA et al., 2021; SUBRAMANIAM et al., 2010). Camundongos knockout para Rhes apresentam SUMOilação reduzida no estriado, revelando que Rhes também regula a SUMOilação (SUBRAMANIAM et al., 2010). Quando ligada à mHtt, ela aumenta a SUMOilação e diminui a ubiquitinação, o que reduz a degradação da mHtt e, ao mesmo tempo, aumenta sua toxicidade (ROSS; SHOULSON, 2009; SUBRAMANIAM et al., 2009). Desta forma, pode-se sugerir que a toxicidade causada pela mHtt diminuiu os níveis de Ubc9 em todas as três estruturas aqui analisadas que, por sua vez, diminuiu a conjugação e subsequente ligação de SUMO à mHtt. Considerando que existem poucos estudos relacionando Ubc9 e DH, nossos dados revelam também alteração desta enzima conjugadora e, claro, mais pesquisas são necessárias para entender melhor esta relação, bem como para explorar possíveis terapias que possam ajudar a combater a doenca.

O interesse pela ligase SUMO E3 PIAS1 na DH também tem crescido nos últimos anos. A proteína modula a atividade neuronal e é capaz de alterar fenótipos relacionados à DH em alguns estudos *in vivo*. Por exemplo, ao se injetar microRNA (miRNA) direcionado à PIAS1 no estriado de camundongos R6/2 observou-se melhora no fenótipo comportamental dos animais, mesmo na presença da mHtt (OCHABA et al., 2016). Quando PIAS1 foi reduzida, não houve acumulação de mHtt, a SUMOilação foi reduzida, os níveis de sinaptofisina, associada a vesículas sinápticas, aumentaram e marcadores inflamatórios foram normalizados, enquanto que sua overexpressão ocasionou acúmulo de Htt. Tais achados corroboram estudos prévios (O'ROURKE et al., 2013), que postularam que PIAS1 regula a acumulação da Htt e a SUMOilação nas células. A análise dos níveis de Rhes e PIAS1 no modelo YAC128 poderia ajudar a entender melhor o desenvolvimento da doença.

Proteínas SUMO podem estar colocalizadas com agregados proteicos de poliGln e possuem um papel chave nas inclusões neuronais de diversas doenças poliGln (DORVAL; FRASER, 2007; TERASHIMA et al., 2002). Ueda e colaboradores (2002) encontraram um aumento na SUMO-1-ilação no córtex cerebelar de camundongos que expressam ataxina-1 mutante, responsável por regular a expressão gênica no núcleo celular com mutação relacionada a ataxias. Tal achado evidencia o papel da SUMO-1 também em doenças atáxicas. Quando os autores examinaram os cérebros de pacientes com DH, atrofia dentatorubro-palidoluisiana (DRPLA), doenca de Machado-Joseph (MJD) e ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1) eles também relataram a presença de SUMO-1 em regiões afetadas do cérebro. Outro estudo também relacionou a presença de SUMO-1 com DRPLA (TERASHIMA et al., 2002). Neste foi observada a colocalização das isoformas com inclusões intranucleares tanto no tecido cerebral acometido com DRPLA quanto em um modelo *in vitro*, no qual os agregados estavam fortemente SUMOilados. A formação de agregados nucleares e morte celular também foram células PC12 transfectadas com SUMO-1 e atrofina 1 apresentaram analisados: agregados nucleares e apoptose. SUMO-1 também foi vista em três casos de doença de inclusões intranucleares neuronais (NIID), sendo relacionada, assim, à disfunção do proteassoma (POUNTNEY et al., 2003). O mesmo foi encontrado no tecido cerebral de pacientes com atrofia multissistêmica (AMS), caracterizada por inclusões citoplasmáticas gliais de α -sinucleína, e com paralisia supranuclear progressiva (PSP), conhecida por apresentar inclusões gliais da proteína tau (WONG et al., 2013). Ambas as doenças são um subconjunto de doencas neurodegenerativas, chamadas de corpos de inclusões oligodendrogliais. SUMO-1 foi encontrada tanto dentro quanto ao redor das inclusões, juntamente com catepsina D, um marcador lisossomal responsável pela degradação de proteínas. No mesmo estudo, células 1321N1 foram transfectadas com mHttex1 ainda mais propensa à agregação, chamada de HttQ74-GFP, e houve uma associação de lisossomos positivos para SUMO-1 e acumulação citoplasmática de α -sinucleína, tau e HttQ74-GFP. Estes resultados deixam claro que SUMO-1 também possui uma função lisossomal.

Outro fator importante é a ativação da proteína cinase mTOR (mammalian target of rapamycin) por Rhes, o que altera a síntese proteica (SUBRAMANIAM; SNYDER, 2011). A autofagia é uma degradação lisossomal, desregulada durante processos neurodegenerativos. Considerando que a mTOR regula a autofagia, apoptose e proliferação celular (ZOU et al., 2020), a diminuição de Rhes pela mHtt poderia diminuir a ativação de mTOR. Rhes poderia também aumentar a autofagia ao interagir com Beclina-1. Nossos dados demonstram que Beclina-1 está diminuída em camundongos YAC128 machos e fêmeas, de 3 e 6 meses, no hipocampo, assim como em camundongos WT e YAC128 machos e fêmeas, de 6 meses, no estriado. Os níveis de SQSTM1 também diminuíram em fêmeas YAC128 de ambas as idades aqui analisadas. Tais dados sugerem que a doença diminui níveis proteicos de SUMO, o que potencializa a diminuição de proteínas autofágicas e, consequentemente, disfunção da autofagia. A inibição de Rhes, sem modificar a autofagia, pode representar uma forma efetiva para minimizar os efeitos deletérios da mHtt (CARBO et al., 2019). O aumento dos níveis de Beclina-1 no córtex pré-frontal de todos os animais de 6 meses pode indicar que o processo autofágico começa a ser desregulado nas demais estruturas cerebrais antes de atingi-lo. Estudos que investiguem estes níveis em períodos superiores a 6 meses são necessários.

A SUMO pode, ainda, ter um papel importante no controle da qualidade de proteínas por meio da modulação do dobramento, solubilidade e estabilidade proteica (GALLAGHER et al., 2014), portanto o aumento da SUMOilação no modelo aqui utilizado e em estudos futuros possui importância clínica, especialmente por sua associação com a agregação proteica, já que ela poderia impedir a formação de expansões de poliGln (HUANG et al., 2018).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Proteínas SUMO e proteínas associadas com a via da SUMOilação participam na patofisiologia da DH e de diversas outras doenças de poliGln. Ao mesmo tempo que parecem diminuir os agregados de Htt, aumentar o *clearance* celular e contribuir com a estabilização proteica, também estão envolvidas com o aumento na toxicidade de mHtt e promoção de morte celular. Ainda há muito a ser esclarecido em relação à SUMOilação, especialmente em relação aos diferentes efeitos desempenhados pelas três isoformas de SUMO expressas no SNC. Para melhor caracterizar essa correlação, mais estudos préclínicos são necessários. Nossos dados até o momento mostram que a SUMO está diminuída na DH. Essa alteração se relaciona diretamente com defeitos na autofagia e contribui com a neurodegeneração e déficits associados. **Capítulo II** – Investigação do efeito do *knockdown* de SENP3 em modelos *in vitro* e *in vivo* da doença de Parkinson

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Neuroquímica e Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenados pela Profa. Dra. Helena Cimarosti e Prof. Dr. Rui Daniel Prediger, respectivamente, Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Daniel Mansur, e *Department of Experimental Neurodegeneration* da *Universitätsmedizin Göttingen*, coordenado pelo Prof. Dr. Tiago Outeiro.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

As doenças neurodegenerativas compreendem uma ampla gama de condições que acometem o ser humano, caracterizadas principalmente pela perda e disfunção de células e fibras nervosas do SNC. Uma das maiores causas de neurodegeneração é a DP, causada sobretudo por disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e apoptose (DEL TREDICI; BRAAK, 2016; PIEPERHOFF et al., 2022; UTTARA et al., 2009).

Descrita por James Parkinson (1755-1824) em 1817, a DP recebeu inicialmente o nome de paralisia agitante (*shaking palsy*). Ao observar um grupo de pacientes, ele percebeu que estes apresentavam tremores involuntários, diminuição do poder muscular, mudanças repentinas no ritmo de marcha e propensão a dobrar o tronco para a frente (PARKINSON, 2002). Atualmente sabe-se que o envelhecimento é o principal fator de risco para a doença (LEE; GILBERT, 2016), onde a maioria dos casos é idiopática e estatísticas apontam que a prevalência seja de 0,3% na população geral de países desenvolvidos, 1% em pessoas com mais de 60 anos e 3% em pessoas com 80 anos ou mais (LEE; GILBERT, 2016; LEES; HARDY; REVESZ, 2009; TANNER; GOLDMAN, 1996), sendo mais comum em homens do que em mulheres (HAAXMA et al., 2007). Contudo, há também a DP de início precoce, a qual acomete 3 a 5% de pacientes com menos de 40 anos de idade (SCHRAG; SCHOTT, 2006).

Desde a sua descoberta, estudiosos vêm tentando compreender como a doença ocorre e, dessa forma, impedir a sua progressão. Brissaud (1895), por exemplo, sugeriu que a DP estava relacionada com a *substantia nigra* e Trétiakoff (1919) relatou alterações neuropatológicas em pacientes com DP (JANER et al., 2009). Foi observado uma grande perda de neuromelanina e de neurônios dopaminérgicos no SNC e o aparecimento de inclusões citoplasmáticas, denominadas corpos de Lewy (CL), que tornaram-se a marca anatomopatológica e o critério diagnóstico da DP.

1.1.1 Neuropatologia e sintomatologia

Os sintomas da DP podem ser divididos em não motores e motores. Os sintomas não motores incluem disfunção olfatória, déficits cognitivos, distúrbios do sono, transtornos de humor, disautonomia, dor, distúrbios sensoriais e fadiga (DEL TREDICI; BRAAK, 2016; PIEPERHOFF et al., 2022). Após o avanço da doença, e consequente perda de neurônios e diminuição de 70 a 80% nos níveis de dopamina no estriado (RIEDERER; WUKETICH, 1976), surgem os sintomas motores clássicos: bradicinesia (lentidão para iniciar os movimentos voluntários, com redução progressiva da velocidade e movimentos repetitivos), prejuízos na postura corporal e marcha, rigidez muscular e tremor em repouso (MOUSTAFA et al., 2016).

1.1.2 Fatores de risco

A proteína mais abundante na DP é a α-sinucleína (KALIA; LANG, 2015), associada à estabilização da membrana neuronal, sinalização pré-sináptica e regulação do transporte de vesículas (BRUNDIN; MELKI, 2017; LASHUEL et al., 2002).

Mutações no gene SNCA, assim como fatores ambientais, fazem com que a conformação da proteína seja alterada, tornando-a insolúvel (CUENCA et al., 2018). Consequentemente, ocorre oligomerização para uma forma tóxica, formando CLs no corpo celular de neurônios. Estas formas oligoméricas seriam encontrados primeiramente em regiões como o bulbo olfatório e, de acordo com o avanço da doença, atingiriam outras regiões do SNC, segundo a teoria de Braak e colaboradores (2003). Além de ocasionar danos motores, estes agregados estariam contribuindo também para a demência dos pacientes. Vale salientar que formas alternativas de agregados de α-sinucleína, ou outras proteínas, são possíveis na patologia (KALIA; LANG, 2015). Vários outros genes também estão relacionados à progressão da doença, tais como LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase* 2), parkina, PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*), DJ-1 (proteína deglicase 1), ATP3A2 (ATPase tipo 13A2) e glucocerebrosidase. Mutações desses genes foram identificadas como a causa de formas raras de DP. Alterações no gene PINK1, por exemplo, são responsáveis pela segunda maior causa de DP de início precoce (SCHNEIDER, 1993).

Toxinas ambientais estão altamente relacionadas com os riscos de desenvolvimento da DP, como alguns pesticidas e herbicidas que inibem seletivamente o complexo I mitocondrial e induzem perda de dopamina. Dentre estes, pode-se citar o paraquate, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP) (JANKOVIC; TAN, 2020). A respeito deste último, em 1983 constatou-se que pessoas que receberam injeções intravenosas contaminadas com MPTP exibiam sintomas clássicos da DP (LANGSTON et al., 1983) e, logo mais, descobriu-se que esta substância causa danos em células dopaminérgicas na *substantia nigra* (BETARBET et al., 2000). Isso ocorre, sobretudo, devido ao seu metabólito, 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), que possui estrutura semelhante à dopamina e altera a matriz mitocondrial e a cadeia de transporte de elétrons. Portanto, pessoas que estão em contato com herbicidas e pesticidas que contêm MPTP em suas formulações estão ainda mais propensas a serem diagnosticadas com a DP. Tanto que Petrovitch e colaboradores (2002) demonstraram que homens que trabalhavam por mais de 10 anos em plantações e que utilizavam MPTP possuíam um risco aumentado para o desenvolvimento da doença.

1.1.3 Tratamento farmacológico

Ao longo dos anos, vários tratamentos foram propostos a fim de trazer uma melhora na qualidade de vida dos pacientes com DP. Um dos primeiros fármacos utilizados foi um precursor metabólico da dopamina, chamado de levodopa ou L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), com efeitos anti-parkinsonianos (COTZIAS, 1968; REICH; SAVITT, 2018). Apesar de ser o tratamento mais eficaz, estudos recentes demonstram que a longo prazo ele pode acarretar discinesias (YOO et al., 2019), isto é, mudanças ou flutuações na mobilidade e imobilidade, chamadas de período "*on – off*" (MARSDEN; PARKES, 1976).

Dentre os outros fármacos utilizados como alternativas à DP, pode-se citar os anticolinérgicos, como a escopolamina amplamente utilizada no passado, eficazes no tratamento dos tremores (FAHN, 2015), o antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), amantadina, usado para discinesias (FOX et al., 2018), o agonista dopaminérgico apomorfina, com efeitos benéficos na fase "*off*" da DP, inibidores seletivos da catecol-O-metil transferase (COMT), benéficos para o tratamento das flutuações motoras e com ação mais duradoura (KIM; JEON; JENNER, 2017) e inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), que diminuem as flutuações motoras e as discinesias (DÉZSI; VÉCSEI, 2017).

1.1.4 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo

A disfunção mitocondrial é caracterizada pela diminuição da atividade enzimática do Complexo I mitocondrial, liberação de citocromo c, diminuição de ATP e ativação de caspase-3 e é uma característica marcante da DP. Soma-se a esta cascata de eventos a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como a produção de superóxido, que causam morte celular ao afetar vias de sinalização neuronal (ENGELHARDT, 1999; MOON; PAEK, 2015; PARK; DAVIS; SUE, 2018).

Os processos de fissão e fusão mitocondriais, essenciais para a dinâmica celular, também são alterados durante a progressão da doença, onde há um aumento em proteínas de fissão, como a GTPase citoplasmática Drp1 (*dynamin-related protein*), e diminuição em proteínas de fusão, como a proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) (CHEN; CHAN, 2017; FARKHONDEH et al., 2020). Há grande prejuízo em lipídeos, proteínas e DNA em razão do estresse oxidativo, contribuindo para a diminuição dos níveis de dopamina (MOON; PAEK, 2015).

1.1.5 Modelos experimentais

Dentre os modelos propostos na literatura para o estudo da DP, destacam-se os que empregam a neurotoxinas, como rotenona e MPTP.

A rotenona é uma substância de origem natural, utilizada como inseticida e pesticida, que atua como inibidora do Complexo I mitocondrial. Por meio de sua utilização experimental é possível observar diversas características típicas da DP (SHERER et al., 2003).

O MPTP também é utilizado como modelo experimental em pesquisas relacionadas à DP (LANGSTON et al., 1983). Conforme exemplificado na Figura 1, ele ultrapassa a barreira hematoencefálica e, por oxidação em células gliais, transforma-se em MPP⁺, sendo captado por terminais dopaminérgicos afetando estruturas essenciais para a função cognitiva e motora e ocasionando disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (BAJPAI et al., 2013; FILICHIA et al., 2016; MUSTAPHA; TAIB, 2021; PONZONI; GARCIA-CAIRASCO, 1995). Ao ser administrado por via intranasal (i.n.), ele pode acarretar tanto sintomas não motores quanto motores da DP mesmo em baixas concentrações (PREDIGER et al., 2006, 2009), além de fornecer uma melhor simulação de como acontece a contaminação em seres humanos.



Figura 10 - Via de neurotoxicidade do MPTP

O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizado em MPP⁺ pela enzima MAO-B em células gliais. Este metabólito é captado por DAT devido à alta afinidade. O MPP⁺ concentra-se em mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos, prejudicando a respiração mitocondrial pela inibição do complexo I do transporte de elétrons, ocasionando produção de radicais livres e ativação de vias de morte celular. Legenda: DAT, transportador de dopamina; MAO-B, monoamina oxidase B; MPP⁺, 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio; MPTP, 1-metil4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridína. Fonte: Junqueira (2020).

1.2 SUMOILAÇÃO E DP

Substratos SUMO têm sido vistos em processos patológicos e mecanismos de neurodegeneração têm apresentado alterações na SUMOilação (HENLEY; CRAIG; WILKINSON, 2014). Na DA, por exemplo, a SUMOilação é capaz de regular a proteína precursora amilóide e a proteína tau, cruciais para o desenvolvimento da doença (HOPPE; SALBEGO; CIMAROSTI, 2015). De forma semelhante, as proteínas envolvidas com a DP também são modificadas pela SUMO, portanto ela teria um papel importante no desenvolvimento e/ou progressão da doença (ECKERMANN, 2013), como mostrado na Figura 2.



Figura 2 – Modificações pós-traducionais e mecanismos moleculares da doença de Parkinson

As MPTs controlam diversos mecanismos na DP, como a α -sinucleína, gerando efeitos positivos (retângulos verdes) ou negativos (retângulos em vermelho) na patologia. Setas apontadas para cima indicam aumento e setas apontadas para baixo diminuição. Legenda: DNA, ácido desoxirribonucleico; DP, doença de Parkinson; MPTs, modificações pós-traducionais. Fonte: Canever et al. (2023).

Os principais achados dizem respeito à α -sinucleína. Shahpasandzadeh e colaboradores (2014) estudaram a interação entre a fosforilação da α -sinucleína e a SUMOilação e perceberam que a SUMOilação prejudicada reduziu o crescimento de leveduras, além de aumentar as inclusões citoplasmáticas nas células. O processo também evitou a depuração de agregados de α -sinucleína por autofagia, sugerindo uma importante interação entre SUMOilação e fosforilação na depuração destes agregados. Apesar deste efeito, estudos demonstram a necessidade de uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na SUMOilação e seu potencial para impedir a progressão da DP (ANDERSON et al., 2017), sobretudo no que diz respeito a proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial.

Em condições normais, a proteína mitocondrial Drp1 se transloca para a membrana mitocondrial externa para mediar eventos fisiológicos de fissão e fragmentação mitocondrial (CHEN; CHAN, 2017; FARKHONDEH et al., 2020). Em condições de estresse há aumento na fissão mitocondrial, liberação de citocromo c e morte celular mediada por caspases (GUO et al., 2013). Sabe-se que a SUMO-1 aumenta o recrutamento mitocondrial para promover fissão e fragmentação, enquanto que a SUMO-2/3 previne tais eventos (FIGUEROA-ROMERO et al., 2009). Apesar de todos os avanços em relação ao papel da Drp1 na dinâmica mitocondrial, seus mecanismos em relação à DP ainda precisam ser melhor compreendidos.

1.2.1 Manipulação de proteínas SUMO e proteínas-alvo

Sendo uma MPT, a SUMOilação é um processo muito dinâmico. Soma-se a isso o fato de que ela é reversível, o que por vezes dificulta a investigação de seus mecanismos moleculares. Construtos de shRNA (short hairpin RNA) vêm sendo cada vez mais utilizados como uma forma de controlar a expressão de proteínas e/ou vias celulares, uma vez que seus vetores se integram ao genoma celular e permitem que haja expressão estável a longo prazo, já a partir de duas ou três semanas *in vivo* (SINGER; VERMA, 2008). Por meio de vetores baseados em DNAs modificados (cDNA) (DU et al., 2006), como plasmídeos, transposons e vírus, este shRNA pode ser expresso em células (LIAO; TANG, 2015). Guo e colaboradores (2013), utilizando um modelo *in vitro* de isquemia, e Yang e colaboradores (2015), utilizando um modelo *in vivo* de hemorragia subaracnóide, por exemplo, demonstraram que a utilização de construtos de shRNAs *knockdown* para Drp1 alteram sua SUMOilação e, consequentemente, diminuem a morte neuronal. Contudo, tais achados de SUMOilação de Drp1 e outras proteínas mitocondriais como um fator neuroprotetor não foram observados em modelos da DP até o momento.

1.3 JUSTIFICATIVA

Muitos dos mecanismos patogênicos da DP ainda não foram completamente elucidados. Dentre eles, a disfunção mitocondrial tem emergido como fator crítico contribuinte para a morte de neurônios dopaminérgicos. A SUMOilação teria um papel muito importante neste contexto, uma vez que pode modular Drp1, envolvida na fissão mitocondrial. Portanto, torna-se necessário investigar se o aumento da conjugação de SUMO-2/3, através do *knockdown* de SENP3, poderia inibir a ação de neurotoxinas e aumentaria a sobrevivência celular em modelos da DP. Isto é extremamente relevante

para compreender melhor a doença e buscar estratégias eficazes para caracterizar novos alvos terapêuticos e, assim, reduzir sua patogênese.

1.4 HIPÓTESE

O aumento da SUMOilação, pelo *knockdown* de SENP3, diminui danos ocasionados por neurotoxinas em modelos *in vitro* e *in vivo* da DP.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o efeito do *knockdown* de SENP3 em modelo *in vitro* da DP, induzido por rotenona, e modelo *in vivo*, induzido por MPTP.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 nos níveis das proteínas SENP3, SUMO-2/3, Drp1 e OPA1 em células de neuroglioma humano H4 expostas à rotenona;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 na produção de superóxido, fluorescência mitocondrial e morte celular em células H4 expostas à rotenona;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 na função olfatória e anedonia de ratos no modelo do MPTP i.n.;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 na função cognitiva de ratos no modelo do MPTP i.n.;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 na função motora de ratos no modelo do MPTP i.n.;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 nos níveis de SENP3 e SUMO-2/3 do estriado dorsolateral (EDL) de ratos no modelo do MPTP i.n.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO IN VITRO DA DP

3.1.1 Cultivo celular

Células de neuroglioma humano H4 foram cultivadas e mantidas seguindo o protocolo padrão do laboratório do Prof. Dr. Tiago Outeiro, da *University Medical Center Göttingen*, Alemanha. Elas foram semeadas em garrafas de poliestireno para cultivo celular e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, a 37° C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para a manutenção das células, o meio era trocado a cada 4 dias e antes do plaqueamento as células eram lavadas três vezes com tampão fosfato-

salino (PBS) 1X, pH 7,4. As suspensões celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 100.000 células por poço. Para imunocitoquímica, as placas foram previamente processadas com gelatina 1,5% para fixação das células às lamínulas (13 mm) inseridas nos poços. Os experimentos se iniciaram a partir da passagem 6 e as células foram utilizadas até no máximo a passagem 18.

3.1.2 Transfecção e exposição à rotenona

As suspensões celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 100.000 células por poço. Após 24 h, as células foram transfectadas com 25 μ L do complexo de transfecção (OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, EUA), FuGENE (Promega, EUA) e shRNA para o *knockdown* de SENP3 – denominado shSENP3) na razão de 5:1. Para marcação de mitocôndrias, as células foram transfectadas com o plasmídeo MitoDsRed. Um dia após a transfecção, as culturas de células H4 foram expostas à rotenona (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 1 mM, dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril, por 4, 14 e 24 h.

3.1.3 Western blotting

As células foram homogeneizadas com tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, N-etilmaleimida (NEM, inibidor de SENPs) 20 mM, suplementado com inibidor de proteases) rapidamente no gelo. Os lisados foram centrifugados (5.000 rpm, 10 min, 4° C) e os sobrenadantes recolhidos para dosagem de proteínas e *Western blotting*. A dosagem de proteínas está detalhada na seção 3.3.2 do Capítulo I desta Tese.

As amostras foram diluídas em solução tampão para eletroforese em gel, conforme a seção 3.3.3 do Capítulo I desta Tese. As membranas foram incubadas *overnight*, a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: SENP3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology), SUMO-2/3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology), Drp1 *mouse* (1:1000; BD Biosciences) e OPA1 *mouse* (1:500; Cell Signaling Technology). Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários, anti*rabbit* (1:10.000; Sigma-Aldrich) e anti-*mouse* (1:10.000; Sigma-Aldrich). Como controle de carga utilizou-se β -actina *mouse* (1:10.000; Cell Signaling Technology).

3.1.3 Imunocitoquímica

Após as exposições à rotenona, os poços das placas foram lavados uma vez com PBS 1X e as células fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%, em temperatura ambiente, por 10 min. Após três lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% em temperatura ambiente, por 20 min, e incubadas com o indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX[™]Red (Thermo Fisher Scientific, EUA) 5 mM (50 µg dissolvidos em 13 µL de DMSO), a 37° C, por 10 min. Por fim, os poços foram lavados três vezes com PBS, incubados com o marcador nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), lavados novamente e as lamínulas removidas dos poços e montadas em lâminas com meio de montagem para visualização no microscópio ZEISS Axio Observer (ZEISS, Alemanha).

3.1.4 Ensaio de viabilidade celular

Após as exposições à rotenona, o meio celular foi removido e as células incubadas com 3,5 μM do corante iodeto de propídeo (IP) (diluído em PBS 1X aquecido a 37° C) a 37° C, por 30 min. Para determinação do *background* causado pela não metabolização ou não incorporação do corante, o IP foi adicionado a poços vazios e, após o tempo de incubação, foi trocado por PBS aquecido a 37° C. Como controle da morte celular, as células foram incubadas com Triton X-100. A absorbância foi detectada na multileitora de placas Infinite M200 Tecan (Tecan Trading AG, Suíça), em 530 nm.

3.2 MODELO IN VIVO DA DP

3.2.1 Considerações éticas

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC (nº 9607211022) (Anexo B). O tamanho da amostra foi calculado para o uso mínimo de animais suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, de acordo com os princípios dos 3Rs: Substituição, Redução e Refinamento (*Replacement, Reduction, Refinement*) e as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*).

O cálculo estatístico para definir o tamanho da amostra baseou-se no teste de estimativas, aplicando a fórmula n= {[("z" alfa + "z" beta) * s]/sigma}^2, sendo: 1. O valor de alfa foi fixado em 0,05; assim o valor de z-alfa obtido na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal foi 1,96. 2. O valor de beta foi fixado em 0,10; assim o valor de z-beta obtido na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) foi 1,28. 3. O valor da

diferença entre as médias dos grupos deve ter sido de pelo menos 40% (baseado em dados experimentais prévios do nosso laboratório); experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais, erro no procedimento cirúrgico, erros de dosagem, etc.), logo diferencas entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo podem aumentar a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II. 4. O valor do desvio padrão esperado foi diferente para cada modelo experimental, sendo todos eles baseados em dados experimentais prévios do nosso laboratório; assim, cada grupo experimental foi composto de um número "x" de animais para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existem, tampouco estar observando diferenças onde elas não existem. No entanto, em função do acerto médio obtido na cirurgia estereotáxica (~76%), foi necessário prever o uso de uma quantidade maior de animais para cada grupo submetido à cirurgia estereotáxica. O uso de machos é preconizado, considerando a variação comportamental observada entre machos e fêmeas - e mesmo entre fêmeas em diferentes fases do ciclo estral - em aspectos emocionais, como a ansiedade, e também quanto ao processamento das memórias. Dessa forma, temse que:

 $n = \{[(1,96+1,28) * 35]/40\} = 8$

Para alcançar significância estatística consideramos N=8, porém, em protocolos que envolveram cirurgia estereotáxica consideramos uma taxa de acerto de 76%, sendo necessários 11 animais por grupo.

3.2.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvergicus*) Wistar machos adultos, com 90-120 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSC. Eles foram alojados no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (CCB – UFSC) em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), com cinco animais por gaiola, e mantidos em condições padronizadas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz claro/escuro de 12 h (7:00/19:00) e água e comida *ad libitum*.

3.2.3 Lentivírus e cirurgia estereotáxica

O shSENP3 (sequência TATGGACAGAACTGGCTCAATGACCAGGT) (RAWLINGS et al., 2019) foi clonado no vetor lentiviral modificado pXLG3, sob o controle do promotor U6. Os lentivírus foram produzidos em células HEK293 utilizando

Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (100 mg/kg, via intraperitoneal - i.p.) e xilazina (10 mg/kg) e imobilizados individualmente em um aparelho esterotáxico (Stoelting, mod. 300, USA), realizando-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se uma solução de xilocaína com adrenalina 2% via subcutânea e, em seguida, uma pequena incisão com bisturi para abertura do campo cirúrgico foi feita. Após a raspagem do periósteo, a calota craniana exposta foi perfurada com uma broca odontológica para infusão bilateral do lentivírus para knockdown de SENP3. As coordenadas adotadas para o EDL (-4,4 mm anterior ao bregma, ±1,2 mm relativo ao eixo lateral e -8,2 mm relativo ao eixo dorsoventral) foram definidas de acordo com o atlas do cérebro de rato (PAXINOS E WATSON, 2009). Foram infundidos 5 µL do lentivírus em cada estrutura de forma bilateral com o auxílio de uma bomba de infusão (1 µL/s). Logo após a administração, a agulha permaneceu na mesma posição por 5 min a fim de permitir a infusão efetiva nas regiões de interesse e evitar o refluxo. Para fechamento da incisão utilizou-se fio de sutura cirúrgica de Nylon. Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção de Banamine (5 mg/kg) intramuscular e foram mantidos em cama aquecida até que retornassem do plano anestésico. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia em um período de recuperação até o início dos experimentos (7-10 dias). Como cobertura pós-cirúrgica, os animais receberam injeções de Banamine de 3 a 5 dias.

3.2.4 Administração i.n. de MPTP

Para a administração i.n. de MPTP, os animais foram anestesiados com isoflurano 0,96% (0,75 CAM, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Brasil) usando um sistema vaporizador (SurgiVet In., USA) conectado a um tubo de polietileno de 7 mm, inserido na narina dos animais, de acordo com Prediger e colaboradores (2009). O fluxo de administração (25 μ L/min) foi controlado por uma bomba de infusão conectada ao tubo. O MPTP dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 20 mg/mL foi infundido por 2 min. Os animais do grupo controle receberam administração i.n. de salina. Todos os animais receberam a primeira administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) na narina direita e logo em seguida o procedimento foi repetido na narina esquerda. Por tratar-se de uma substância perigosa, foram adotadas todas as medidas de biossegurança disponíveis na manipulação do MPTP, como uso de equipamentos de proteção individual – EPIs – (jaleco, máscara respiratória descartável e máscara semifacial, macacão de segurança, óculos de segurança e luvas) e equipamentos de proteção coletiva – EPCs – (capela de exaustão, torneiras com água corrente e coletores de resíduos biológicos infectantes, químicos e perigosos). Uma semana após a administração, os animais foram avaliados nos testes comportamentais.

3.2.5 Avaliações comportamentais

Três semanas após a infusão do lentivírus para o *knockdown* de SENP3 e uma semana após a administração i.n. de MPTP, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliação de parâmetros não motores e motores, realizados em uma semana durante o ciclo claro dos animais, em salas com iluminação de baixa intensidade (12 lux), isolamento acústico e antessala para ambientação (60 min antes da realização dos testes). Foram utilizados os mesmos animais para todos os testes. Entre cada animal, os aparatos eram higienizados com etanol 10% e secos com papel toalha para eliminação de odores. Os testes foram gravados por meio de um sistema de monitorização e as imagens obtidas analisadas no software ANY-maze® (Stoelting Co., EUA).

3.2.5.1 Discriminação olfatória

Para avaliar alterações na capacidade olfatória, utilizou-se a metodologia de Prediger e colaboradores (2005). Os animais foram mantidos em caixas isoladas 48 h antes do teste e, após este período, cada animal foi colocado em uma caixa dividida em dois compartimentos iguais (30 x 30 x 20 cm) separados por uma porta aberta (10 x 10 cm), por 5 min. Eles poderiam escolher entre o compartimento não familiar, contendo serragem nova, e o compartimento familiar, contendo serragem retirada da caixa ocupada pelo animal previamente. O tempo gasto em ambos os compartimentos foi registrado.

3.2.5.2 Preferência à sacarose

O teste de preferência à sacarose é utilizado como uma medida de anedonia (LIU et al., 2018). Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração. Na seção de treino, duas garrafas de água foram posicionadas em lados opostos da gaiola a fim de que aprendessem a utilizar ambas as garrafas indiscriminadamente. Após 24 h, a água de uma das garrafas foi substituída por uma solução de sacarose 0,8% (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007). Um dia após, o peso das garrafas foi anotado e a posição das garrafas foi invertida. Após novo intervalo de 24 h, as garrafas foram novamente pesadas. O consumo de água e sacarose foi calculado de acordo com o cálculo: peso inicial - peso final = consumo total.

3.2.5.3 Reconhecimento de objetos

Para análise da memória de trabalho (LUEPTOW, 2017), o teste do reconhecimento de objetos foi realizado em três fases: habituação, treino e teste. A fase de habituação foi realizada no mesmo aparato do teste do campo aberto, por 5 min. A fase de treino iniciou-se 24 h após a habituação, onde o animal foi exposto a dois objetos idênticos (C1 e C2) posicionados em cantos opostos da arena (10 cm da parede e 70 cm de distância entre eles), por 5 min. Após 30 min, iniciou-se a fase de teste, onde o animal foi apresentado a um objeto novo (C3) e a um familiar, por 5 min. Foram mensurados o tempo em que cada animal explorou os objetos, considerando exploração uma distância do focinho ao objeto igual ou menor que 4 cm. A porcentagem de reconhecimento do objeto novo na fase de teste foi calculada de acordo com a seguinte equação: % reconhecimento = (tempo de exploração do objeto novo x 100)/ tempo total de exploração de ambos os objetos.

3.2.5.4 Labirinto em Y

O teste do labirinto em Y é utilizado para avaliação da memória operacional espacial. O aparato do teste consiste em um labirinto com três braços (50 x 10 x 20 cm) afastados por uma angulação de 120 °, em formato de "Y", feitos de madeira e cobertos com fórmica impermeável. Para o teste, os animais foram geralmente introduzidos no centro do aparato para exploração dos braços do labirinto, por 8 min. Considerou-se como entrada quando as quatro patas do animal adentravam o braço. A sequência e o número de entradas nos braços foram registrados e a porcentagem de alternâncias espontâneas foi feita de acordo com o seguinte cálculo: (n° de alternâncias corretas / total de entradas nos braços foi empregado como índice de atividade locomotora dos animais. A execução deste teste foi baseada em protocolos encontrados na literatura (HUGHES, 2004).

3.2.5.5 Campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para a análise da atividade locomotora espontânea e verificação de prejuízo motor capaz de afetar os demais testes. Os animais foram colocados no centro de uma arena, com paredes de 40 cm de altura e piso branco (100 x 100 cm) dividido em 25 quadrantes (20 x 20 cm), por 5 min. O número de quadrantes cruzados e *rearings* (animal apoiado apenas sobre as patas traseiras) foram contabilizados (Prediger et al., 2006).

3.2.5.6 Descida em grade vertical

O objetivo do teste de descida em grade vertical é verificar a capacidade dos animais em descer da grade com o focinho direcionado para baixo, no menor tempo possível. Por meio dele é possível analisar o controle motor, coordenação motora e equilíbrio dinâmico (KIM et al., 2010). O aparato consiste em um equipamento de madeira (15 x 60 x 5 cm) com uma tela de arame no meio com malha de 0,8 x 0,8 cm. Uma caixa contendo serragem foi posicionada na base do aparato. Cada animal foi cuidadosamente posicionado na grade, a 5 cm do topo, com a cabeça dirigida para cima, de modo que fosse possível virar e descer até a caixa, no tempo total de 5 min. Foram analisados o tempo para virada, tempo para descida e tempo total.

3.2.5.7 Equilíbrio em barra

O teste de equilíbrio em barra horizontal é utilizado para avaliação da estabilidade e balanço dos animais, por meio da habilidade de manter-se em equilíbrio sobre uma barra de madeira (20 mm de diâmetro), elevada a 90 cm de altura (DEACON, 2013). Os animais foram gentilmente posicionados com as 4 patas sobre a barra horizontal com tempo de permanência máxima de 60 s. Foram designados escores de acordo com o tempo de permanência em equilíbrio: 0 = 60 s, 1 = 40-59 s, 2 = 20-39 s e 3 = 0-19 s. Para amortecer possíveis quedas, uma caixa com serragem foi colocada abaixo do aparato.

3.2.5.8 Teste da pegada

O teste da pegada é amplamente utilizado na avaliação da marcha dos animais e consiste em pintar as patas dos animais e analisar os padrões de marcha por meio da impressão das pegadas (BROOKS; DUNNETT, 2009; CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001). O aparato consiste em uma passarela com duas paredes verticais (100 cm de comprimento x 20 cm de altura). O piso foi coberto com papel absorvente e

substituído a cada animal. Após os animais terem suas patas dianteiras pintadas com tinta cor preta atóxica e atravessarem o aparato, por no máximo 120 s, suas patas ficaram impressas sobre o papel. As pegadas foram analisadas quanto ao comprimento da passada, representado pela distância média da projeção de cada uma das patas em um movimento à frente, pelo software ImageJ (NIH, EUA). O teste foi realizado em duplicata, com intervalo médio de 24 h entre as sessões e os dados representam a média de ambas as sessões.

3.2.5.9 Rotarod

O teste do Rotarod é utilizado para avaliação de déficits neurológicos em roedores, onde os animais são colocados sobre um cilindro giratório com rotação fixa (DUNHAM; MIYA, 1957). Posteriormente, Jones e Robert (1968) desenvolveram outra versão do teste, onde a rotação do cilindro era acelerada ao longo do experimento, eliminando a necessidade de treinamento extensivo. O rotarod é um dos testes mais utilizados para avaliação da função motora de roedores. No presente trabalho, utilizou-se um aparelho automatizado (Insight®, EFF-411), com uma caixa de acrílico com uma haste estacionária de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20 cm do chão, mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias (10 cm de largura), permitindo a análise de 4 animais simultaneamente. O aparelho possui um sistema automático no piso de cada baia que detecta o impacto e para o cronômetro em caso de queda. Na seção de treino, cada animal foi colocado sobre o cilindro parado durante 30 s, para permanência sob a haste estacionária, e, em seguida, com rotação constante de 5 rpm, durante 90 s. A fim de que os grupos apresentassem desempenho basal similar, foram excluídos os animais que ultrapassaram 5 quedas durante a seção de treino. Na seção de teste, foi avaliada a latência para a primeira queda de cada animal diante da aceleração constante (JONES; ROBERTS, 1968), com velocidade inicial de 5 rpm e 0,1 revoluções/s, atingindo o máximo de 35 rpm após o tempo máximo de 300 s.

3.2.6 Avaliações bioquímicas

Ao fim dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos (cetamina – 200 mg/kg e xilazina – 30 mg/kg), via i.p., e os encéfalos coletados para imunohistoquímica ou dissecados para coleta do EDL.

3.2.6.1 Imunohistoquímica

Os encéfalos dos animais foram coletados e lavados em PBS gelado e imediatamente armazenados em solução de PFA 4% tamponado, pH 7,2 (12 g de PFA, 150 mL de água destilada, 150 ml de PBS 0,2 M e 3 gotas de hidróxido de sódio 1 N), para fixação do tecido. Posteriormente, foram lavados por três vezes com PBS 0,1 M, pH 7,2, durante 30 min, e em seguida com água destilada, por 1 h. Para retirar o fixador, utilizou-se sacarose (diluída em PBS), por ser uma solução crioprotetora, da seguinte forma: sacarose 10% por 1 h, 20% por 1 h e 30% por 4 h em temperatura ambiente; após este período, os encéfalos foram armazenados a 4° C por no máximo 48 h antes dos cortes em criostato. Cortes coronais de 30 µm foram obtidos utilizando o criostato Leica CM 1850 (Microsystems AG, Alemanha), a -20° C, os quais foram aderidos em lâminas revestidas com poli-L-lisina 0,01%. As imagens histológicas foram fotografadas em um microscópio estereoscópico SZX16 (Olympus, Japão) e em um microscópio vertical BX41 (Olympus, Japão) para observação de fluorescência. Também se utilizou azul de Evans para visualização do sítio de administração no EDL.

3.2.6.2 Western blotting

Detalhes dos procedimentos utilizados para a lise das amostras, dosagem de proteínas e separação em gel de eletroforese estão descritos na seção 3.3.1 a 3.3.3 do Capítulo I desta Tese.

As membranas foram incubadas *overnight*, a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: SENP3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology) e SUMO-2/3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology). Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários, anti-*rabbit* (1:10.000; Sigma-Aldrich) e anti-*mouse* (1:10.000; Sigma-Aldrich). Como controle de carga utilizou-se β -actina *mouse* (1:10.000; Cell Signaling Technology).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov– Smirnov. Para comparação de dois grupos utilizou-se o teste *t* de Student e para três ou mais grupos utilizou-se a ANOVA de uma ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média \pm EPM e os valores de *P* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do software GraphPadPrism® versão 6.0 (San Diego, EUA).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental deste Capítulo está exemplificado na Figura 3.

3.4.1 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre os níveis de SUMO-2/3 e proteínas mitocondriais Drp1 e OPA1, produção de superóxido mitocondrial, fluorescência mitocondrial e viabilidade celular em células H4 expostas à rotenona

A fim de verificar como o *knockdown* de SENP3 afetaria os níveis dos conjugados de SUMO-2/3 e das proteínas mitocondriais Drp1 e OPA1, células H4 foram semeadas em placas de 24 poços e, 24 h depois, foram transfectadas com o shSENP3 para *knockdown* de SENP3. Um dia após, as células foram expostas à rotenona (1 mM) por 4, 14 e 24 h. Os lisados foram processados para a técnica de *Western blotting* e incubados com os anticorpos de interesse.

Para verificar como o *knockdown* de SENP3 afetaria a produção de superóxido, devido exposição à rotenona, as células foram processadas para a técnica de imunocitoquímica, incubadas com o indicador de superóxido mitocondrial MitoSOXTMRed e observadas em microscópio de fluorescência. Para verificar a fluorescência mitocondrial pós exposição à rotenona, as células foram transfectadas também com o plasmídeo MitoDSRed para marcação de mitocôndrias, processadas para imunocitoquímica e observadas em microscópio de fluorescência. Para avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 sobre a viabilidade celular pós exposição à rotenona, as células foram transfectadas foram incubadas com o corante IP.

3.4.2 Avaliação do tempo de transdução lentiviral para *knockdown* de SENP3 em ratos

A fim de aumentar os níveis de SUMO-2/3, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no EDL. Após 3 semanas, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos para verificação da expressão de GFP no EDL, em microscópio de fluorescência.

3.4.3 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre a função olfatória e comportamento tipo anedônico em ratos expostos ao MPTP

Para investigar os efeitos do *knockdown* de SENP3 sobre comportamentos anedônicos e depressivos, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no EDL. Duas semanas após, realizou-se a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina). Depois de uma semana da administração do MPTP, foram realizados os testes de discriminação olfatória e preferência à sacarose.

3.4.4 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre os deficits cognitivos de ratos expostos ao MPTP

Para investigar os efeitos do *knockdown* de SENP3 sobre parâmetros cognitivos, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no EDL. Duas semanas após, realizouse a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina). Depois de uma semana da administração do MPTP, foram realizados os testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y, para avaliação de deficits cognitivos.

3.4.5 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre os deficits motores de ratos expostos ao MPTP

Para investigar os efeitos do *knockdown* de SENP3 sobre parâmetros motores, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no EDL. Duas semanas após, realizouse a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina). Depois de uma semana da administração do MPTP, foram realizados os testes de campo aberto, descida em grade vertical, equilíbrio em barra, teste da pegada e rotarod para avaliação de deficits motores.

3.4.6 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre os níveis de SENP3, conjugados de SUMO-2/3 e Drp1

Para investigar os efeitos do *knockdown* de SENP3 na imunomarcação das proteínas SENP3, SUMO-2/3 e Drp1, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no EDL. Duas semanas após, realizou-se a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina). Depois de uma semana da administração do MPTP, os animais foram eutanasiados por

sobredose de anestésicos e tiveram seus encéfalos dissecados para coleta do EDL. Este por sua vez foi lisado para imunomarcação pela técnica de *Western blotting* para as proteínas de interesse.

Figura 311 – Delineamento experimental para investigação do efeito do *knockdown* em modelos *in vitro* e *in vivo* da doença de Parkinson



O efeito do *knockdown* de SENP3 foi testado em modelo *in vitro* utilizando células de neuroglioma humano H4 (1) e *in vivo* utilizando ratos Wistar (2). Fonte das imagens: BioRender.com. Legenda: EDL, estriado dorsolateral; i.n., intranasal; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; SENP3, protease SUMO específica 3; sh, *short hairpin*.

4 RESULTADOS

4.1 O *KNOCKDOWN* DE SENP3 DIMINUI OS NÍVEIS DE SENP3 E AUMENTA OS NÍVEIS DE SUMO-2/3 EM CÉLULAS H4

Conforme mostra a Figura 4, 24 h após a transfecção foi possível observar fluorescência de células positivas para GFP, confirmando a transfecção, com taxa de eficiência de cerca de 28%.

A Figura 5 mostra que o *knockdown* foi eficiente, reduzindo os níveis de SENP3 (A) e aumentando os níveis dos conjugados de SUMO-2/3 (B), com P < 0,05 quando comparado com o grupo controle.

Figura 4 - Células H4 positivas para GFP após transfecção



Células H4 foram plaqueadas e, após 24 h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3). Um dia após, os poços das placas foram lavados com PBS e as células fixadas em PFA 4%. Após três lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5%, e incubadas com o marcador nuclear DAPI, lavadas novamente e as lamínulas removidas dos poços e montadas em lâminas com meio de montagem para visualização em microscópio de fluorescência. Legenda: DAPI, 4',6'-diamino-2-fenil-indol; GFP, *green fluorescente protein.*; PFA, paraformaldeído.
Figura 5 – O *knockdown* de SENP3 diminui os níveis de SENP3 e aumenta os níveis dos conjugados de SUMO-2/3



Células H4 foram plaqueadas e, após 24 h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3). Um dia depois, foram homogeneizadas com tampão de lise e preparadas para a técnica de *Western blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SENP3 (A) e SUMO-2/3. β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos. **P* < 0,05 quando comparados com o grupo controle pelo teste *t* de Student.

A análise dos níveis das proteínas de fissão e fusão (Figura 6) revelou uma diminuição significativa nos níveis de Drp1, 4 h após a exposição à rotenona (F (6, 18) = 3,158; P < 0,02), e OPA1, 4 e 24 h após a exposição (F (6, 18) = 5,192; P < 0,002).



Figura 6 – O *knockdown* de SENP3 diminui os níveis de Drp1 e aumenta os níveis de OPA1 em células H4 expostas à rotenona

Células H4 foram plaqueadas e, após 24h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3). Um dia depois, foram expostas à rotenona. Após 4, 14 e 24 h, foram homogeneizadas com tampão de lise e preparadas para a técnica de *Western blotting*. Quantificação e imagem representativa dos níveis de Drp1 (A) e OPA1. β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos. **P* < 0,05 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Por meio da transfecção com MitoDsRed (Figura 7), observou-se diminuição também na marcação de mitocôndrias em células, em todos os tempos de exposição à rotenona, após o *knockdown* de SENP3 (F (6, 14) = 5,417; P < 0,004).





Células H4 foram plaqueadas e, após 24h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3 ou MitoDsRed). Um dia depois, foram expostas à rotenona. Após 4, 14 e 24 h, foram processadas para a técnica de imunocitoquímica, incubadas com o indicador de superóxido mitocondrial MitoSOXTMRed e observadas em microscópio de fluorescência. Quantificação (A) e imagem representativa (B) da intensidade relativa de MitoDsRed. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos. **P* < 0,004 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Além disso, a análise da produção de superóxido, indicador de estresse oxidativo pela fluorescência de MitoSOXTMRed (Figura 8), indicou que o *knockdown* diminuiu sua produção nas células expostas à rotenona em 24 h após a exposição (F (7, 48) = 9,470; P < 0,0001).



Figura 8 – O *knockdown* de SENP3 diminui a produção de superóxido em células H4 expostas à rotenona

Células H4 foram plaqueadas e, após 24h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3). Um dia depois, foram expostas à rotenona. Após 4, 14 e 24 h, foram processadas para a técnica de imunocitoquímica, incubadas com o indicador de superóxido mitocondrial MitoSOXTMRed e observadas em microscópio de fluorescência. Quantificação (A) e imagem representativa (B) da intensidade relativa de MitoSOXTMRed. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos. **P* < 0,0001 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Depois de 14 e 24 h da exposição à rotenona, observou-se diminuição na intensidade de fluorescência para o IP (Figura 9), indicando diminuição da morte celular (F (8, 9) = 12,01; P < 0,0006).





Células H4 foram plaqueadas e, após 24 h, foram transfectadas com o complexo de transfecção (OptiMEM, FuGENE e shSENP3). Um dia depois, foram expostas à rotenona. Após 4, 14 e 24 h, foram incubadas com iodeto de propídeo para avaliação da morte celular e a fluorescência analisada em leitor de placas. Triton X-100 foi utilizado como controle de morte celular. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos. **P* < 0,05 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.2 O *KNOCKDOWN* DE SENP3 NÃO AFETA A FUNÇÃO OLFATÓRIA E O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO DE RATOS NO MODELO DO MPTP I.N.

A função olfatória, avaliada pelo teste de discriminação olfatória, não foi afetada pela administração de MPTP apenas (Figura 10), porém foi afetada nos grupos MPTP+Vetor vazio e MPTP+shSENP3, assim como no grupo shSENP3, que passaram maior tempo no compartimento não familiar, com serragem nova (F (11, 82) = 12,51; *P*

< 0,0001). Nenhuma diferença foi observada na preferência de consumo à sacarose, utilizada como indicador de anedonia (Figura 11)



Figura 12 – O *knockdown* de SENP3 não afeta a discriminação olfatória de ratos no modelo do MPTP i.n.

O shSENP3 foi injetado no estriado dorso lateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de discriminação olfatória. Salina foi utilizada como veículo. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. **P* < 0,0001 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Figura 11 – O *knockdown* de SENP3 não afeta a anedonia em ratos no modelo do MPTP i.n.



O shSENP3 foi injetado no estriado dorso lateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de preferência à sacarose. Salina foi utilizada como veículo. Os dados representam a média ± EPM de 7-8 animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.3 O *KNOCKDOWN* DE SENP3 DIMINUI PREJUÍZOS COGNITIVOS DE RATOS NO MODELO DO MPTP I.N.

A avaliação da memória de reconhecimento mostrou que os grupos MPTP+Vetor vazio e MPTP+shSENP3 exploraram por mais tempo um dos dois objetos idênticos, na seção de treino (Figura 12A) (F (1, 82) = 12,77; P < 0,0006). Já na seção de teste, os grupos MPTP e MPTP+Vetor vazio apresentaram diminuição no tempo total de investigação do objeto novo (F (5, 39) = 6,054; P < 0,0003), enquanto que os animais do grupo MPTP+Vetor vazio permaneceram semelhantes aos demais grupos sem MPTP.

A memória espacial foi testada no teste do labirinto em Y. Não foram observadas diferenças no número de entradas nos três braços do labirinto (Figura 13A). Já o número de alternâncias espontâneas entre os braços (Figura 13B) foi reduzida significativamente nos grupos que receberam MPTP (F (5, 41) = 6,194; P < 0,0002), enquanto que o grupo MPTP+shSENP3 manteve-se semelhante aos grupos sem MPTP.



Figura 13 – O *knockdown* de SENP3 protege a memória de reconhecimento contra danos cognitivos em ratos no modelo do MPTP i.n.

O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de reconhecimento de objetos. Salina foi utilizada como veículo. A) Seção de treino: animais eram apresentados a dois objetos idênticos; B) Seção de teste: um dos objetos idênticos era trocado por um

diferente. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. *P < 0,0006 e ** P < 0,0003 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.





O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste do labirinto em Y. Salina foi utilizada como veículo. A) Número de entradas nos braços do labirinto; B) Porcentagem de alternâncias espontâneas entre os braços. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. **P* < 0,0002 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.4 O *KNOCKDOWN* DE SENP3 DIMINUI DÉFICITS MOTORES DE RATOS NO MODELO DO MPTP I.N.

Além da função cognitiva, também avaliou-se a função motora dos animais expostos ao MPTP. O teste do campo aberto avaliou a atividade locomotora exploratória dos animais e mostrou diminuição na distância percorrida (F (5, 41) = 3,937; P < 0,005), velocidade média (F (5, 41) = 3,966; P < 0,005) e número de entradas nos quadrantes periféricos (F (5, 41) = 2,785; P < 0,02) dos animais do grupo MPTP+Vetor vazio (Figura 14A, B e D, respectivamente).



Figura 14 – O *knockdown* de SENP3 não afeta a atividade locomotora exploratória de ratos no modelo do MPTP i.n.

O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste do campo aberto. Salina foi utilizada como veículo. A) Distância total percorrida; B) Velocidade média; C) Número de entradas nos quadrantes centrais; B) Número de entradas nos quadrantes periféricos. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. *P < 0,005 e **P < 0,02 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

O teste de descida em grade vertical apontou que os animais expostos ao MPTP gastaram um tempo para virar para baixo (F (5, 41) = 5,912; P < 0,0003) e tempo total (F (5, 41) = 4,043; P < 0,0004) superior a todos os demais grupos (Figuras 15A e C, respectivamente). Não foi observada diferença no tempo de descida (Figura 15B). O teste do equilíbrio em barra (Figura 16) mostrou que apenas os grupos MPTP e MPTP+Vetor vazio apresentaram escores menores (F (5, 123) = 14,36; P < 0,0001), indicando déficit no equilíbrio motor causado por MPTP e reversão deste déficit pelo *knockdown* de SENP3.



Figura 15 – O *knockdown* de SENP3 melhora o controle motor de ratos no modelo do MPTP i.n.

O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de descida em grade vertical. Salina foi utilizada como veículo. A) Tempo de virada; B) Tempo de descida; C) Tempo total. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. **P* < 0,0003 e ***P* < 0,0004 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Figura 16 – O *knockdown* de SENP3 melhora o equilíbrio motor de ratos no modelo do MPTP i.n.



O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de equilíbrio em barra, com três trials. Salina foi utilizada como veículo. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. **P* < 0,0001 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pósteste de Newman-Keuls.

Por mais que o teste de pegadas, que avalia a marcha, não tenha apresentado diferenças significativas (Figura 17), os animais apresentaram prejuízo na força motora

avaliada no teste do rotarod (Figura 18), devido a administração de MPTP (F (5, 41) = 7,877; P < 0,0001), enquanto que o *knockdown* de SENP3 igualou a latência dos animais com os demais grupos experimentais

Figura 17 – O *knockdown* de SENP3 não afeta a marcha de ratos no modelo do MPTP i.n.



O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste de pegadas. Salina foi utilizada como veículo. A) Quantificação e B) Imagem representativa do comprimento das passadas esquerda e direita. Os dados representam a média ± EPM de 7-8 animais por grupo.



O shSENP3 foi injetado no estriado dorsolateral de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados no teste do rotarod. Salina foi utilizada como veículo. Os dados representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. **P* < 0,0001 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.5 O *KNOCKDOWN* DE SENP3 DIMINUI NÍVEIS DE SENP3 E AUMENTA OS CONJUGADOS DE SUMO-2/3 NO EDL DE RATOS NO MODELO DO MPTP I.N.

A partir da terceira semana após a cirurgia estereotáxica, foi possível observar a expressão de GFP, indicando que a infecção pelo lentivírus foi eficiente (Figura 19). O *knockdown* de SENP3 promoveu diminuição nos níveis da proteína (F (4, 17) = 2,923; P < 0,05) (Figura 20A), assim como aumento dos conjugados de SUMO-2/3 (Figura 20B) (F (5, 15) = 18,47; P < 0,0001).



Figura 19 – Expressão de GFP por lentivírus para o *knockdown* de SENP3 no estriado dorsolateral de ratos

O diagrama (A) destaca o estriado dorsolateral e mostra o local de microinfusão. O sítio de infusão dos vírus está indicado nas fotomicrografías. B) Marcação com azul de Evans; B) Marcação com GFP; C) Marcação com GFP em maior aumento. Legenda: GFP, *green fluorescent protein*.



Figura 20 – O *knockdown* de SENP3 aumenta os níveis de conjugados de SUMO-2/3 no estriado dorsolateral de ratos no modelo do MPTP i.n.

O shSENP3 foi injetado no EDL de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Duas semanas depois foi realizada a administração i.n. de MPTP (2 mg/narina) e, uma semana depois, eles foram testados em testes comportamentais e eutanasiados por sobredose de anestésicos para coleta do EDL para análise por *Western blotting*. Salina foi utilizada como veículo. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SENP3 (A) e conjugados de SUMO-2/3 (B). β -actina foi utilizada como controle de carga. Os dados representam a média ± EPM de 4 animais por grupo. *P < 0,0001 quando comparados entre si pela ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

O presente Capítulo demonstra a importância da SUMOilação na patogênese da DP, em ambos os modelos *in vitro* e *in vivo* aqui utilizados.

A SUMOilação de proteínas tem sido vista em diferentes condições humanas, tanto com efeitos positivos como negativos. Tal divergência pode ser atribuída às diferentes isoformas da maquinaria da SUMOilação, logo, diferentes efeitos na DP podem ser observados. Aqui, realizamos o *knockdown* de SENP3 como uma forma de aumentar a SUMOilação de proteínas importantes da DP em modelos *in vitro* e *in vivo*

para investigar seu efeito. Seus efeitos protetores já foram relatados na defesa antiviral, câncer, senescência, entre outros (FAN et al., 2022; HAN et al., 2018; PRINCZ; TAVERNARAKIS, 2017). Especificamente efeitos neuroprotetores foram observados em modelos experimentais de isquemia cerebral, DA, DH e DP (SOARES et al., 2022; TAO et al., 2017; YANG; SHENG; WANG, 2016). Sugere-se que o aumento dos conjugados possa auxiliar a reestabelecer a função normal do SNC frente a danos ocasionados pela neurodegeneração, como visto por Yang e colaboradores (2015), mas isto não foi investigado em modelos da DP.

Mitocôndrias são conhecidas como a usina energética das células e são essenciais para a bioenergética e morte celular. Elas são formadas por uma membrana interna (MMI), que delimita a matriz mitocondrial e possui complexos proteicos utilizados para a respiração celular, e uma externa (MME), responsável pelo transporte de moléculas e íons (GIACOMELLO et al., 2020). Sua dinâmica envolve processos de fissão e fusão que alteram sua morfologia, tamanho e distribuição, cruciais para a correta função fisiológica (TILOKANI et al., 2018). A fissão é regulada por GTPases da família das dinaminas, como Drp1. A proteína é recrutada do citosol à MME, onde acopla-se no fator de fissão mitocondrial (Mff), uma proteína transmembrana da MEE, ou interage com a proteína de fissão 1 (Fis1), localizada em regiões de fissão, e forma um colar em torno da mitocôndria, causando uma constrição e divisão da organela (SCOTT; YOULE, 2010). Já a fusão acontece principalmente pelas mitofusinas (Mfn1 e Mfn2) e OPA1, onde OPA1 forma pontes proteicas entre as mitocôndrias que alinham-se e, pelo complexo formado com Mfn1 Mfn2, fusionam suas MMEs e, posteriormente, as MMI pela reorganização dos complexos proteicos e fusão dos lipídeos das membranas (GIACOMELLO et al., 2020; SCOTT; YOULE, 2010). Ambos os processos encontramse desregulados em diversas doenças, como a DP (CHAN, 2020).

A rotenona ocasiona mudanças na morfologia mitocondrial (DEHESHI et al., 2015) e, assim como Fang e colaboradores (2012) e Zhang e colaboradores (2020) observaram um aumento na fissão por Drp1 em células e ratos, respectivamente, a exposição de células H4 à rotenona em nosso estudo também aumentou os níveis de Drp1, enquanto que o *knockdown* de SENP3 não somente diminuiu estes níveis como recuperou os níveis de OPA1. A inibição de proteínas relacionadas à fissão tem sido sugerida como forma de neuroproteção contra danos causados por toxinas (FILICHIA et al., 2016; RAPPOLD et al., 2014). Conforme observado, a deSUMOilação de Drp1 induz o recrutamento da proteína para a MME e consequente fissão (GUO et al., 2017), porém

sua SUMOilação inibe a translocação e previne a liberação de citocromo c e morte celular (GUO et al., 2013), dados semelhantes aos aqui encontrados. A diminuição da fluorescência mitocondrial também pode estar relacionada com uma menor taxa de fissão, porém são necessárias análises em microscópio confocal para melhor visualização da morfologia mitocondrial. Como também observamos diminuição na intensidade relativa do IP, que se intercala ao DNA apenas de células com a membrana danificada, indicando diminuição da morte celular em 14 e 24 h pós exposição, sugerimos que a SUMOilação possui papel benéfico contra danos mitocondriais da rotenona.

O estresse oxidativo é uma das principais características bioquímicas na DP (UTTARA et al., 2009). Tudo é iniciado por radicais livres que medeiam a transferência de elétrons em diversos processos metabólicos, processo conhecido como oxidação. Funções fisiológicas são reguladas pelo equilíbrio entre os radicais livres e a capacidade do corpo de neutralizá-los, uma ação denominada de antioxidante (ALKADI, 2022). Eles são moléculas que captam elétrons de outras moléculas, por possuírem um número ímpar de elétrons, e que quando maiores do que o corpo consegue controlar, entram em desequilíbrio. Este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo e faz parte da patogênese de diversas doenças, como cânceres, doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica e doenças neurodegenerativas (PIZZINO et al., 2017; UTTARA et al., 2009).

Para conversão de oxigênio em água (respiração celular), elétrons advindos do dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina-adenina (FADH2) são inicialmente transferidos aos Complexos mitocôndriais I e II, chamados de NADH desidrogenase e succinato desidrogenase, respectivamente. Posteriormente eles são transferidos para os Complexos III e IV (citocromo bc1 e citocromo c oxidase, respectivamente). Tais elétrons criam um gradiente eletroquímico durante seu transporte pelos Complexos I, III e IV, por bombearem prótons (íons de hidrogênio) para fora da matriz mitocondrial, que é utilizado pelo Complexo V (ATP sintase) para finalmente produzir ATP (HIRST, 2013). O excesso na produção de elétrons gera estresse oxidativo, tendo como principais moléculas geradoras as EROS: hidroxila (OH–), oxigênio singlete (102), peróxido de hidrogênio (H2O2) e radicais superóxido (O2–). De acordo com a "Teoria do superóxido", esta última espécie é a origem e a responsável pela produção da maioria das EROS (INDO et al., 2015).

Nossos dados mostram um aumento na produção de superóxido pelas células quando expostas à rotenona. É sabido que a toxina aumenta a liberação de superóxido por

inibir o Complexo I (OCHI et al., 2016). Evidências apontam que a maior parte dos radicais superóxido é produzida no Complexo I, no momento da oxidação de succinato (Complexo II) devido a falta de inibidores da cadeia transportadora de elétrons (GRIVENNIKOVA; VINOGRADOV, 2006). Sua produção aumenta devido ao transporte reverso de elétrons, de succinato para NAD+, devido ao acúmulo de elétrons na cadeia respiratória, causado por déficit de oxigênio ou nos complexos proteicos mitocondriais. Estes elétrons são capturados pelo oxigênio e transformados em radicais superóxidos (BRAND et al., 2004). Apesar disso, o *knockdown* de SENP3 diminuiu a produção em 24 h após a exposição, reforçando o efeito antioxidante da SUMOilação presente na literatura: aumento da atividade de enzimas antioxidantes, diminuição dos níveis de EROs e peroxidação lipídica e regulação mitocondrial (GRAVES et al., 2020; GUERRA DE SOUZA; PREDIGER; CIMAROSTI, 2016; HASSANZADEH et al., 2022; WANG et al., 2021). Futuramente, são necessários estudos avaliando os níveis de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), no modelo aqui utilizado.

Toda esta cascata de eventos bioquímicos ocasiona deficits característicos de pacientes com a doença. Além do sofrimento para pacientes, cuidadores e familiares, a DP gera custos enormes que podem chegar a \$79 bilhões em 2037 só nos EUA (YANG et al., 2020). Surge, então, a necessidade de estudos que busquem atenuação dos sintomas e novas ferramentas terapêuticas. Como demonstrado previamente por nosso grupo (dados não publicados), a maquinaria da SUMOilação encontra-se desregulada no córtex pré-frontal, bulbo olfatório, estriado e hipocampo no modelo do MPTP i.n.. Restava saber como a manipulação dos níveis de SUMOilação afetaria os sintomas da doença neste modelo.

Um dos primeiros sintomas da DP é a disfunção olfatória, podendo surgir muitos ano antes dos demais sintomas, com prevalência de 95% entre os pacientes (HAEHNER; HUMMEL; REICHMANN, 2011). A causa não é totalmente elucidada mas acredita-se que o dano a sistemas não dopaminérgicos possa ter relação, além de que o bulbo olfatório seria uma das primeiras áreas cerebrais a ser afetada por CLs (BRAAK et al., 2003; DOTY, 2012). O transtorno depressivo maior, ou simplesmente depressão, é uma doença marcada por humor depressivo, diminuição nos interesses, distúrbios de apetite e sono e prejuízos na função cognitiva. A incapacidade de sentir prazer, chamada de anedonia, também é característica da depressão (COOPER; ARULPRAGASAM; TREADWAY, 2018). Sua causa não é clara e o tratamento inclui fármacos antidepressivos, psicoterapia

e eletroconvulsoterapia (LI et al., 2020; OTTE et al., 2016). A doença é comum em pacientes com DP e, embora os mecanismos que contribuem para seu desenvolvimento não estejam completamente elucidados, sugere-se que a diminuição nos níveis de neurotransmissores seja o estopim (MARSH, 2013). Embora não haja uma ligação direta da SUMOilação com a depressão, sabe-se que sua via é essencial para regular a função sináptica e liberação de neurotransmissores (JEOUNG et al., 2022; SCHOROVA; MARTIN, 2016). No teste de discrimanação olfatória, observamos que os animais dos grupos shSENP3, MPTP+Vetor vazio e MPTP+shSENP3 passaram mais tempo no compartimento não familiar, sugerindo que o MPTP prejudicou a função olfatória dos animais destes dois últimos grupos, sem efeito do knockdown. Apesar disso, animais que receberam apenas o MPTP mantiveram-se semelhantes ao grupo controle, enquanto que o grupo shSENP3 também preferiu o compartimento não familiar. No teste de preferência à sacarose, utilizado para avaliação de anedonia, não foram observadas diferenças significativas, sendo que trabalhos anteriores observaram comportamentos tipodepressivo em torno de 14 dias pós administração de MPTP (CASTRO et al., 2013; MOREIRA et al., 2010; SCHAMNE et al., 2018). Devido ao tempo de transdução lentiviral, não testamos um tempo maior do que 7 dias depois da administração da toxina em ambos os testes.

Prejuízos cognitivos leves (comprometimento cognitivo leve – CCL) surgem no estágio inicial da DP e progridem progressivamente à demência (demência da DP –

DPP) em um estágio avançado, o que diminui substancialmente a qualidade de vida (ARVANITAKIS; SHAH; BENNETT, 2019; BIUNDO; WEIS; ANTONINI, 2016). Dentre os mecanismos estão o comprometimento de substratos neuroquímicos de neurônio dopaminérgicos e colinérgicos e formação de CLs (FANG et al., 2020). Uma das formas de avaliar a função cognitiva *in vivo* é por meio de testes cognitivos. Aqui analisamos as memórias de reconhecimento e espacial. A memória de reconhecimento refere-se à capacidade de reconhecer pessoas, objetos e lugares vistos anteriormente (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; BARKER; WARBURTON, 2011). Em roedores, a curiosidade e a novidade impulsionam o comportamento exploratório (BERLYNE, 1950), e o teste de reconhecimento de objetos é amplamente utilizado para avaliar esta capacidade (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Já a memória espacial, que refere-se a informações sobre uma situação específica que permite com que haja orientação espacial e lembrança de lugares e objetos (LISMAN et al., 2017), foi investigada pela análise de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y, definidas

como o comportamento natural de roedores em alternar entre os braços do labirinto, lembrando quais braços já foram visitados (HUGHES, 2004). Em ambos os testes observou-se comprometimento cognitivo causado pelo MPTP e demonstrou-se, pela primeira vez, que o *knockdown* de SENP3 reverteu este comprometimento tanto na memória de reconhecimento quanto na memória espacial. O número de entradas nos braços do labirinto em Y, sem diferença significativa entre os grupos experimentais, valida o teste quanto a qualquer viés de mobilidade.

Estes achados vão ao encontro de trabalhos que implicam a SUMOilação na regulação de processos de aprendizado e memória (HSU et al., 2017), como visto por Castro-Gomez e colaboradores (2013), que observaram que a proteína de ligação ao CREB (proteína de ligação responsiva ao monofosfato cíclico de adenosina), CBP, essencial para a formação de memórias, é seletivamente SUMOilada durante o aprendizado espacial, e Yoo e colaboradores (2017), que mostraram que a diminuição da SUMOilação diminui o reconhecimento de objetos novos.

Além dos testes descritos anteriormente, os animais também foram avaliados em testes para a função motora, pois a progressão da DP é marcada por sintomas motores, como acinesia (imobilidade), bradicinesia (lentidão de movimentos), tremor e rigidez muscular e déficits na marcha, força de preensão e fala, entre outros (MOUSTAFA et al., 2016). Inicialmente, os animais foram testados no campo aberto, um teste amplamente utilizado para estudo do comportamento exploratório de roedores que pode indicar possíveis problemas locomotores e comportamentos tipo ansiosos. Apenas animais do grupo MPTP+Vetor vazio apresentaram diminuição na distância percorrida, velocidade média e número de entradas nos quadrantes periféricos, sem diferenças para os demais grupos. Assim, apenas MPTP em conjunto com o vetor vazio afetou a mobilidade dos animais (HUTTER-SAUNDERS; GENDELMAN; MOSLEY, 2012). Em seguida, como padrão ouro em estudos de comportamento motor de roedores, avaliamos o equilíbrio, coordenação motora e marcha dos animais (MEREDITH; KANG, 2006).

Observamos que a toxicidade induzida por MPTP aumentou o tempo de virada e tempo total para que os animais descessem da grade vertical. Kim e colaboradores (2010) demonstraram exatamente que camundongos que receberam MPTP via i.p. (20 mg/kg) gastaram mais tempo para a virada e tempo total no teste. Nossos resultados corroboram estes dados e, ainda mais importante, que o *knockdown* de SENP3 igualou os mesmos tempos com os grupos que não receberam MPTP, indicando um efeito benéfico contra o dano motor. Além disso, também analisamos o equilíbrio estático (repouso) e dinâmico (movimento) dos animais no teste de equilíbrio em barra (KHARATISHVILI et al., 2009), com maior latência para queda nos grupos MPTP e MPTP+Vetor vazio. Como a latência sobre o aparato não se modifica com a experiência (ALLBUTT; HENDERSON, 2007), realizamos três diferentes *trials*. Como observado, toxinas alteram o tempo de permanência no teste (HOU et al., 2017), e nossos dados, além de corroborarem estes achados, mostram pela primeira vez que o *knockdown* de SENP3 melhora o equilíbrio dos animais.

Para investigar se o knockdown também teria um efeito positivo na marcha e força motora dos animais, foram realizados os testes de pegada e rotarod, respectivamente. Autores demonstraram que, devido à administração unilateral de 6-OHDA, ratos desviam o lado do corpo não afetado pela toxina ao caminhar (MIKLYAEVA; MARTENS; WHISHAW, 1995; MUIR; WHISHAW, 1999). Apesar de alguns poucos estudos que analisam a passada dos animais em modelos com MPTP mostrarem déficits no comprimento das passadas, isto é, prejuízo na marcha (FERNAGUT et al., 2002; GOLDBERG et al., 2011), não observamos diferenças significativas no teste, o que não descarta a possibilidade de que um prazo maior pós administração do MPTP apresente danos significativos no comprimento da passada. Em contrapartida, pelo teste do rotarod verificou-se que a toxicidade induzida pelo MPTP prejudicou a coordenação, força motora e equilíbrio. Considerando que, sabidamente, o MPTP prejudica tais parâmetros, possivelmente pela perda gradual de dopamina que afeta neurônios motores (AYTON et al., 2013; ROZAS et al., 1998), e que afeta negativamente os níveis de proteínas SUMO e proteínas associadas (JUNQUEIRA, 2020), o knockdown de SENP3 conseguiu reverter estes prejuízos, evidenciando a importância da SUMOilação na prevenção de danos motores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Modelos animais da DP estão correlacionados com a sintomatologia clássica da doença. Além de exibirem déficits pré-motores e motores, também é possível observar como a doença progride de forma celular. Nossos dados demonstram pela primeira vez a importância do aumento da SUMOilação para impedir a progressão da doença, especialmente em relação à disfunção mitocondrial *in vitro* e sintomas *in vivo*. Devido à falta de tratamentos mais efetivos, sugerimos aqui a SUMOilação como uma nova e promissora ferramenta para a doença.

Capítulo III – Investigação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre a memória de ratos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MEMÓRIA

A memória é uma função cognitiva complexa e essencial que nos permite armazenar e recordar informações sobre nossas experiências, pensamentos e emoções. É fundamental no nosso cotidiano, permitindo-nos aprender novas habilidades, compreender o ambiente ao nosso redor e nos comunicar com os outros (AMADIO, 2004). A formação da memória começa com um evento que é selecionado, codificado, consolidado e armazenado. A memória consolidada pode ser evocada e também pode ser retida por períodos mais longos ou curtos (Figura 1) (NADEL et al., 2012).

No entanto, a memória armazenada pode sofrer alterações, sendo aprimorada ou prejudicada, e precisa ser reconsolidada para permanecer (Figura 1). Durante a consolidação, as memórias podem ser afetadas por fatores como emoções, liberações de hormônios, como cortisol e adrenalina, outras memórias e outras substâncias que afetam o SNC, direta ou indiretamente (MOYANO et al., 2019; NADEL et al., 2012).



Figura 1 – Fases de formação de memórias

Memórias são formadas pela seleção e codificação de informações, que são posteriormente consolidadas e armazenadas no cérebro. Elas podem ainda ser reconsolidadas ou extintas.

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Neuroquímica e Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenados pela Profa. Dra. Helena Cimarosti e Prof. Dr. Rui Daniel Prediger, respectivamente, e Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Daniel Mansur.

Lent e colaboradores (2010) propõe classificar a memória com base no tempo de armazenamento (ultrarrápida, curto prazo e longo prazo) e em sua natureza (explícita, implícita ou de trabalho). Vale ressaltar que tais categorias são principalmente para fins didáticos, pois diferentes tipos de memória são operados por diferentes regiões cerebrais e mecanismos.

1.1.1 Memória de trabalho

A memória de trabalho é responsável por contextualizar e gerenciar informações, com uma duração ultrarrápida e capacidade limitada. Sua duração é ultrarrápida porque permite armazenar informações enquanto estamos realizando uma determinada atividade, como decorar um número para digitar logo em seguida, e quando essa informação deixa de ser útil ela é descartada (BADDELEY, 2010). Baddeley e Hitch (1974) dividem a memória de trabalho em quatro componentes principais: executivo central (atenção), esboço visuoespacial (gerenciamento e armazenamento temporário de informações a partir de imagens), alça fonológica (gerenciamento e armazenamento temporário de informações a partir de sons) e retentor episódico (gerenciamento de informações já arquivadas no cérebro).

Além de armazenar informações durante o processamento, a memória de trabalho é fundamental para comparar novas informações com as antigas já consolidadas e armazenadas na memória de longo prazo. É por meio dessa memória que conseguimos gerenciar informações contidas na memória de longo prazo, evocando-as de maneira sequencial e ordenada, permitindo produzir ideias de forma coerente com a realidade. No entanto, a memória de trabalho não deve ser confundida com a memória de longo prazo, pois esta última armazena uma grande quantidade de informações, enquanto a memória de trabalho leva e traz essas informações, ajudando a gerenciar o que permanece e o que deve ser descartado (ALLOWAY; COPELLO, 2013).

Em relação ao mecanismo responsável pela evocação das memórias, sabe-se que está relacionado com o córtex pré-frontal e que a dopamina é um neurotransmissor importante nesse processo.

1.1.2 Memória de Longa Duração

A memória de longa duração (MLD) é responsável por armazenar informações por meses ou anos, podendo manter-se por tempo indeterminado desde que reforçada de tempos em tempos (COWAN, 2008). Pode ser dividida em memória declarativa (ou explícita), que são memórias acessíveis e que podem ser evocadas através de palavras, relacionadas à capacidade de coletarmos conscientemente significados, fatos e eventos, e memória não-declarativa (ou implícita), que correspondem a memórias que estão no subconsciente e são evocadas por ações, relacionadas a habilidades motoras, hábitos, sentimentos e sensações (REBER, 2008).

A memória declarativa pode ainda ser subdividida em episódica, relacionada a experiências vividas em um determinado momento, e semântica, relacionada a fatos (como o significado de palavras, regras gramaticais, conhecimentos adquiridos em matérias, etc.) (EICHENBAUM, 2001). Essa subdivisão acontece porque ambas as memórias parecem atuar em diferentes áreas cerebrais, tanto que há casos de pacientes com déficit de memória episódica sem prejuízos na memória semântica.

Para armazenar grande quantidade de informação, o cérebro precisa passar por modificações estruturais (morfológicas) e sinápticas (funcionais). Esta é a fase de consolidação da memória, um processo que dura de três a oito horas, sendo passível de sofrer modificações neste período, ficando suscetível à interferência de drogas, outras memórias, hormônios (como catecolaminas e glicocorticoides) ou neurotransmissores (como dopamina e acetilcolina) (ALVES; BUENO, 2017; ROOZENDAAL, 2002; SQUIRE et al., 2015). Além das perdas durante o processo de consolidação, sempre que uma memória é evocada ela é mais uma vez modificada, afinal a evocação é um processo de edição de fragmentos, organizados pela memória de trabalho e pelas funções executivas, para tentar formar informações coerentes (ROXIN; FUSI, 2013).

Grandes e importantes achados sobre as áreas cerebrais envolvidas com memória e aprendizado são derivadas de um estudo envolvendo o paciente H.M. (Henry Molaison – 1926-2008), submetido a uma cirurgia de remoção bilateral do seu lobo temporal medial que inclui o hipocampo e amigdala. A cirurgia melhorou sua epilepsia, mas resultou em uma amnésia anterógrada com perda parcial da memória para eventos que ocorreram na década precedente à operação (MLD), porém memórias de eventos remotos não foram afetados, isto é, a memória de trabalho (REBER, 2008).

Um estudo de fMRI (ressonância magnética funcional) mostrou que a evocação de memórias episódicas ativa o córtex pré-frontal medial e outras áreas corticais, enquanto a evocação de memórias semânticas ativa principalmente o córtex temporal medial (SQUIRE et al., 2015). Outros estudos indicam que o hipocampo e o córtex entorrinal também desempenham um papel importante na evocação de memórias, especialmente memórias episódicas.

Além disso, a plasticidade sináptica parece ser fundamental para a formação e consolidação de MLD. A ativação repetida de uma determinada rede neural leva a mudanças estruturais e funcionais nas sinapses envolvidas, tornando-as mais eficientes na transmissão de informações (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993). Essa plasticidade sináptica é mediada por processos conhecidos como potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), que envolvem a modificação da força das sinapses através da regulação de receptores de neurotransmissores e de canais iônicos.

A MLD depende da interação entre várias regiões cerebrais, incluindo o hipocampo, o lobo temporal medial e o neocórtex. O hipocampo está conectado ao córtex entorrinal através da via perforante, o que o torna crucial para o processamento de informações (Figura 2). O modelo proposto por BUZSÁKI (1989) descreve como as células granulosas do giro denteado recebem estímulos do córtex entorrinal na primeira fase, enquanto as células piramidais nas regiões do Corno de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3) são relativamente quiescentes. Na segunda fase, a atividade das células granulares diminui e é substituída pela atividade das células piramidais em CA1 e CA3, que transmitem seu estímulo de saída para o córtex entorrinal. A integridade do giro denteado é fundamental para o processo de codificação, e a fase de consolidação requer a comunicação entre o hipocampo e o córtex entorrinal (RIEDEL; MICHEAU, 2001).



Figura 2 – Transmissão da informação por meio da formação hipocampal

O córtex entorrinal faz a ativação hipocampal por meio da transmissão da informação pela VP até o GD (em preto). Fibras musgosas (em azul) conectam-se com as células piramidais de CA3 (em verde) que, por sua vez, conectam-se com CA1 (em laranja) pela VcS. Legenda: CA, corno de Ammon; GD, giro denteado; VcS, via colateral de Schafer; VP, via perforante. Adaptado de Neves et al. (2008).

Além da memória declarativa, é importante destacar a existência da memória não declarativa, que inclui o condicionamento, a memória motora e o *priming*. O condicionamento envolve a associação de estímulos ou comportamentos com recompensas ou punições, sendo fundamental para o processo de aprendizagem (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). A memória motora está relacionada a habilidades motoras e procedimentos, e requer repetições para ser consolidada. Uma vez consolidada, esta memória se torna automática e resistente à extinção. As principais regiões cerebrais envolvidas são o cerebelo e os núcleos da base (corpo estriado) (KEISLER; SHADMEHR, 2010; KRAKAUER; SHADMEHR, 2006). O *priming* é um tipo de memória induzido por pistas ou dicas (estímulos). Acredita-se que o *priming* visual esteja relacionado aos neurônios do córtex occipital (área visual primária), enquanto o *priming* auditivo esteja relacionado aos neurônios do lobo temporal (área auditiva primária) (LEVY; STARK; SQUIRE, 2004).

Em resumo, a MLD é um processo complexo que envolve a interação entre diversas áreas cerebrais, incluindo o hipocampo, o córtex entorrinal e o neocórtex. A formação e evocação de memórias também dependem da plasticidade sináptica e de processos como LTP e LTD. Embora haja muito a ser descoberto sobre a memória de

longa duração, os estudos realizados até o momento têm fornecido informações valiosas sobre seu funcionamento e as áreas do cérebro envolvidas. Diversos estudos buscam entender sobre os diferentes tipos de memória e seus mecanismos. Aqui focamos em analisar a memória de reconhecimento e a memória espacial.

1.2 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO

A memória de reconhecimento é um componente crucial da memória declarativa episódica e refere-se à capacidade de reconhecer pessoas, objetos e lugares vistos anteriormente (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; BARKER; WARBURTON, 2011). Em roedores, a curiosidade e a novidade impulsionam o comportamento exploratório (BERLYNE, 1950) e o teste de reconhecimento de objetos é amplamente utilizado para avaliar essa capacidade inata sem depender de um sistema de recompensa (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Estudos em pacientes têm demonstrado que lesões no lobo temporal medial, especialmente no hipocampo, afetam negativamente a memória episódica (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002; EICHENBAUM, 2013). Imagens *in vivo* durante a fase de codificação e recuperação demonstraram que o córtex pré-frontal, córtex retroesplenial, córtex parietal e regiões adjacentes ao hipocampo, também desempenham papéis importantes na formação e recuperação da memória episódica (SCHOTT et al., 2011, 2013).

O córtex entorrinal, localizado no lobo temporal medial, é fundamental para o reconhecimento de objetos anteriormente vistos e lesões nessa área podem prejudicar essa capacidade (NYAKAS et al., 2009; SALIMI et al., 2022b). Ele é responsável por manter informações espaciais no armazenamento da memória, sendo essencial para o reconhecimento de objetos em situações mais complexas, como com objetos diferentes (CHAO et al., 2020). Estudos eletrofisiológicos também identificaram a presença de neurônios responsáveis pela codificação da memória nesta área em primatas (BROWN; WARBURTON; AGGLETON, 2010). Quando o córtex entorrinal é inativado utilizando o bloqueador de canal de cálcio lidocaína, como demonstrado por Winters e Bussey (2005), os animais não conseguem reconhecer os objetos testados, enfatizando a importância dessa estrutura na consolidação e evocação da memória.

O hipocampo dorsal (HD) está envolvido na consolidação e recuperação da memória, com alta atividade na região CA1 durante o reconhecimento de objetos (COHEN et al., 2013). A fase de consolidação também está relacionada com o aumento

da eficácia sináptica no hipocampo (CLARKE et al., 2010). Percebe-se que diversas áreas do cérebro estão envolvidas na memória de reconhecimento, principalmente o córtex entorrinal e o HD.

Em roedores, o teste de reconhecimento de objetos é empregado para avaliar a memória de reconhecimento. O teste envolve a exposição a dois objetos idênticos em locais diferentes e, após um período pré-determinado, os animais são reexpostos ao ambiente com um dos objetos substituído por um novo. Normalmente, os animais têm preferência por explorar o novo objeto (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; FERNANDES et al., 2018). O teste é bastante utilizado para avaliação da ação de drogas ou prejuízo cognitivo.

Algumas estratégias farmacológicas podem ser utilizadas para avaliar vias que influenciem a memória de roedores, como bloqueio do receptor de NMDA, relacionado a mecanismos de plasticidade sináptica e formação de memórias (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007; MARTIN; MORRIS, 2002). Além deste, antagonistas do receptor de ácido propriônico α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazo (AMPA) diminui o reconhecimento de objetos, estando envolvido na codificação de informações (WINTERS; BUSSEY, 2005). Além disso, a administração de agonistas do receptor nicotínico colinérgico (nAChR) aumenta a memória de reconhecimento em roedores (WALLACE; PORTER, 2011). Outra estratégia farmacológica é a administração de agonistas de receptores de canabinóides, que parece aumentar a memória de reconhecimento (MARTÍN-MORENO et al., 2011).

1.3 A VIA COLINÉRGICA E A MEMÓRIA

A via colinérgica inicia-se com a síntese de acetilcolina (ACo) nos terminais nervosos, a partir de colina e acetil-coenzima A. A colina acetiltransferase é responsável pela catalisação da síntese de ACo, tornando-a disponível para interação com seus receptores pré e pós-sinápticos. Por sua vez, a acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor, hidrolisando-o em colina e acetato (CHEN et al., 2022).

A ACo pode se ligar em receptores colinérgicos nicotínicos (ionotrópicos) e muscarínicos (metabotrópicos), sendo esse sistema composto por três grupos principais de neurônios: 1) neurônios do sistema motor, como os motoneurônios da medula espinhal, 2) neurônios colinérgicos estriatais, que participam do controle motor extrapiramidal, e 3) neurônios da coluna colinérgica rostral do prosencéfalo basal, que projetam axônios ao hipocampo e estão relacionados com a memória (CHEN et al., 2022). O sistema colinérgico muscarínico parece estar relacionado com um efeito modulatório sobre a memória, conforme apontado por Segal e Auerbach (1997). A hipótese colinérgica sugere que uma alta concentração de ACo facilitaria a aquisição de novas memórias, enquanto uma baixa concentração a dificultaria. Na DA, pacientes apresentam degeneração de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e o nível de demência está relacionado com a perda sináptica entre o prosencéfalo basal e o hipocampo e córtex (BOWEN et al., 1976). A utilização de fármacos agonistas e antagonistas colinérgicos é uma forma de modular esta via e alterar a memória.

1.4 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA VIA COLINÉRGICA

1.4.1 Escopolamina

A escopolamina é um fármaco que atua como um antagonista não seletivo do receptor muscarínico, afetando negativamente o aprendizado em roedores. Seu efeito é mediado pelos subtipos de receptores muscarínicos M1 e M5 (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010).

Suas vias de administração variam entre oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, ocular e transdérmica. A absorção pela via oral e subcutânea é rápida e atinge a concentração plasmática máxima em 30 minutos quando administrada pela via oral (EBERT; OERTEL; KIRCH, 2000; RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005). Pela via intravenosa, observou-se um efeito amnésico em 10 minutos que persiste até 120 min. Ela atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizada pelo figado, sendo excretada pela urina com meia-vida de eliminação de 9,5 horas (AHFS, 2011).

Clinicamente, a escopolamina é utilizada para o tratamento de náusea e êmese (PERGOLIZZI et al., 2012), inibição da motilidade do trato gastrointestinal, como na síndrome do intestino irritável e disenteria (AHFS, 2011), e também era usada no tratamento da DP (FAHN, 2015). Ela reduz os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), essencial para o processo de codificação da memória e para a plasticidade sináptica (HAFEZ et al., 2017), e do fator de transcrição CREB, relacionado à regulação da expressão de BDNF. Além disso, ela também contribui para o estresse oxidativo por meio do aumento dos níveis de peroxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) no cérebro (GOVERDHAN; SRAVANTHI; MAMATHA, 2012; RAHIMZADEGAN; SOODI, 2018).

A escopolamina é amplamente utilizada como um modelo para causar danos neurológicos em roedores, relacionados com prejuízo na consolidação da memória e esquecimento. Ratos de 8 e 16 meses de idade apresentaram prejuízos na memória de trabalho devido ao tratamento com escopolamina, administrada antes ou depois do treino de memória. Em ambos os casos, os animais apresentaram um prejuízo significativo na consolidação da memória, levantando a hipótese de que a diminuição da neurotransmissão colinérgica contribui para os déficits de memória relacionados à idade (BIGGAN; INGLES; BENINGER, 1996). Seus efeitos no prejuízo da memória foram vistos em testes como reconhecimento de objetos e labirinto em Y (KIM et al., 2021; OLAYINKA et al., 2022; PARK et al., 2021; SALIMI et al., 2022a). Quando infundida no córtex perirrinal, ela ocasionou prejuízos na memória de reconhecimento (ABE; ISHIDA; IWASAKI, 2004), e quando administrada por via i.p. ela diminui o aprendizado espacial (LAMBERTY; GOWER, 1991). Tais estudos evidenciam a escopolamina como um modelo eficaz para avaliar déficit cognitivo em roedores tanto na memória de reconhecimento como espacial.

1.5 JUSTIFICATIVA

O déficit cognitivo afeta uma variedade de funções mentais, como memória, atenção, concentração, linguagem e habilidades motoras. Doenças neurodegenerativas e neurológicas são as principais causas de déficit cognitivo por causar danos neuronais que levam a um declínio cognitivo progressivo (GÓMEZ-GÓMEZ; ZAPICO, 2019). Apesar dos avanços, o tratamento depende da causa subjacente e são paliativos, reforçando a necessidade de estudos focados no reestabelecimento da função cognitiva.

A SUMOilação é importante para os processos de formação e manutenção de memórias. Sabe-se, por exemplo, que proteínas SUMO regulam a transmissão sináptica, por meio da SUMOilação da proteína associada ao citoesqueleto (Arc), envolvida na regulação da plasticidade sináptica (CRAIG; HENLEY, 2012), e que a SUMOilação de CREB pela ligase PIAS1 melhora a memória espacial de ratos (CHEN et al., 2014). Apesar de tais achados, são poucos os estudos que se propõem a investigar o efeito neuroprotetor da SUMOilação em modelos de declínio cognitivo.

1.6 HIPÓTESE

Com base no exposto anteriormente, a hipótese deste Capítulo é de que o aumento da SUMOilação previne déficits cognitivos causados pela escopolamina.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o efeito do *knockdown* de SENP3 nas memórias de reconhecimento e espacial no modelo de escopolamina para déficit cognitivo.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar os níveis das proteínas SENP3 e SUMO-2/3 no HD de ratos;
- Avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3 na performance de ratos tratados com escopolamina nos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC (nº 9607211022) (Anexo B) e seguiu os princípios dos 3Rs, como explicado na seção 3.2.1 do Capítulo II desta Tese.

3.2 ANIMAIS

Os animais utilizados, sua procedência e condições de alojamento estão explicados na seção 3.2.2 do Capítulo II desta Tese.

3.3 LENTIVÍRUS E CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os procedimentos adotados para o shSENP3, bem como para a cirurgia estereotáxica, estão detalhados na seção 3.2.3 do Capítulo II desta Tese. As coordenadas adotadas para o HD (-3,6 mm anterior ao bregma, \pm 2,4 mm relativo ao eixo lateral e -2,1 mm relativo ao eixo dorsoventral) foram definidas de acordo com o atlas do cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 2006).

3.4 ESCOPOLAMINA

Para a realização deste estudo utilizou-se escopolamina (Sigma-Aldrich, EUA), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Leandro Bertoglio do Departamento de Farmacologia da UFSC. A mesma foi diluída em PBS, com concentração final de 1 mg/kg administrada diariamente via i.p., por 4 dias antes dos testes comportamentais. Como veículo utilizouse PBS.

3.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Três semanas após a infusão do lentivírus para o *knockdown* de SENP3, e após as quatro administrações de escopolamina, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da função cognitiva. Os detalhes da sala de experimentação e procedimentos estão detalhados na seção 3.2.5 do Capítulo II desta Tese.

3.5.1 Campo aberto

Descrição detalhada do teste na seção 3.2.2.5 do Capítulo II desta Tese.

3.5.2 Reconhecimento de objetos

Descrição detalhada do teste na seção 3.2.5.3 do Capítulo II desta Tese.

3.5.3 Labirinto em Y

Descrição detalhada do teste na seção 3.2.5.4 do Capítulo II desta Tese.

3.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Ao fim dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos (cetamina – 200 mg/kg e xilazina – 30 mg/kg), via i.p., e os encéfalos dissecados para coleta do HD.

3.6.1 Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica do HD, seguiu-se o mesmo protocolo detalhado na seção 3.2.6.1 do Capítulo II desta Tese.

3.6.2 Western blotting

Detalhes a respeito do procedimento de lise das amostras, dosagem de proteínas e Western blotting encontram-se na seção 3.3.1 a 3.3.3 do Capítulo I desta Tese. Foram utilizados os seguintes anticorpos: SUMO-1 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology), SUMO-2/3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology), SENP3 *rabbit* (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-*Rabbit* (1:5.000) e anti-*Mouse* (1:5.000). Como controle de carga utilizou-se β -actina *mouse* (1:10.000).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov– Smirnov. Para comparação de dois grupos utilizou-se o teste *t* de Student e para três ou mais grupos utilizou-se a ANOVA de uma ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados estão expressos como média \pm EPM e os valores de *P* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do software GraphPadPrism® versão 6.0 (San Diego, EUA).

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental deste Capítulo está exemplificado na Figura 3.

3.8.1 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre os níveis de SENP3, conjugados de SUMO-2/3.

Para investigar os efeitos do *knockdown* de SENP3 na imunomarcação das proteínas SENP3 e SUMO-2/3, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no HD. Três semanas após, e quatro dias antes dos testes comportamentais, os animais receberam escopolamina (1 mg/kg) via i.p., diariamente por 4 dias. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos e tiveram seus encéfalos dissecados para coleta do HD. Este por sua vez foi lisado para imunomarcação pela técnica de *Western blotting* para as proteínas anteriormente citadas.

3.8.2 Avaliação do efeito do *knockdown* de SENP3 sobre as memórias de reconhecimento e espacial de ratos tratados com escopolamina

Para investigar os efeitos do knockdown de SENP3 sobre a função cognitiva, ratos Wistar entre 90-120 dias de idade foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração de lentivírus contendo o shSENP3 no HD. Três semanas após, e quatro dias antes dos testes comportamentais, os animais receberam escopolamina (1 mg/kg) via i.p., diariamente por 4 dias. Os animais foram avaliados nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto em Y.

Figura 3 – Delineamento experimental para investigação do *knockdown* de SENP3 sobre as memórias de reconhecimento e espacial de ratos tratados com escopolamina



O shSENP3 foi injetado no HD de ratos por cirurgia estereotáxica. Três semanas depois, e quatro dias antes dos testes comportamentais, os animais foram tratados com escopolamina (1 mg/kg), por quatro dias diariamente e foram testados nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto em Y. Por fim, foram eutanasiados por sobredose de anestésico para coleta do HD, o qual foi processado para a técnica de Western blotting para imunomarcação de SENP3 e SUMO-2/3. Fonte das imagens: BioRender.com. Legenda: HD, hipocampo dorsal; kg, quilograma; mg, miligrama; SENP3, protease SUMO específica 3; sh, *short hairpin*.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO *KNOCKDOWN* DE SENP3 NA LOCOMOÇÃO ESPONTÂNEA DOS ANIMAIS

Como mostra a Figura 4, a atividade locomotora espontânea dos animais, avaliada pelo teste do campo aberto, não teve diferenças significativas nos parâmetros de distância total percorrida (A), velocidade média (B) e número de entradas nos quadrantes periféricos (D). Em comparação com o grupo salina, os grupos escopolamina, escopolamina + Vetor vazio e escopolamina + shSENP3 entraram menos vezes nos quadrantes centrais do campo aberto (C) (F (5, 42) = 5,258; P < 0,0008).



Figura 4 – O knockdown de SENP3 não afeta a locomoção espontânea de ratos Wistar

O shSENP3 foi injetado no hipocampo dorsal de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Três semanas depois, e após 4 administrações de escopolamina (1 mg/kg) via i.p, eles foram testados no campo aberto. Salina foi utilizada como veículo. A) Distância total percorrida; B) Velocidade média; C) Número de entradas nos quadrantes centrais; e D) Número de entradas nos quadrantes periféricos. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. **P* < 0,0008 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.2 EFEITO DO *KNOCKDOWN* DE SENP3 NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DOS ANIMAIS

A memória de reconhecimento foi testada no teste de reconhecimento de objetos. Na seção de treino (Figura 5A), todos os grupos investigaram ambos os objetos familiares. Na seção de teste (Figura 5B), na ANOVA de duas vias mostrou haver diferença significativa nos grupos escopolamina e escopolamina + Vetor vazio (F (5, 35) = 4,220; P < 0,004), enquanto que os grupos vetor vazio, shSENP3 e escopolamina + shSENP3 mantiveram-se semelhantes ao grupo salina.





O shSENP3 foi injetado no hipocampo dorsal de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Três semanas depois, e após 4 administrações de escopolamina (1 mg/kg) via i.p, eles foram testados no teste de reconhecimento de objetos. Salina foi utilizada como veículo. A) Seção de treino: animais eram apresentados a dois objetos idênticos; B) Seção de teste: um dos objetos idênticos era trocado por um diferente. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. *P < 0,0008 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pósteste de Newman-Keuls.

4.3 EFEITO DO KNOCKDOWN DE SENP3 NA MEMÓRIA ESPACIAL DOS ANIMAIS

A memória espacial foi testada no teste do labirinto em Y. Não foram observadas diferenças no número de entradas nos três braços do labirinto (Figura 6A). Já o número de alternâncias espontâneas entre os braços (Figura 6B) foi reduzida significativamente nos grupos tratados com escopolamina (F (5, 41) = 3,194; P < 0,01), enquanto que o grupo escopolamina + shSENP3 manteve-se semelhante aos grupos sem escopolamina.


Figura 6 – O *knockdown* de SENP3 protege a memória espacial contra danos cognitivos induzidos por escopolamina em ratos

O shSENP3 foi injetado no hipocampo dorsal de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Três semanas depois, e após 4 administrações de escopolamina (1 mg/kg) via i.p, eles foram testados no teste do labirinto em Y. Salina foi utilizada como veículo. A) Número de entradas nos braços do labirinto; B) Porcentagem de alternâncias espontâneas nos braços do labirinto. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. **P* < 0,01 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.4 EFEITO DO KNOCKDOWN DE SENP3 NOS NÍVEIS DE SENP3 E SUMO-2/3

A partir da terceira semana após a cirurgia estereotáxica, foi possível observar a expressão de GFP, indicando que a infecção pelo lentivírus foi eficiente (Figura 7). A análise dos níveis de SENP3 no HD dos animais mostrou que o *knockdown* diminuiu os níveis de SENP3 (F (5, 18) = 2,907; P < 0,04) e aumentou os níveis dos conjugados de SUMO-2/3 (F (5, 15) = 9,428; P < 0,0003) (Figura 8A e B, respectivamente) em comparação com os grupos tratados com escopolamina.



Figura 7 – Expressão de GFP por lentivírus para o *knockdown* de SENP3 no hipocampo dorsal de ratos.

O diagrama (A) destaca o hipocampo dorsal e mostra o local de microinfusão. O sítio de infusão dos vírus está indicado nas fotomicrografias. B) Marcação com DAPI e C) Marcação com GFP.



Figura 8 – O *knockdown* de SENP3 aumenta os níveis de conjugados de SUMO-2/3 no hipocampo dorsal de ratos tratados com escopolamina

O shSENP3 foi injetado no hipocampo dorsal (HD) de ratos Wistar machos de 90-120 dias de idade, por cirurgia estereotáxica. Como controle utilizou-se um vetor vazio. Três semanas depois, e após 4 administrações de escopolamina (1 mg/kg) via i.p., eles foram testados em testes comportamentais e eutanasiados por sobredose de anestésicos para coleta do HD para análise por *Western blotting*. Salina foi utilizada como veículo. Quantificação e imagem representativa dos níveis de SENP3 (A) e conjugados de SUMO-2/3 (B). β -actina foi utilizada como controle de carga Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais por grupo. **P* < 0,0003 quando comparados entre si pela ANOVA de duas vias seguida do pósteste de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram que o aumento da SUMO-2/3-ilação por meio do *knockdown* de SENP3 protege ratos contra déficits cognitivos causados por escopolamina.

Diversos fatores afetam a memória, como ansiedade, estresse, distúrbios do sono, drogas de abuso e envelhecimento. Doenças neurodegenerativas, como DA, DP e DH, levam pacientes a desenvolverem demência, caracterizada por declínio cognitivo avançado, especialmente perda de memória, com expectativa de que o número de casos chegue a 131 milhões em 2050 (ARVANITAKIS; SHAH; BENNETT, 2019). Além de todos os custos e desafios para pacientes e cuidadores, o tratamento, que utiliza principalmente inibidores da colinesterase, possui efeitos colaterais e baixa efetividade (LIVINGSTON et al., 2020; OVERSHOTT; BURNS, 2005). Urge, assim, a necessidade de maior compreensão de como impedir o declínio cognitivo devido a progressão das doenças já mencionadas.

O primeiro estudo a revisar a importância da SUMOilação nos processos de aprendizado e memória foi publicado em 2013 por Castro-Gomez e colaboradores (2013). O CBP, um coativador transcricional específico com atividade de histona acetiltransferase (HAT), bem como a proteína de ligação associada ao adenovírus E1A (p300) e o fator associado ao CBP/p300 (PCAF) (MAURICE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011), são essenciais para a formação de memória (CHEN et al., 2010). Avaliando os níveis de CBP/p300, SUMO-1 e conjugação SUMO-1-CBP em ratos Wistar machos de 12 semanas de idade, os autores investigaram a influência da SUMOilação de CBP no aprendizado espacial por meio de um protocolo de treinamento de 3 dias no teste do labirinto aquático. Observou-se SUMOilação de CBP significativa sem alterações nos níveis de CBP ou SUMO-1 livre, sugerindo que o CBP é seletivamente deSUMOilado. Apenas o promotor Arc/Arg3.1, um gene implicado na plasticidade sináptica e LTP (PENG et al., 2010), foi altamente SUMO-1-ilado em animais naïve quando comparados com os animais treinados, sugerindo uma forte ligação específica de SUMO-1 no promotor Arc/Arg3.1. Na ausência de aprendizado, este promotor pode ser reprimido especificamente por conjugados SUMO-1. Em relação à função de CBP, foi observada uma regulação negativa específica por SUMO-1, mostrando que seu efeito sobre as mudanças epigenéticas é desencadeado pelos processos de aprendizado e memória espaciais. Apesar disso, poucos estudos se propõem a investigar o papel da SUMOilação nos diversos tipos de memória.

Para avaliar o efeito do *knockdown* de SENP3, tendo em vista o aumento de SUMOilação, no déficit cognitivo, ratos Wistar foram tratados durante 4 dias com escopolamina na dose de 1 mg/kg. Autores previamente demonstraram que tal dose é capaz de prejudicar a aquisição e consolidação da memória no teste de esquiva inibitória e induzir estresse oxidativo (BUDZYNSKA et al., 2015), prejudicar a memória espacial no teste do labirinto aquático (DE CAMPOS et al., 2023), provocar efeito amnésico no teste de reconhecimento e objetos, inibir a neurogênese hipocampal e causar peroxidação

lipídica (BHUVANENDRAN et al., 2018), mesmo administrada em um curto período de tempo.

Apesar de não ser um teste para avaliação de memórias, o campo aberto é amplamente utilizado para estudo do comportamento exploratório de roedores e pode indicar possíveis problemas locomotores. Além disso, também é utilizado para avaliar comportamentos do tipo ansioso. Por meio da cirurgia estereotáxica, é possível acessar diversas áreas cerebrais. A técnica permite entender como cada estrutura cerebral funciona e quais suas implicações em algumas desordens, além de ser possível realizar manipulações farmacológicas diretas. Porém, a lesão proveniente de agulhas ou cânulas no encéfalo pode acarretar em prejuízos na função locomotora dos animais. Estudos já demonstraram que a cirurgia pode diminuir a locomoção, aumentar comportamentos dos tipos ansioso e depressivo, prejudicar habilidades motoras finas, equilíbrio e coordenação (FERRY; GERVASONI, 2021; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2017). Devido a isso, antes da avaliação da memória os animais foram observados no campo aberto afim de excluir quaisquer vieses da estereotaxia. Não foram encontradas diferenças nos parâmetros de distância percorrida e velocidade média, indicando não haver problemas locomotores nos animais utilizados. Em geral o próprio teste pode causar ansiedade nos animais devido ao medo de ambientes desconhecidos e isolamento social, gerando estresse e uma tendência em manterem-se próximos às paredes da arena como forma de proteção, o que pode explicar o porquê do menor número de entradas nos quadrantes centrais do teste já que o número de entradas nos quadrantes periféricos não apresentou diferenças (NORDQUIST et al., 2017).

Corroborando estudos prévios (BUDZYNSKA et al., 2015; YADANG et al., 2020), a escopolamina utilizada no presente modelo ocasionou prejuízo na memória de reconhecimento de objetos. Ao mesmo tempo, o *knockdown* de SENP3 evitou que houvesse prejuízo desta memória, mantendo a taxa de investigação do objeto novo muito semelhante aos demais grupos que não foram tratados com o fármaco. Para entender como a SUMOilação afeta memórias, já que ela pode modificar fatores de transcrição relacionados à memória, Wang e colaboradores (2014) avaliaram a performance de camundongos *knockout* para SUMO-1-3 nos testes do campo aberto, reconhecimento de objetos e condicionamento aversivo contextual. Em resposta ao silenciamento da SUMOilação, os camundongos exibiram comportamentos do tipo ansioso e prejuízo nas memórias episódicas e de medo, mostrando que as proteínas SUMO são essenciais para

a memória. De forma semelhante, mostramos que o aumento da SUMOilação consegue proteger o cérebro contra prejuízos na memória de reconhecimento.

Com o objetivo de investigar os efeitos de SUMO-1 nas funções do hipocampo e na neurogênese hipocampal, por meio do reconhecimento de objetos, Yoo e colaboradores (2017) construíram uma proteína de transdução de fusão Tat (transativador da transcrição) SUMO 1, para diminuir a SUMOilação. Camundongos machos C57BL/6 de sete semanas foram divididos em dois grupos: o grupo de tratamento com veículo, com uma injeção diária i.p. de glicerol com peptídeo Tat 4 mg/kg, durante 3 semanas, e o grupo de tratamento com Tat SUMO-1, com uma injeção diária i.p. de Tat SUMO-1 4 mg/kg, também por 3 semanas. Em ambos treinamento e teste, todos os grupos gastaram tempo similar explorando os objetos, porém o grupo Tat SUMO-1 apresentou redução no tempo de exploração. A administração crônica de Tat SUMO-1 diminuiu a memória de reconhecimento de objetos novos, sugerindo que a superexpressão ou diminuição de SUMO podem afetar o processamento da memória. Portanto, SUMO-1 está intimamente envolvida na neurogênese e no funcionamento do hipocampo e a modulação da SUMOilação pode controlar a neurogênese e ser uma nova estratégia para transtornos neurológicos.

A investigação dos efeitos da escopolamina e do *knockdown* de SENP3 sobre a memória espacial foi realizada por meio da análise de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y, definidas como o comportamento natural de roedores em alternar entre os braços do labirinto, lembrando quais braços já foram visitados (HUGHES, 2004). O comportamento de alternâncias espontâneas pode ser influenciado por estresse, motivação (recompensas) e manipulação farmacológica. Nossos dados mostram que a escopolamina realmente prejudicou a memória espacial dos ratos, assim como já descrito na literatura (KWON et al., 2010; OHBA et al., 2015; WALRAVE et al., 2016), e que o *knockdown* de SENP3 reverteu este prejuízo igualando o número de alternâncias espontâneas com os demais grupos. O número de entradas nos braços, sem diferença significativa entre os grupos experimentais, valida o teste quanto a qualquer viés de mobilidade. Dessa forma, sugerimos que o aumento da SUMOilação possui efeito benéfico contra danos cognitivos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os achados aqui relatados, sugerimos que o aumento da SUMOilação no HD é essencial para manutenção da memória e que déficits cognitivos

são marcados por diminuição da mesma. Portanto, a SUMOilação pode ser um alvo terapêutico promissor para melhorar a função cognitiva em doenças neurológicas que afetam a memória. Faz-se necessário a investigação de outros alvos da SUMOilação envolvidos com os vários tipos de memória para melhor compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais as proteínas SUMO agem.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Apesar de ser uma MPT descrita há menos de 30 anos, há diversas evidências mostrando a importância da SUMOilação em patologias, devido a sua participação em diversos processos biológicos (ENSERINK, 2015). Torna-se interessante, deste modo, o estudo de seus níveis e efeitos em doenças que acometem o ser humano, como as doenças neurodegenerativas.

Aqui mostramos pela primeira vez que a SUMOilação encontra-se desregulada, assim como proteínas envolvidas com a autofagia, no modelo YAC128 para o estudo da DH, e que o seu aumento pelo *knockdown* de SENP3 consegue reverter alguns danos mitocondriais e déficits cognitivos e motores ocasionados pelas toxinas rotenona e MPTP, respectivamente, e déficits nas memórias de reconhecimento e espacial causados por escopolamina. Sendo uma MPT altamente dinâmica e reversível, seu estudo é, por vezes, difícil. Dessa forma, compreender como estão os níveis das proteínas SUMO nestas doenças pode auxiliar na compreensão de sua relação com neurotoxicidade. A manipulação de proteínas envolvidas em sua maquinaria torna-se também uma alternativa viável e inovadora para controlá-la, como mostrado aqui.

Ressaltamos que nossos dados, além de mostrar desregulação, apontam para um papel benéfico desempenhado pela SUMOilação. Tais achados possibilitam a formulação de estudos que foquem em outras proteínas desreguladas nestas doenças e que são alvos para a SUMOilação.

8 LIMITAÇÕES

Como principais limitações deste estudo, pode-se citar a alta dinâmica das proteínas SUMO, o que muitas vezes impediu sua visualização por imunomarcação nos experimentos. Ademais, a pandemia de COVID-19 paralisou experimentos desta Tese, e impediu a realização de outros previamente propostos, por 1 ano.

9 PERSPECTIVAS

Futuramente, espera-se uma melhor caracterização dos mecanismos pelos quais a SUMOilação desempenha um efeito neuroprotetor nas desordens aqui estudadas. Destacamos a importância de realizar o *knockdown* de SENP3 nos camundongos YAC128 para observação de um possível reestabelecimento da função autofágica. Estudos que avaliem a cadeia respiratória mitocondrial, imunomarcação nos tecidos estriatal e hipocampal, bem como níveis de proteínas relacionadas aos processos de aprendizado e memória, também são necessários.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neuroscience Letters**, v. 356, p. 191–194, 2004.

AHFS AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. AHFS Drug Information 2011. [s.l: s.n.].

ALKADI, H. A review on free radicals and antioxidants. **Infectious Disorders** - **Drug Targets**, v. 20, p. 16–26, 2022.

ALLBUTT, H. N.; HENDERSON, J. M. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 2, p. 195–202, 2007.

ALLOWAY, T. P.; COPELLO, E. Working Memory: The what, the why, and the how. **The Australian Educational and Developmental Psychologist**, v. 30, n. 2, p. 105–118, 2013.

ALVES, M. V. C.; BUENO, O. F. A. Retroactive interference: Forgetting as an interruption of memory consolidation. **Temas em Psicologia**, v. 25, n. 3, p. 1055–1067, 2017.

AMADIO, M. Emerging targets for the pharmacology of learning and memory. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 111–122, 2004.

AMEEN-ALI, K. E.; EASTON, A.; EACOTT, M. J. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 37–51, 2015.

ANDERSON, D. B. et al. SUMOylation: implications for neurodegenerative diseases. In: WILSON, V. G. (Ed.). . Advances in Experimental Medicine. [s.l.] Springer International Publishing AG, 2017. v. 963p. 261–281.

ARVANITAKIS, Z.; SHAH, R. C.; BENNETT, D. A. Diagnosis and management of dementia: A review. JAMA - Journal of the American Medical Association, v. 322, n. 16, p. 1589–1599, 2019.

AYTON, S. et al. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. **Neuroscience Letters**, v. 543, p. 105–109, 2013.

BADDELEY, A. D.; HITCH, G. Working memory. **Psychology of Learning** and Motivation, v. 8, p. 47–89, 1974. BADDELEY, A. Working memory. **Current Biology**, v. 20, n. 4, p. 136–140, 2010.

BAJPAI, P. et al. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3/6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6 implications in parkinson disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4436–4451, 2013.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721–10731, 2011.

BARRON, J. C.; HURLEY, E. P.; PARSONS, M. P. Huntingtin and the synapse. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 1–18, 2021.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. British Journal of Psychology. General Section, v. 41, n. 1–2, p. 68–80, 1950.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BHATTACHARYYA, K. B. The story of George Huntington and his disease. Annals of Indian Academy of Neurology, v. 19, n. 1, p. 25–28, 2016.

BHUVANENDRAN, S. et al. Amelioration of cognitive deficit by embelin in a scopolamine-induced Alzheimer's disease-like condition in a rat model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

BIGGAN, S. L.; INGLES, J. L.; BENINGER, R. J. Scopolamine differentially affects memory of 8- and 16-month-old rats in the double Y-maze. **Neurobiology of Aging**, v. 17, n. 1, p. 25–30, 1996.

BIUNDO, R.; WEIS, L.; ANTONINI, A. Cognitive decline in Parkinson's disease: the complex picture. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, n. 1, p. 16018, 2016.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BOWEN, D. M. et al. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. **Brain**, v. 99, n. 3, p. 459–496, 1976.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 197–211, 2003.

BRAND, M. D. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 755–767, 2004.

BRISSAUD, E. Nature et pathogénie de la Maladie de Parkinson. In: MEIGE,

H. (Ed.). . Leçons sur les maladies du Systeme Nerveuses. Paris: Masson, 1895. p. 488– 501.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519–529, 2009.

BROWN, M. W.; WARBURTON, E. C.; AGGLETON, J. P. Recognition memory: Material, processes, and substrates. **Hippocampus**, v. 20, n. 11, p. 1228–1244, 2010.

BRUNDIN, P.; MELKI, R. Prying into the prion hypothesis for Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9808–9818, 2017.

BUDZYNSKA, B. et al. Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 5, p. 931–942, 2015.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 625–641, 2002.

BUZSÁKI, G. Two-stage model of memory trace formation: A role for "noisy" brain states. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 551–570, 1989.

CANEVER, J. B. et al. Targeting α -synuclein post-translational modifications in Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 439, p. 114204, 2023.

CARBO, M. et al. Bioinformatics analysis of Ras homologue enriched in the striatum, a potential target for Huntington's disease therapy. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 6, p. 2223–2233, 2019.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. Current Protocols in Neuroscience, v. 15, n. 1, 2001.

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 Research**, v. 1513, p. 103–116, 2013.

CASTRO-GOMEZ, S. et al. Specific de-SUMOylation triggered by acquisition of spatial learning is related to epigenetic changes in the rat hippocampus. **NeuroReport**, v. 24, n. 17, p. 976–981, 2013.

CELEN, A. B.; SAHIN, U. Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts. **FEBS Journal**, v. 287, n. 15, p. 3110–3140, 2020.

CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 15, n. 1, p. 235–259, 2020.

CHANG, E. et al. MK2 SUMOylation regulates actin filament remodeling and subsequent migration in endothelial cells by inhibiting MK2 kinase and HSP27 phosphorylation. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2527–2537, 2011.

CHANG, H. M.; YEH, E. T. H. Sumo: From bench to bedside. Physiological Reviews, v. 100, n. 4, p. 1599–1619, 2020.

CHAO, O. Y. et al. The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 113, p. 373–407, 2020.

CHEN, G. et al. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 39, p. 13066–13077, 2010.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 39–48, 2017.

CHEN, X. et al. The function of SUMOylation and its crucial roles in the development of neurological diseases. **FASEB Journal**, v. 35, n. 4, p. 1–17, 2021.

CHEN, Y. C. et al. CREB SUMOylation by the E3 Ligase PIAS1 enhances spatial memory. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 29, p. 9574–9589, 2014.

CHEN, Z.-R. et al. Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1816, 2022.

CHIKI, A. et al. Site-specific phosphorylation of huntingtin exon 1 recombinant proteins enabled by the discovery of novel kinases. **ChemBioChem**, v. 22, n. 1, p. 217–231, 2021.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2652–2657, 2010.

COHEN, S. J. et al. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. 1685–1690, 2013.

CONIBEAR, A. C. Deciphering protein post-translational modifications using chemical biology tools. **Nature Reviews Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 674–695, 2020.

COOPER, J. A.; ARULPRAGASAM, A. R.; TREADWAY, M. T. Anhedonia in depression: biological mechanisms and computational models. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 22, p. 128–135, 2018.

COTZIAS, G. C. L-DOPA for parkinsonism. The New England Journal of Medicine, v. 278, p. 630, 1968.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Prog Brain Res**, v. 169, p. 323–338, 2008.

COX, J.; WITTEN, I. B. Striatal circuits for reward learning and decisionmaking. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 482–494, 2019.

CRAIG, T. J.; HENLEY, J. M. SUMOylation, Arc and the regulation homeostatic synaptic scaling: Implications in health and disease. **Communicative and Integrative Biology**, v. 5, n. 6, p. 634–636, 2012.

CROCE, K. R.; YAMAMOTO, A. A role for autophagy in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 122, n. 80, p. 16–22, 2019.

CUBEÑAS-POTTS, C.; MATUNIS, M. J. SUMO: A multifaceted modifier of chromatin structure and function. **Developmental Cell**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2013.

CUENCA, L. et al. Parkinson's disease: a short story of 200 years. **Histology** and **Histopathology**, v. 34, p. 1–43, 2018.

DE CAMPOS, D. L. et al. *Aniba canelilla* (Kunth) Mez essential oil and its primary constituent, 1-nitro-2-phenylethane, inhibits acetylcholinesterase and reverse memory impairment in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 303, p. 116036, 2023.

DEACON, R. M. J. Measuring motor coordination in mice. Journal of Visualized Experiments, n. 75, p. e2609, 2013.

DEGER, J. M.; GERSON, J. E.; KAYED, R. The interrelationship of proteasome impairment and oligomeric intermediates in neurodegeneration. Aging Cell, v. 14, n. 5, p. 715–724, 2015.

DEHESHI, S. et al. Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ros-mediated remodeling. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 684–699, 2015.

DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Sporadic Parkinson's disease: Development and distribution of α-synuclein pathology. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 33–50, 2016.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 673–704, 2007.

DÉZSI, L.; VÉCSEI, L. Monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, v. 16, p. 425–439, 2017.

DORVAL, V.; FRASER, P. E. SUMO on the road to neurodegeneration.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, v. 1773, n. 6, p. 694–706, 2007.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. Nature Reviews Neurology, v. 8, n. 6, p. 329–339, 2012.

DU, C. et al. PCR-based generation of shRNA libraries from cDNAs. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 1–11, 2006.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. Journal of the American Pharmaceutical Association, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.

EBERT, U.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Influence of grapefruit juice on scopolamine pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy male and female subjects. **Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 11, p. 523–531, 2000.

ECKERMANN, K. SUMO and Parkinson's disease. Neuromoleculra Medicine, v. 15, p. 737–759, 2013.

EHRNHOEFER, D. E.; SUTTON, L.; HAYDEN, M. R. Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in huntington disease. **Neuroscientist**, v. 17, n. 5, p. 475–492, 2011.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. **Behavioural Brain Research**, v. 127, n. 1–2, p. 199–207, 2001.

EICHENBAUM, H. What H.M. Taught Us. Journal of Cognitive Neuroscience, v. 25, n. 1, p. 14–21, 2013.

ENGELHARDT, J. F. Redox-mediated gene therapies for environmental injury: Approaches and concepts. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 1, p. 5–27, 1999.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

ENSERINK, J. M. Sumo and the cellular stress response. **Cell division**, v. 10, p. 4, 2015.

FAHN, S. The Medical Treatment of Parkinson Disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, 2015.

FAN, Y. et al. SUMOylation in viral replication and antiviral defense. Advanced Science, v. 9, n. 7, p. 2104126, 2022. FANG, C. et al. Cognition deficits in Parkinson's disease: Mechanisms and treatment. **Parkinson's Disease**, v. 2020, p. 1–11, 2020.

FANG, L. et al. Inactivation of MARCH5 prevents mitochondrial fragmentation and interferes with cell death in a neuronal cell model. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52637, 2012.

FARKHONDEH, T. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in organophosphate pesticide-induced neurotoxicity and its amelioration: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 20, p. 24799–24814, 2020.

FERNAGUT, P. O. et al. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 113, n. 2, p. 123–130, 2002.

FERNANDES, L. M. P. et al. Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 350, p. 99–108, 2018.

FERRY, B.; GERVASONI, D. Improving stereotaxic neurosurgery techniques and procedures greatly reduces the number of rats used per experimental group—a practice report. **Animals**, v. 11, n. 9, 2021.

FIELDS, E. et al. Gene targeting techniques for Huntington's disease. Ageing Research Reviews, v. 70, 2021.

FIGUEROA-ROMERO, C. et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 3917–3927, 2009.

FILICHIA, E. et al. Inhibition of Drp1 mitochondrial translocation provides neural protection in dopaminergic system in a Parkinson's disease model induced by MPTP. Scientific Reports, v. 6, p. 1–13, 2016.

FLOTHO, A.; MELCHIOR, F. Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 357–385, 2013.

FOX, S. H. et al. International Parkinson and Movement Disorder Society evidence-based medicine review : Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 00, p. 1–19, 2018.

FREDRICK, K.; IBBA, M. Errors rectified in retrospect. Nature, v. 457, n. 7226, p. 157–158, 2009.

GALLAGHER, P. S. et al. Cellular maintenance of nuclear protein homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 10, p. 1865–1879, 2014. GHILAN, M. et al. YAC128 Huntington's disease transgenic mice show enhanced short-term hippocampal synaptic plasticity early in the course of the disease. **Brain Research**, v. 1581, p. 117–128, 2014.

GIACOMELLO, M. et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 2020.

GLIKMANN-JOHNSTON, Y. et al. Spatial memory in Huntington's disease: a comparative review of human and animal data. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 98, p. 194–207, 2019.

GOLDBERG, N. R. S. et al. Profiling changes in gait dynamics resulting from progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced nigrostriatal lesioning. Journal of Neuroscience Research, v. 89, n. 10, p. 1698–1706, 2011.

GÓMEZ-GÓMEZ, M. E.; ZAPICO, S. C. Frailty, cognitive decline, neurodegenerative diseases and nutrition interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2019.

GOVERDHAN, P.; SRAVANTHI, A.; MAMATHA, T. Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

GRAVES, J. D. et al. E2F1 sumoylation as a protective cellular mechanism in oxidative stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 14958–14969, 2020.

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 5–6, p. 553–561, 2006.

GUERRA DE SOUZA, A. C.; PREDIGER, R. D.; CIMAROSTI, H. SUMOregulated mitochondrial function in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 137, n. 5, p. 673–686, 2016.

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

GUO, C. et al. SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. **The EMBO Journal**, p. 1–15, 2013.

GUO, C.; HENLEY, J. M. Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. **IUBMB Life**, v. 66, p. 71–77, 2014.

HAAXMA, C. A. et al. Gender differences in Parkinson's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, v. 78, p. 819–825, 2007.

HAEHNER, A.; HUMMEL, T.; REICHMANN, H. Olfactory loss in Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

HAFEZ, H. S. et al. Neuroprotective effect of ipriflavone against scopolamineinduced memory impairment in rats. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 20, p. 3037–3053, 2017.

HAN, X. J. et al. Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. Acta Medica Okayama, v. 65, n. 1, p. 1–10, 2011.

HAN, Z.-J. et al. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, p. 1081-1094, 2018.

HASSANZADEH, K. et al. Protective effect of curcuma extract in an ex vivo model of retinal degeneration via antioxidant activity and targeting the SUMOylation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–15, 2022.

HAWTON, A. et al. Health state utility values (QALY weights) for Huntington's disease: an analysis of data from the European Huntington's Disease Network (EHDN). **European Journal of Health Economics**, v. 20, n. 9, p. 1335–1347, 2019.

HAY, R. T. SUMO: a history of modification. **Molecular Cell**, v. 18, p. 1–12, 2005.

HELLEN, C. U. T. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 10, p. a032656, 2018.

HENLEY, J. M.; CARMICHAEL, R. E.; WILKINSON, K. A. Extranuclear SUMOylation in Neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 41, p. 198–210, 2018.

HENLEY, J. M.; CRAIG, T. J.; WILKINSON, K. A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. **Physiological Reviews**, v. 94, p. 1249–1285, 2014.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, F. et al. Analysis of activity and motor coordination in rats undergoing stereotactic surgery and implantation of a cannula into the dorsal hippocampus. **Neurología (English Edition)**, v. 32, n. 9, p. 579–586, 2017.

HIRST, J. Mitochondrial Complex I. Annual Review of Biochemistry, v. 82, n. 1, p. 551–575, 2013.

HO, B.; BARYSHNIKOVA, A.; BROWN, G. W. Unification of protein abundance datasets yields a quantitative Saccharomyces cerevisiae proteome. **Cell Systems**, v. 6, n. 2, p. 192- 205, 2018.

HODGSON, J. G. et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with fulllength mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. Neuron, v. 23, n. 1, p. 181–192, 1999.

HOPPE, J. B.; SALBEGO, C. G.; CIMAROSTI, H. SUMOylation: novel neuroprotective approach for Alzheimer's disease? **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 322–330, 2015.

HOU, X. et al. GYY4137, an H2S slow-releasing donor, prevents nitrative stress and α -synuclein nitration in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

HSU, W. L. et al. Smad4 SUMOylation is essential for memory formation through upregulation of the skeletal myopathy gene TPM2. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2017.

HUANG, C. et al. Regulation of HSF1 protein stabilization: An updated review. **European Journal of Pharmacology**, v. 822, p. 69–77, 2018.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 497–505, 2004.

HUTTER-SAUNDERS, J. A. L.; GENDELMAN, H. E.; MOSLEY, R. L. Murine motor and behavior functional evaluations for acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 279–288, 2012.

INDO, H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, v. 56, n. 1, p. 1–7, 2015.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. Physiological Reviews, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JANER, A. et al. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 1, p. 181–195, 2009.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, v. 91, n. 8, p. 795–808, 2020.

JANSEN, N. S.; VERTEGAAL, A. C. O. A chain of events: regulating target proteins by SUMO polymers. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 113–123, 2021.

JEOUNG, S.-W. et al. SUMOylation and Major Depressive Disorder.

International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 14, p. 8023, 2022.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 302–304, 1968.

KALIA, L. V; LANG, A. E. Parkinson's disease. The Lancet, v. 386, p. 896– 912, 2015.

KEISLER, A.; SHADMEHR, R. A Shared resource between declarative memory and motor memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 44, p. 14817–14823, 2010.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 7, n. 9, p. a018812, 2015.

KHARATISHVILI, I. et al. Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. **Experimental Neurology**, v. 217, n. 1, p. 154–164, 2009.

KIM, H. J.; JEON, B. S.; JENNER, P. Hallmarks of Treatment Aspects: Parkinson's Disease Throughout Centuries Including L-Dopa. **Parkinson's Disease**, v. 132, p. 1–49, 2017.

KIM, S. T. et al. Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1306, p. 176–183, 2010.

KIM, S.-K. et al. Standardized extract (HemoHIM) protects against scopolamine-induced amnesia in a murine model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2021, p. 1–11, 2021.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p. 1307–1350, 2010.

KRAKAUER, J. W.; SHADMEHR, R. Consolidation of motor memory. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 1, p. 58–64, 2006.

KROONEN, J. S.; VERTEGAAL, A. C. O. Targeting SUMO signaling to wrestle cancer. Trends in Cancer, v. 7, p. 496-510, 2020.

KWON, S. H. et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamineinduced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1–3, p. 210–217, 2010. LAMBERTY, Y.; GOWER, A. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie., v. 309, p. 5–19, 1991.

LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. **Science**, v. 219, p. 979–980, 1983.

LARA, A. H.; WALLIS, J. D. The role of prefrontal cortex in working memory: A mini review. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, p. 1–7, 2015.

LASHUEL, H. A. et al. a-Synuclein, especially the parkinson's diseaseassociated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. **Journal of Molecular Biology**, v. 2836, p. 1089–1102, 2002.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson disease. Neurologic Clinics of NA, v. 34, p. 955-965, 2016.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, p. 2055–2066, 2009.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos e fundamentos de neurociência. 2^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2010.

LEVY, D. A.; STARK, C. E. L.; SQUIRE, L. R. Intact conceptual priming in the absence of declarative memory. Psychol Sci., v. 15, p. 680-686, 2004.

LI, J. Y.; POPOVIC, N.; BRUNDIN, P. The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington' s disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 447–464, 2005.

LI, M. et al. Effects of electroconvulsive therapy on depression and its potential mechanism. **Frontiers in Psychology**, v. 11, p. 1-13, 2020.

LIANG, Y. C. et al. SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

LIAO, Y.; TANG, L. Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 630–638, 2015.

LIEBELT, F.; VERTEGAAL, A. C. O. Ubiquitin-dependent and independent roles of SUMO in proteostasis. American Journal of Physiology - Cell Physiology, v. 311, n. 2, p. C284–C296, 2016.

LISMAN, J. et al. Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1434–1447, 2017.

LIU, M.-Y. et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686–1698, 2018.

LIVINGSTON, G. et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. **The Lancet**, v. 396, n. 10248, p. 413–446, 2020.

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. Journal of Visualized Experiments, v. 2017, n. 126, p. 1–9, 2017.

LUO, J. et al. Increased SUMO-2/3-ylation mediated by SENP3 degradation is protective against cadmium-induced caspase 3-dependent cytotoxicity. **The Journal of toxicological sciences**, v. 42, n. 5, p. 529–538, 2017.

MAHAJAN, R. et al. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 97–107, 1997.

MANDEL, N.; AGARWAL, N. Role of SUMOylation in neurodegenerative diseases. Cells, v. 11, n. 21, p. 3395, 2022.

MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D. "On-Off" effects in patients with Parkinson's Disease on chronic levodopa therapy. **The Lancet**, v. 7, p. 292–296, 1976.

MARSH, L. Depression and Parkinson's disease: Current knowledge. Current Neurology and Neuroscience Reports, v. 13, n. 12, p. 409, 2013.

MARTIN, D. D. O. et al. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 1, p. 26–35, 2015.

MARTIN, S. J.; MORRIS, R. G. M. New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. **Hippocampus**, v. 12, n. 5, p. 609–636, 2002.

MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–973, 2011.

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. **Journal of Cell Biology**, v. 135, n. 6, p. 1457–1470, 1996.

MAURICE, T. et al. Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1584–1602, 2008.

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 24–34, 2018.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: A new look at an old problem. **Movement Disorders**, v. 21, n. 10, p. 1595–1606, 2006.

MERRICK, W. C.; PAVITT, G. D. Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 10, p. a033092, 2018.

MIKLYAEVA, E. I.; MARTENS, D. J.; WHISHAW, I. Q. Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. **Brain Research**, v. 681, n. 1–2, p. 23–40, 1995.

MOILY, N. S. et al. Transcriptional profiles for distinct aggregation states of mutant Huntingtin exon 1 protein unmask new Huntington's disease pathways. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 83, p. 103–112, 2017.

MOON, H. E.; PAEK, S. H. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 2, p. 103–116, 2015.

MOREIRA, E. L. G. et al. Proanthocyanidin-rich fraction from Croton celtidifolius Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 12, p. 1337–1351, 2010.

MOUSTAFA, A. A. et al. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 727–740, 2016.

MOYANO, M. D. et al. Sleep accelerates re-stabilization of human declarative memories. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 162, p. 1–8, 2019.

MUIR, G. D.; WHISHAW, I. Q. Ground reaction forces in locomoting hemiparkinsonian rats: a definitive test for impairments and compensations. **Experimental Brain Research**, v. 126, n. 3, p. 307–314, 1999.

MUSTAPHA, M.; TAIB, C. N. M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 422–433, 2021.

NADEL, L. et al. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1640–1645, 2012.

NORDQUIST, R. E. et al. Pigs as model species to investigate effects of early life events on later behavioral and neurological functions. **Animal Models for the Study of Human Disease**, p. 1003-1030, 2017.

NYAKAS, C. et al. Neuroprotective effects of vinpocetine and its major metabolite *Cis* -apovincaminic acid on NMDA-induced neurotoxicity in a rat entorhinal cortex lesion model. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 15, n. 2, p. 89–99, 2009.

O'ROURKE, J. G. et al. SUMO-2 and PIAS1 modulate insoluble mutant huntingtin protein accumulation. **Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 362–375, 2013.

OCHABA, J. et al. PIAS1 regulates mutant huntingtin accumulation and Huntington's disease-associated phenotypes in vivo. **Neuron**, v. 90, n. 3, p. 507–520, 2016.

OCHI, R. et al. Rotenone-stimulated superoxide release from mitochondrial complex I acutely augments L-type Ca 2+ current in A7r5 aortic smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, n. 9, p. H1118–H1128, 2016.

OHBA, T. et al. Japanese Huperzia serrata extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Bioscience**, **Biotechnology and Biochemistry**, v. 79, n. 11, p. 1838–1844, 2015.

OLAYINKA, J. et al. Quercetin mitigates memory deficits in scopolamine mice model via protection against neuroinflammation and neurodegeneration. Life Sciences, v. 292, p. 120326, 2022.

OLIVEIRA, A. M. M. et al. Subregion-specific p300 conditional knock-out mice exhibit long-term memory impairments. **Learning and Memory**, v. 18, n. 3, p. 161–169, 2011.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16065, 2016.

OVERSHOTT, R.; BURNS, A. Treatment of dementia. **Neurology in Practice**, v. 76, p. 53-59, 2005.

PARK, H.-S. et al. Sulforaphane enhances long-term potentiation and ameliorate scopolamine-induced memory impairment. **Physiology & Behavior**, v. 238, p. 113467, 2021.

PARK, J. M. et al. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. **Cancer Biology and Therapy**, v. 14, n. 2, p. 100–107, 2013.

PARK, J.; DAVIS, R. L.; SUE, C. M. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 18, n. 21, p. 1–11, 2018.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **Neuropsychiatry Classics**, v. 14, n. 2, p. 223–236, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th. ed. [s.l.] Academic Press, 2006.

PENG, F. et al. Platelet-derived growth factor-mediated induction of the

synaptic plasticity gene Arc/Arg3.1. Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 28, p. 21615–21624, 2010.

PERGOLIZZI, J. V. et al. Perspectives on transdermal scopolamine for the treatment of postoperative nausea and vomiting. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 24, n. 4, p. 334–345, 2012.

PETROVITCH, H. et al. Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-Based Longitudinal Study. **Archives of Neurology**, v. 59, p. 1787–1792, 2002.

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

PIEPERHOFF, P. et al. Regional changes of brain structure during progression of idiopathic Parkinson's disease – A longitudinal study using deformation based morphometry. **Cortex**, v. 151, p. 188–210, 2022.

PIZZINO, G. et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

PONZONI, S.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neurobiologia do Parkinsonismo. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 53, p. 711–717, 1995.

POUNTNEY, D. L. et al. SUMO-1 marks the nuclear inclusions in familial neuronal intranuclear inclusion disease. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 436–446, 2003.

PREDIGER, R. D. S. 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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 636, p. 629–636, 2009.

PREDIGER, R. D. S. et al. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental** Neurology, v. 202, p. 391–403, 2006.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 957–964, 2005.

PRINCZ, A.; TAVERNARAKIS, N. SUMOylation in Neurodegenerative Diseases. Gerontology, v. 66, n. 2, p. 122–130, 2020.

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

RAHIMZADEGAN, M.; SOODI, M. Comparison of memory impairment and oxidative stress following single or repeated doses administration of scopolamine in rat hippocampus. **Basic and Clinical Neuroscience Journal**, v. 9, n. 1, p. 5–14, 2018.

RAMAZI, S.; ALLAHVERDI, A.; ZAHIRI, J. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: a review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. **Journal of Biosciences**, v. 45, p. 3–9, 2020.

RAMAZI, S.; ZAHIRI, J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. **Database**, v. 2021, p. 1–20, 2021.

RANGEL-BARAJAS, C.; REBEC, G. V. Overview of Huntington's disease models: neuropathological, molecular, and behavioral differences. **Current protocols in neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 1–21, 2018.

RAPPOLD, P. M. et al. Drp1 inhibition attenuates neurotoxicity and dopamine release deficits in vivo. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–13, 2014.

RAWLINGS, N. et al. Protective role of the deSUMOylating enzyme SENP3 in myocardial ischemia-reperfusion injury. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0213331, 2019.

REBER, P. J. Cognitive neuroscience of declarative and nondeclarative memory. Advances in Psychology, v. 139, p. 113–123, 2008.

REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson disease. Medical Clinics of North America, p. 1–14, 2018.

RENNER, U. D.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 655–665, 2005.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 835–853, 2001.

RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. Journal of Neural Transmission, v. 38, p. 277–301, 1976.

RODNINA, M. V. Translation in prokaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 10, p. a032664, 2018.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: Opposing Effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval,. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 3, p. 578–595, 2002.

ROSS, C. A.; SHOULSON, I. Huntington disease: pathogenesis, biomarkers, and approaches to experimental therapeutics. **Parkinsonism and Related Disorders**, v.

15, n. SUPPL. 3, p. S135–S138, 2009.

ROXIN, A.; FUSI, S. Efficient partitioning of memory systems and its importance for memory consolidation. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 7, p. e1003146, 2013.

ROZAS, G. et al. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 83, n. 2, p. 165–175, 1998.

SALIMI, A. et al. Inhibition of scopolamine-induced memory and mitochondrial impairment by betanin. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, v. 36, n. 7, 2022a.

SALIMI, M. et al. Disrupted connectivity in the olfactory bulb-entorhinal cortex-dorsal hippocampus circuit is associated with recognition memory deficit in Alzheimer's disease model. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 4394, 2022b.

SARGE, K. D.; PARK-SARGE, O. K. SUMO and Its Role in Human Diseases. Int Rev Cell Mol Biol, v. 288, p. 167-183, 2011.

SCHAFFERT, L. N.; CARTER, W. G. Do post-translational modifications influence protein aggregation in neurodegenerative diseases: a systematic review. **Brain** Sciences, v. 10, n. 4, p. 1–37, 2020.

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. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 4, p. 808–819, 2018.

SCHNEIDER, S. A. PINK1 type of young-onset Parkinson disease. In: ADAM, M. P.; ARDINGER, H. H.; PAGON, R. A. (Eds.). . GeneReviews. Seattle: University of Washington, 1993. p. 1–15.

SCHOROVA, L.; MARTIN, S. Sumoylation in synaptic function and dysfunction. Frontiers in Synaptic Neuroscience, v. 8, p. 1-24, 2016.

SCHOTT, B. H. et al. Fiber density between rhinal cortex and activated ventrolateral prefrontal regions predicts episodic memory performance in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 13, p. 5408–5413, 2011.

SCHOTT, B. H. et al. The relationship between level of processing and hippocampal-cortical functional connectivity during episodic memory formation in humans. **Human Brain Mapping**, v. 34, n. 2, p. 407–424, 2013.

SCHRAG, A.; SCHOTT, J. M. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. The Lancet Neurology, v. 5, p. 355–363,

2006.

SCOTT, I.; YOULE, R. J. Mitochondrial fission and fusion. Essays in Biochemistry, v. 47, p. 85–98, 2010.

SEDIGHI, F.; ADEGBUYIRO, A.; LEGLEITER, J. SUMOylation prevents huntingtin fibrillization and localization onto lipid membranes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 328–343, 2020.

SEGAL, M.; AUERBACH, J. M. Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity. Life Sciences, v. 60, n. 13–14, p. 1085–1091, 1997.

SERRA, M. et al. Involvement of the protein ras homolog enriched in the striatum, rhes, in dopaminergic neurons' degeneration: link to Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1–13, 2021.

SHAHPASANDZADEH, H. et al. Interplay between SUMOylation and phosphorylation for protection against a-Synuclein Inclusions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 31224–31240, 2014.

SHERER, T. B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. Journal of Neuroscience, v. 23, n. 34, p. 10756–10764, 2003.

SHETTY, P. M. V.; RANGREZ, A. Y.; FREY, N. SUMO proteins in the cardiovascular system: friend or foe? Journal of Biomedical Science, v. 27, n. 1, p. 1–14, 2020.

SINGER, O.; VERMA, I. M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. **Current Gene Therapy**, v. 8, p. 483–488, 2008.

SLATTERY, D. A.; MARKOU, A.; CRYAN, J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology**, v. 190, n. 4, p. 555–568, 2007.

SOARES, E. S. et al. SUMO-modifying Huntington's disease. **IBRO** Neuroscience Reports, v. 12, p. 203–209, 2022.

SQUIRE, L. R. et al. Memory consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, p. a021766, 2015.

STEFFAN, J. S. et al. SUMO modification of huntingtin and Huntington's disease pathology. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 100–104, 2004.

STOLLAR, E. J.; SMITH, D. P. Uncovering protein structure. Essays in Biochemistry, v. 64, n. 4, p. 649–680, 2020.

SUBRAMANIAM, S. et al. Rhes, a physiologic regulator of sumoylation, enhances cross-sumoylation between the basic sumoylation enzymes E1 and Ubc9.

Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 27, p. 20428–20432, 2010.

SUBRAMANIAM, S. et al. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutanthuntingtin cytotoxicity. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1327–1330, 2009.

SUBRAMANIAM, S.; SNYDER, S. H. Huntington's disease is a disorder of the corpus striatum: focus on Rhes (Ras homologue enriched in the striatum). **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7–8, p. 1187–1192, 2011.

TANNER, C. M.; GOLDMAN, S. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neuroepidemiology**, v. 14, n. 2, p. 317–335, 1996.

TAO, C. C. et al. Epigenetic regulation of HDAC1 SUMOylation as an endogenous neuroprotection against A β toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death & Differentiation, v. 24, n. 4, p. 597–614, 2017.

TERASHIMA, T. et al. SUMO-I co-localized with mutant atrophin-I with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death. **NeuroReport**, v. 13, n. 17, p. 2359–2364, 2002.

TESTA, C. M.; JANKOVIC, J. Huntington disease: a quarter century of progress since the gene discovery. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 396, p. 52–68, 2019.

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

TRÉTIAKOFF, K. Contribution a l'etude l'anatomie pathologique du locus Niger de soemmering: avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Paris: Universitié de Paris, 1919.

UEDA, H. et al. Enhanced SUMOylation in polyglutamine diseases. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 293, n. 1, p. 307–313, 2002.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases : A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 65–74, 2009.

VAREJÃO, N. et al. Molecular mechanisms in SUMO conjugation. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 1, p. 123–135, 2020.

VIJAYAKUMARAN, S.; POUNTNEY, D. L. SUMOylation, aging and autophagy in neurodegeneration. **NeuroToxicology**, v. 66, p. 53–57, 2018.

WALLACE, T. L.; PORTER, R. H. P. Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 8, p. 891–903, 2011.

WALRAVE, L. et al. Inhibition of connexin43 hemichannels impairs spatial short-term memory without affecting spatial working memory. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 1–10, 2016.

WANG, H. et al. The maize SUMO conjugating enzyme ZmSCE1b protects plants from paraquat toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111909, 2021.

WANG, L. et al. Neuron-specific Sumo1-3 knockdown in mice impairs episodic and fear memories. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 39, n. 4, p. 259–266, 2014.

WANG, Y.; LIN, F.; QIN, Z. H. The role of post-translational modifications of huntingtin in the pathogenesis of Huntington's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 2, p. 153–162, 2010.

WEGRZYNOWICZ, M. et al. Novel BAC mouse model of Huntington's disease with 225 CAG repeats exhibits an early widespread and stable degenerative phenotype. J Huntingtons Dis., v. 4, n. 1, p. 17–36, 2015.

WEXLER, A.; WILD, E. J.; TABRIZI, S. J. George Huntington: A legacy of inquiry, empathy and hope. **Brain**, v. 139, n. 8, p. 2326–2333, 2016.

WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. **Biochemical Journal**, v. 428, p. 133–145, 2010.

WILSON, V. G. Introduction to Sumoylation. In: WILSON, V. G. (Ed.). . **SUMO Regulation of Cellular Processes**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. v. 963, p. 1–12.

WINTERS, B. D.; BUSSEY, T. J. Transient Inactivation of Perirhinal Cortex Disrupts Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 52–61, 2005.

WONG, M. B. et al. SUMO-1 is associated with a subset of lysosomes in glial protein aggregate diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 23, p. 1–21, 2013.

YADANG, F. S. A. et al. Scopolamine-induced memory impairment in mice: Neuroprotective effects of *Carissa edulis* (Forssk.) Valh (Apocynaceae) aqueous extract. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2020, p. 6372059, 2020.

YANG, W. et al. Current and projected future economic burden of Parkinson's

disease in the U.S. npj Parkinson's Disease, v. 6, p. 1-15, 2020.

YANG, W.; SHENG, H.; WANG, H. Targeting the SUMO pathway for neuroprotection in brain ischaemia. **BMJ**, v. 1, n. 3, p. 101–107, 2016.

YANG, Y. et al. Inhibition of SENP3 by lentivirus induces suppression of apoptosis in experimental subarachnoid hemorrhage in rats. **Brain Research**, v. I622, p. 270–278, 2015.

YOO, D. Y. et al. Chronic administration of SUMO-1 has negative effects on novel object recognition memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in the mouse dentate gyrus. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 3, p. 3427–3432, 2017.

YOO, H. S. et al. Levodopa-induced dyskinesia is closely linked to progression of frontal dysfunction in PD. **Neurology**, v. 92, n. 13, p. 1–12, 2019.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V; LICHTIG, J. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova**, v. 21, p. 787–793, 1998.

ZHANG, X. et al. Drp1, a potential therapeutic target for Parkinson's disease, is involved in olfactory bulb pathological alteration in the Rotenone-induced rat model. **Toxicology Letters**, v. 325, p. 1–13, 2020.

ZOU, Z. et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer : progress and challenges. Cell & Bioscience, p. 1–11, 2020.

APÊNDICE A – Mini Review publicada na Revista IBRO Neuroscience Reports.



SUMO-modifying Huntington's disease

Ericks S. Soares^a, Rui D. Prediger^{a,b}, Patricia S. Brocardo^b, Helena I. Cimarosti^{a,b,*}

^a Post-graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil
^b Post-graduate Program in Neuroscience, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords: Huntingtin Huntington's disease Neurodegeneration Post-translational modification SUMO SUMOylation

Small ubiquitin-like modifiers, SUMOs, are proteins that are conjugated to target substrates and regulate their functions in a post-translational modification called SUMOylation. In addition to its physiological roles, SUMOylation has been implicated in several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases (HD). HD is a neurodegenerative monogenetic autosomal dominant disorder caused by a mutation in the CAG repeat of the huntingtin (*htt*) gene, which expresses a mutant Htt protein more susceptible to aggregation and toxicity. Besides Htt, other SUMO ligases, enzymes, mitochondrial and autophagic components are also important for the progression of the disease. Here we review the main aspects of Htt SUMOylation and its role in cellular processes involved in the pathogenesis of HD.

1. Introduction

To allow for their numerous biological effects, proteins can be modified in many ways by processing events known as post-translational modifications (PTMs) (Ramazi et al., 2020). PTMs can add from simple chemicals (e.g. phosphate) to complex groups (e.g. carbohydrates) into proteins, altering their functions, destinations, structures and, thus, increasing the diversity of the proteome (Conibear, 2020). SUMOylation is among the top 10 studied PTMs, together with the best-characterized phosphorylation and ubiquitylation (Ramazi and Zahiri, 2021). In addition to its involvement in cardiovascular diseases (Shetty et al., 2020) and cancer (Kroonen and Vertegaal, 2020), SUMOvlation has been implicated in neurodegenerative diseases (Princz and Tavern akis, 2020). To date, several studies have focused on the role and functional consequences of SUMOylation in the two most prevalent neurodegenerative diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Guerra De Souza et al., 2016; Marcelli et al., 2018; Martins et al., 2016). It is important to point out that currently there is no cure for any neurodegenerative disease and that millions of people worldwide are affected, making the discovery of new treatments the focus of intense scientific research. A better understanding of the mechanisms underlying SUMOylation and how to manipulate them can provide novel therapeutic targets for neurodegeneration and have a clinical impact. Thus, the present review attempts to examine findings from in vitro and in vivo studies to provide a comprehensive picture of the involvement of

SUMOylation in Huntington's disease (HD).

2. SUMOvlation

SUMOylation is the reversible attachment of SUMO (small ubiquitinlike modifier) proteins to lysine residues in a three-step enzymatic pathway (Chang and Yeh, 2020). Modification by SUMO may alter protein localization, stability, and activity, as well as gene expression, DNA repair, and RNA processing (Chen et al., 2021; Varejão et al., 2020)

Briefly, the first step in the SUMOylation pathway is the maturation of SUMO by the family of SUMO-specific proteases, SENPs. Before its ligation to target substrates, SUMO is activated by the SUMO-activating enzyme 1 and 2 complexes, SAE1/SAE2, and then conjugated by the SUMO-conjugating enzyme, Ubc9. Once attached, with or without the participation of E3 protein ligases (e.g. Rhes, PIAS, RanBP2, MAPL, Topors, ZATT), SUMO modifies the target protein and, after that, it is deconjugated, or deSUMOylated, by the same SENPs (Chang and Yeh, 2020).

Five SUMO isoforms are found in mammalians. SUMO-1 shares \sim 50% of its amino acid sequence with both SUMO-2 and SUMO-3 that differ by only three N-terminal amino acids. As the available antibodies are unable to distinguish between these two isoforms, they are often denoted as SUMO-2/3 (Jansen and Vertegaal, 2021). SUMO-1 and SUMO-2/3 are highly expressed in the brain and are primarily involved

g/10.1016/j.ibneur.2022.03.00

Received 20 October 2021; Accepted 6 March 2022

Available online 9 March 2022 2667-2421/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Brain Research Organization. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativec s.org/licenses/byc-nd/4.0/)

^{*} Correspondence to: Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil.

E-mail address: helena.cimarosti@ufsc.br (H.I. Cimarosti)

ANEXO A – Aprovação de projeto pela CEUA/UFSC 1



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no Uso de Animais

Florianópolis, 26 de março de 2018 CEUA N 4502210318

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Responsável:	Patricia de Souza Brocardo		
Equipe:	Cristine de Paula Nascimento Castro, Evelini Plácido		
Telefone:	4896162124	e-mail:	patricia.brocardo@ufsc.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ("https://ceua.sites.ufsc.br") por meio da sua senha de acesso.



Luciana Aparecida Honorato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina



Vanessa Rafaella Foletto da Silva Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 701 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6094 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h : e-mail: ceua@sistemas.ufsc.br CEUA N 4502210318 - 04/04/2023 17:02:34

ANEXO B – Aprovação de projeto pela CEUA/UFSC



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do potencial efeito neuroprotetor da SUMOilação na doença de Parkinson", protocolada sob o CEUA nº 9607211022 (ID 002282), sob a responsabilidade de **Helena Cimarosti** *e equipe; Ericks Sousa Soares* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 07/12/2022.

We certify that the proposal "Investigation of the SUMOylation-mediated neuroprotection in Parkinson's disease", utilizing 132 Heterogenics rats (132 males), protocol number CEUA 9607211022 (ID 002282), under the responsibility of **Helena Cimarosti** and team; Ericks Sousa Soares - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/07/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2023 a 07/2023 Área: Farmacologia Origem: Biotério Central Espécie: Ratos heterogênicos sexo: Machos idade: 90 a 120 dias Quantidade: 132 Linhagem: Rattus novergicus / Wistar Peso: 290 a 350 g Florianópolis, 31 de março de 2023

Luciana Aparecida Honorato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Catarina

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 701 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6094 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h : e-mail: ceua@sistemas.ufsc.br CEUA N 9607211022

