



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULLA VIEIRA RODRIGUES

**A PROPAGAÇÃO DE FORMAS PRÉ-FIBRILARES DE ALFA-SINUCLEÍNA
ENTRE CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS E NEURONAIS É DEPENDENTE DE
CONTATO CÉLULA-CÉLULA E DE RAB35**

CAMPINAS - SP

PAULLA VIEIRA RODRIGUES

**A PROPAGAÇÃO DE FORMAS PRÉ-FIBRILARES DE α -SINUCLEÍNA
ENTRE CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS E NEURONAIS É DEPENDENTE DE
CONTATO CÉLULA-CÉLULA E DE RAB35**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutora em
Biologia Celular e Estrutural
Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Dr. Matheus de Castro Fonseca

Este arquivo digital corresponde à versão final da
tese defendida pela aluna Paulla Vieira Rodrigues
e orientada pela Dr. Matheus de Castro Fonseca

CAMPINAS - SP

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R618p

Rodrigues, Paulla Vieira, 1994-

A propagação de formas pré-fibrilares de α -sinucleína entre células enteroendócrinas e neuronais é dependente de contato célula-célula e de Rab35 / Paulla Vieira Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Matheus de Castro Fonseca.

1. Alfa-sinucleína. 2. Agregação celular. 3. Internalização. 4. Doença de Parkinson. I. Fonseca, Matheus de Castro. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent

Palavras-chave em Inglês:

Alpha-synuclein Cell
aggregation
Internalization
Parkinson disease

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Matheus de Castro Fonseca [Orientador]
Hernandes Faustino de Carvalho Cristina
Guatimosim Fonseca
Luciana de Oliveira Andrade
Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga

Data da defesa: 15-12-2021

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4970-6728>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5274225614574688>

Campinas, 15 de dezembro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente e Orientador Dr. Matheus de Castro Fonseca (CNPEM / LNBio)

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (IB/ UNICAMP)

Prof.^a Dra. Cristina Guatimosim Fonseca (Universidade Federal de Minas/ UFMG)

Prof.^a Dra. Luciana de Oliveira Andrade (Universidade Federal de Minas Gerais/ UFMG)

Prof.^a Dra. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga (Universidade Federal de São João del Rei/UFSJ)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia

Dedico esta tese à minha mãezinha.

Mulher de fé.

Se não fosse por você eu não conseguiria.
Você quem me possibilitou (do início ao fim)
a realização desse sonho que idealizamos
juntas! Essa conquista também é sua!

AGRADECIMENTOS

É com muita felicidade que encerro mais um ciclo em minha vida! Como disse Isaac Newton: "Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes." Por isso, não me faltam motivos para agradecer...

A **Deus**, pelo maravilhoso presente que é a vida e as infinitas oportunidades destinadas a ela.

Aos meus pais, **Josefa e Pedro**, pelo imenso legado: o estudo. Devo o que sou a vocês e faltam-me palavras para agradecer todo suporte, apoio e incentivo que recebo desde sempre. Vocês me ensinaram que para realizar um sonho é preciso dedicação e sacrifícios e é por isso que aqui estou: realizando mais um dos nossos sonhos, né mãe! Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acredito, obrigada pelas orações. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês.

As pessoas que Deus me presenteou como irmãs, **Gabriella e Larissa**, obrigada por estarem comigo em mais uma jornada, sou muito feliz por tê-las. Gabi, obrigada por nunca soltar a minha mão, você nem imagina o quanto você é importante pra mim! Não poderia deixar de citar minha sobrinha **Mariana**, meu pedacinho de amor na Terra, obrigada por me trazer tanta paz, te amo infinitamente!

Ao meu orientador, e também amigo, **Dr. Matheus de Castro Fonseca**, que desde o início, mesmo sem me conhecer, confiou em mim diversas responsabilidades, me guiando sempre pelos melhores caminhos, incentivando, orientando e me apresentando as melhores opções. É o maior responsável pelo desenvolvimento desse trabalho e me orientou em todos os momentos, desde a pesquisa até o trabalho na bancada, passamos por tudo juntos. Obrigada por ser um dos caras mais incríveis que eu conheço! Não tenho palavras para agradecer o acolhimento e a oportunidade de crescimento profissional, acadêmico e pessoal.

Aos meus amigos de laboratório, e também minha família em Campinas: **Dio, Bia, João e Katiane**, vocês foram fundamentais para que isso se tornasse uma realidade. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntos, pelas trocas de experiências e aprendizados, pelos perrengues laboratoriais e da vida, pelas cervejas e também pelas idas na Sergel. Obrigada por dividir comigo minhas angústias e alegrias e principalmente por toda ajuda! Com certeza vocês tornaram mais leve essa jornada. Faltam-me palavras para agradecer tudo que fizeram por mim! Que o laboratório nunca deixe de ser a nossa paixão (risos)! Pra sempre #Neurofellows!

A todos meus amigos de Uberlândia, em especial: **Fred** e **Babi** que mesmo a distância se tornaram presentes quase que diariamente, me dando colo e força nos momentos mais difíceis. Deus não poderia ter me presenteado de forma melhor!

Agradeço também a **Renata**, a melhor *roommate* que eu poderia ter, sou grata por Deus ter permitido nossas vidas se encontrarem, foi um prazer te conhecer.

As minhas musas inspiradoras, **Franciele** e **Júlia**, saímos da UFU para UNICAMP, cada uma no seu tempo, com um objetivo em comum de nos tornarmos doutoras! Obrigada pelas trocas, vocês me encorajam a continuar...

A minha família e amigos do Varjão, em especial a **Tia Abadia**, por ser minha segunda mãe, por todas nossas conversas, conselhos, obrigada por cuidar tão bem de mim!

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia celular e estrutural**, e a todos professores do **Instituto de Biologia**, em especial a **Professora Dra. Luciana Bolsoni**, que me acolheu tão bem no PED. Quem dera eu me tornar metade da profissional que você é.

A **UNICAMP**, **CNPq** e a todos funcionários do **LNBio** que possibilitaram a realização desse projeto, dando suporte para que eu pudesse realizar minhas atividades. É uma honra e um orgulho muito grande dizer que eu fiz parte dessas duas grandes instituições que são referências nacionais.

A **FAPESP** e **CNPq**, pelo apoio financiamento que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

Muita GRATIDÃO a todos que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nada é, tudo está!”
Fran Caye

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, crônica e progressiva. Em muitos casos de DP, a morte neuronal está relacionada com a presença de agregados intracelulares da proteína alfa-sinucleína (α Syn). A DP pode ser encontrada nas formas familiar e esporádica, no entanto, apesar da DP esporádica ser a mais comum, sua causa ainda não é bem compreendida. Uma hipótese atual indica que devido ao fato de a α Syn incorretamente estruturada ser encontrada no sistema nervoso entérico (SNE) antes de surgir no cérebro, a DP esporádica pode se originar a partir do intestino e progredir para o sistema nervoso central (SNC). Em adição, recentemente foi descoberto que células enteroendócrinas (CEEs) presentes no epitélio intestinal possuem propriedades semelhantes a neurônios, se conectam com os neurônios do SNE e expressam a α Syn. Essas células estão voltadas para a luz do intestino e em constante interação com o microbioma intestinal, sujeitas, portanto, à modulação influenciada por este microambiente intestinal. Reunidas, estas características fazem das CEEs uma possível peça-chave para o estudo sobre a origem e evolução da DP esporádica. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos moleculares e celulares que podem estar envolvidos na translocação da α Syn entre as CEEs e as células neuronais. Para isso, α Syn monomérica foi produzida, purificada, submetida ao processo de formação de fibrilas pré-formadas (PFFs) e devidamente caracterizadas. Em seguida, avaliamos se as PFFs de α Syn podem ser internalizadas por organoides cerebrais, pelo epitélio intestinal, por CEEs e por células neuronais, e se núcleos de agregação de α Syn fibrilar podem iniciar a agregação da α Syn endógena. Buscamos investigar quais os mecanismos envolvidos no processo utilizando as sondas vitais FM1-43, Fluo-4/AM e *live imaging*. Mecanismos de transferência de PFFs de α Syn entre as CEEs e neuronais foram estudados por meio de ensaios de co-culturas na presença ou ausência de contato celular físico. Nossos resultados mostram que obtivemos sucesso na produção da α Syn monomérica e fibrilar, esta última apresentando características de polidispersão e grande raio hidrodinâmico. As PFFs de α Syn são eficientemente internalizados por organoides cerebrais e diretamente pelo epitélio intestinal de camundongos, o mesmo sendo observado em CEEs e neuronais isoladas e transfectadas com α Syn-GFP. A internalização de PFFs de α Syn levou a agregação da α Syn endógena. PFFs de α Syn iniciam uma resposta intracelular de Ca^{2+} e concomitante evento de endocitose. Por último, caracterizamos a propagação de PFFs de α Syn de células enteroendócrinas para neuronais, mostrando que este processo é dependente do contato físico célula a célula e de Rab35 GTPase. Estes *insights* mecanísticos da transferência de α Syn, sugerem fortemente a conexão intestino-cérebro como uma possível rota de origem da DP esporádica.

Palavras-chaves: alfa-sinucleína, agregação, internalização, doença de Parkinson esporádica

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative disease. PD can be found in familial and sporadic forms, and although sporadic PD is the most common, its cause is still not well understood. In many cases, neuronal death is related to the presence of intracellular aggregates of the protein alpha-synuclein (α Syn). A current hypothesis indicates that since incorrectly structured α Syn is found in the enteric nervous system (ENS) before it appears in the brain, sporadic PD may originate in the gut and progress to the central nervous system (CNS). In addition, it has been recently discovered that enteroendocrine cells (EECs) present in the intestinal epithelium possess neuron-like properties, connect with enteric nerves and express α Syn. These cells face the gut lumen and are in constant interaction with the gut microbiome, being influenced by these organisms, and therefore, being modulated by the gut microenvironment. Taken together, these features make EECs a key player in the study of the origin and evolution of sporadic PD. Thus, the aim of this work is to investigate the molecular and cellular mechanisms that may be involved in the translocation of α Syn between EECs and neuronal cells. To this end, α Syn was produced, purified, subjected to the process of fibril formation (PFFs) and properly characterized. We then evaluated whether α Syn PFFs can be internalized by brain organoids, the intestinal epithelium, EECs and neuronal cells and, whether these α Syn seeds can initiate aggregation of endogenous α Syn and sought to investigate what mechanisms are involved in the process using the vital probes FM1-43, Fluo-4/AM and live imaging. Mechanisms of PFFs transfer of α Syn between EECs and neuronal cells were studied using co-culture assays in the presence or absence of physical cell-cell contact. We successfully produced monomeric and fibrillar forms of α Syn, the latter exhibiting polydispersity characteristics and large hydrodynamic radius. We demonstrate that α Syn PFFs are efficiently internalized by brain organoids and directly by mouse intestinal epithelium, the same being observed in EECs and neuronal cells isolated and transfected with α Syn-GFP. Interestingly, internalization of α Syn PFFs led to aggregation of endogenous α Syn. In addition, α Syn PFFs initiate an intracellular Ca^{2+} response and concomitant endocytosis event. Lastly, we characterized the spread of α Syn PFFs from enteroendocrine to neuronal cells showing that this process is dependent on physical cell-to-cell contact and on Rab35 GTPase. Thus, our results provide mechanistic insights into α Syn transfer, strongly suggesting the gut-brain connection as a possible route of origin of sporadic PD.

Keywords: alpha-synuclein, aggregation, internalization, sporadic Parkinson's disease

LISTA DE ABREVIACÕES

α Syn	Alfa-synucleína
ATCC	America Type Culture Collection
Ca^{2+}	Ion Cálcio
CD	Dicroísmo Circular
cDNA	DNA Complementar
CEUA	Comissão De Ética Em Uso De Animais
CONCEA	Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal
CNPEN	Centro Nacional De Pesquisa Em Energia E Materiais
DLS	Espalhamento Dinâmicos De Luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença De Parkinson
CEEs	Células Enteroendócrinas
EM	Esclerose Múltipla
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Trifosfato De Guanosina
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil) Piperazina-N'-2-Etanossulfónico
HRP	Peroxidase De Rábano
iPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas
KCl	Cloreto De Potássio
LMA	Laryngeal Mask Airway
LBs	Corpos De Lewy
LNs	Neurites De Lewy
LNBio	Laboratório Nacional De Biociencias
LRRK2	Quinase 2 Rica Em Leucina
NAC	Acetilcisteína
PBS	Tampão Fosfato-Salino
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFF	Fibrilas Pré-Formadas
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis
siRNA	RNA Interferente Pequeno
SN	Sistema Nervoso
SNCA	Gene da α Syn
SNARE	Soluble NSF Attachment Receptor
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNpc	Porção Compacta Da Substância Negra
TBST	Solução Salina Tamponada Com Tris E Polissorbato 20.
TGI	Trato Gastrointestinal
TNT	Nanotubos De Tunelamento
WB	Western Blotting
WT	Selvagem
PFA	Paraformaldeido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conexão intestino-cérebro e o possível mecanismo de agregação e propagação da α Syn.....	20
Figura 2. α Syn em condições fisiológicas e patológicas.....	25
Figura 3. Possíveis rotas para a transferência de α Syn de célula para célula.....	29
Figura 4. Ilustração esquemática do desenho experimental do ensaio de internalização e indução de formação de agregados de α Syn em células STC-1 e células SH-SY5Y.....	39
Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental do ensaio de transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais.	41
Figura 6. Esquema representativo do ensaio de transferência de PFFs de α Syn independente do contato célula-célula.	42
Figura 7. Características biofísicas da α Syn monomérica e PFFs.....	42
Figura 8. Organoides cerebrais desenvolvidos a partir de iPSCs humanas expressam marcadores neuronais específicos após 60 dias de diferenciação	51
Figura 9. Organoides cerebrais gerados a partir de iPSCs humanas internalizam PFFs de α Syn e mimetizam o processo de agregação cronológico destas proteínas nas sinucleinopatias.....	52
Figura 10. PFFs de α Syn são internalizados pelo lumem intestinal de camundongos.....	48
Figura 11. PFFs de α Syn induzem a agregação da α Syn monomérica em células STC-1.....	56
Figura 12. PFFs de α Syn induzem a agregação da α Syn monomérica em células SH-SY5Y.. ..	57
Figura 13. PFFs de α Syn iniciam uma resposta intracelular de Ca^{2+} e eventos de endocitose em células STC-1 e SH-SY5Y.	60
Figura 14. Na ausência de Ca^{2+} extracelular, PFFs de α Syn não induzem sinalização intracelular de Ca^{2+} em células STC-1 e SH-SY5Y.....	56
Figura 15. PFFs de α Syn se transferem entre células STC-1 e SH-SY5Y.....	59
Figura 16. Transferência da α Syn independente do contato célula-célula.	67
Figura 17. Caracterização do silenciamento de Rab35 em células STC-1 utilizando siRNA.	69
Figura 18. O silenciamento de Rab35 GTPase em células STC-1 inibe a translocação e a propagação das fibrilas α Syn.....	65
Figura 19. Silenciamento de Rab35 GTPase em células STC-1 redireciona α Syn PFFs para lisossomos.....	67

Figura 20. As PFFs de α Syn internalizadas são encontradas em vesículas lisossomais no citosol das células STC-1.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers usados para a amplificação dos insertos de DNA da α Syn WT.	32
Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do gene <i>SNCA</i>	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	23
3.1. Doença de Parkinson.....	23
3.2. α -sinucleína.....	24
3.3. O eixo intestino – cérebro.....	25
3.4. Propagação da α Syn como mecanismo central no desenvolvimento da DP.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Animais.....	30
4.2. Linhagens celulares.....	30
4.3. Geração e obtenção de organoide cerebrais.....	31
4.4. Clonagem, expressão e purificação de α Syn monomérica e fibrilar.....	32
4.5. Formação das fibrilas pré-formadas de α Syn	34
4.6. Produção da α Syn-GPF.....	34
4.7. Identificação e caracterização da α Syn.....	35
4.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	35
4.7.2. Dicroísmo Circular (DC).....	36
4.7.3. <i>Western Blotting</i>	36
4.8. Internalização de PFFs de α Syn em organoides cerebrais.....	37
4.9. Imunofluorescência com fatias de organoides.....	37
4.10. Administração de PFFs de α Syn em intestino de camundongo.....	37
4.11. Ensaio de internalização e indução de formação de agregados de α Syn em cultura celular.....	38
4.12. Endocitose monitorada com a sonda FM1-43	39
4.13. Sinalização intracelular de Ca^{2+}	39
4.14. Transferência de PFFs de α Syn entre STC-1 e SH-SY5Y.....	40
4.15. Ensaio de co-cultura em filtros <i>transwell</i>	41
4.16. Silenciamento (<i>knockdown</i>) da proteína Rab35.....	42
4.17. Transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais.....	43
4.18. Transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas	43

4.19. Avaliação da participação da Rab35 no processo de transferência de α Syn entre células enteroendócrinas	44
4.20. Avaliação da participação de lisossomos no processo de transferência de α Syn	44
4.21. Análise das imagens.....	44
4.22. Análise de dados	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Caracterização da proteína α Syn.....	46
5.2. PFFs de α Syn são eficientemente internalizados por organoides cerebrais.....	49
5.3. PFFs de α Syn são internalizados pelo epitélio intestinal de camundongos	53
5.4. PFFs de α Syn são internalizados por células enteroendócrinas e neuronais e iniciam um processo de agregação da α Syn endógena	55
5.5. PFFs de α Syn iniciam uma resposta intracelular de cálcio e são internalizados por eventos de endocitose em células enteroendócrinas e neuronais	58
5.6. PFFs de α Syn são transferidos entre células STC-1 e SH-SY5Y	63
5.7. O silenciamento da Rab 35 prejudica a transferência de α Syn PFFs das células enteroendócrinas para as neuronais	68
5.8. O silenciamento de Rab35 redireciona as fibrilas α Syn para compartimentos lisossomais	72
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERENCIAS.....	79
9. ANEXOS.....	91
9.1. Protocolo nº 69.....	91
9.2. Declaração de biossegurança.....	92
9.3. Declaração de direitos autorais	94
9.4. Produção científica.....	95
9.5. Certificados	98

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva, caracterizada por déficits motores (sinais de bradicinesia ou acinesia, rigidez muscular, tremores e instabilidade postural), acompanhados de sintomas autonômicos, cognitivos, psiquiátricos e distúrbios gastrointestinais (JANKOVIC, 2012; RAO et al., 2003; SANTANGELO et al., 2017).

Neuropatologicamente, a DP está associada à uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos na porção compacta da substância negra do mesencéfalo (SNpc), o que consequentemente, reduz a síntese e liberação de dopamina, neurotransmissor responsável por várias funções no sistema nervoso central. Além da morte neuronal, em muitos casos a DP está associada a formação de corpos de Lewy nos neurônios remanescentes (KINGSBURY et al., 2010). Os corpos de Lewy são estruturas intracelulares formadas em grande parte pelo acúmulo da proteína α -sinucleína (α Syn) estruturalmente alterada e fosforilada em um resíduo de serina (S129) (HANSEN; LI, 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012).

As doenças neurodegenerativas caracterizadas pelo acúmulo da α Syn estruturada incorretamente são coletivamente conhecidas como sinucleinopatias e constituem a segunda forma mais comum de demências neurodegenerativas (MCCANN et. al, 2014). A α Syn é uma proteína ácida encontrada na forma solúvel ou ligada às membranas celulares, possui resistência à altas temperaturas e apesar de suas funções fisiológicas não serem completamente estabelecidas, acredita-se que esta proteína esteja implicada no tráfego vesicular através de sua interação com o complexo de proteínas SNARE (acrônimo de *SNAP - Soluble NSF Attachment Protein - Receptor*) nos terminais pré-sinápticos (BURRE et al., 2010).

Apesar de não ser um fenômeno completamente elucidado, em alguns casos da DP esporádica, sob determinadas condições, incluindo altas concentrações de íons metálicos como o cálcio (Ca^{2+}), (RCOM-H'CHEO-GAUTHIER; GOODWIN; POUNTNEY, 2014), estresse oxidativo e modificações pós-traducionais, a α Syn sofre uma alteração em sua conformação, induzindo a própria agregação dentro da célula (ABOUNIT et al., 2016; BOUSSET et al., 2013). Tal evento resulta no acúmulo de formas insolúveis que levam à alterações na função e culminam com a morte celular, comprometendo assim, a síntese e liberação de dopamina, o que gera os sintomas incapacitantes relacionados à DP (BRAAK et al., 2004; CHUNG et al., 2020; HANSEN; LI, 2012).

A DP é encontrada nas formas familiar ou esporádica, sendo esta última responsável por cerca de 90% dos casos (BRAAK et al., 2003a). Embora a causa da DP esporádica não esteja

totalmente elucidada, diversas evidências indicam que a proteína α Syn com estruturação incorreta (*misfolded*) é encontrada nos neurônios do sistema nervoso entérico (SNE) antes mesmo de aparecer no cérebro (CHANDRA et al., 2017; SAVICA et al., 2017). Portanto, esses dados indicam que o mau-dobramento da α Syn é um evento que pode ocorrer no SNE antes mesmo do acometimento no sistema nervoso central (SNC) (BURKE; O'MALLEY, 2013; ORIMO, 2008).

Sugere-se, então, que uma possível origem dos casos esporádicos da DP se inicia com o acúmulo da α Syn agregada no intestino, com sua posterior translocação para nervos periféricos e dispersão para o SNC através da propagação célula-célula. Tal hipótese foi levantada uma vez que α Syn mal dobrada inicia o *misfolding* (estruturação incorreta) da α Syn nativa em células receptoras (DESPLATS et al., 2009; LUK et al., 2009a). Isto faz com que a DP seja considerada uma doença priônica (doença que resulta de enovelamento incorreto de uma proteína cerebral normal de superfície celular chamada proteína priônica), visto que a α Syn estruturalmente incorreta em uma dada célula poderia se espalhar e iniciar a estruturação incorreta da α Syn nativa em células receptoras (ABOUNIT et al., 2016).

Abounit e colaboradores (2016), mostraram que fibrilas de α Syn são transferidas de forma eficiente de células doadoras para células receptoras dentro de vesículas lisossômicas através de estruturas sinciciais denominadas nanotubos de tunelamento (TNTs). Além disso, após essa transferência, foi constatado que as fibrilas de α Syn são capazes de induzir a agregação da α Syn solúvel no citosol das células receptoras, sugerindo que células doadoras sobrecarregadas com agregados de α Syn em lisossomos eliminam este material utilizando-se do tráfego intercelular mediado por TNT. Porém, apesar dessa descoberta, ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares exatos de transferência da α Syn do SNE para o SNC.

Ainda neste contexto, recentemente foi visto que as células enteroendócrinas (CEEs) localizadas no epitélio intestinal, possuem uma conexão direta com nervos entéricos (CHANDRA et al., 2017) e apresentam toda a maquinaria exocítica de uma célula neuronal típica, com expressão da α Syn, presença de vesículas secretoras e proteínas do complexo SNARE de exocitose, o que permite exocitar peptídeos e proteínas mal-estruturadas para o meio extracelular (BOHÓRQUEZ et al., 2014). Sabendo que estas células estão voltadas para a luz do intestino, as CEEs estão em interação direta com a luz do órgão e, conseqüentemente, com o microbioma intestinal, fatores estes que são capazes de modular seus processos fisiológicos e patológicos. Além disso, já se sabe que a interação do microbioma com o trato gastrointestinal interfere na manutenção da homeostase da α Syn em CEEs (PEDRO AMORIM

NETO et al., 2021). Deste modo, estudos recentes sugerem que a microbiota gastrointestinal pode desempenhar um papel importante na patogênese de distúrbios neurodegenerativos, como a DP e também a doença de Alzheimer (CRYAN et al., 2020).

Estudos de Chandra (2017) mostraram que CEEs imortalizadas (células STC-1) e CEEs nativas do intestino de ratos e humanos expressam abundantemente a proteína α Syn. Além disso, essas células contendo α Syn conectam-se diretamente aos terminais nervosos dos plexos submucoso e mioentérico, formando um circuito neural entre o intestino e o sistema nervoso, no qual toxinas ou outras influências ambientais do lúmen do intestino poderiam afetar a expressão ou o dobramento de α Syn nestas células intestinais, com posterior migração da proteína estruturalmente incorreta para níveis superiores do sistema nervoso (Figura 1) (CHANDRA et al., 2017).

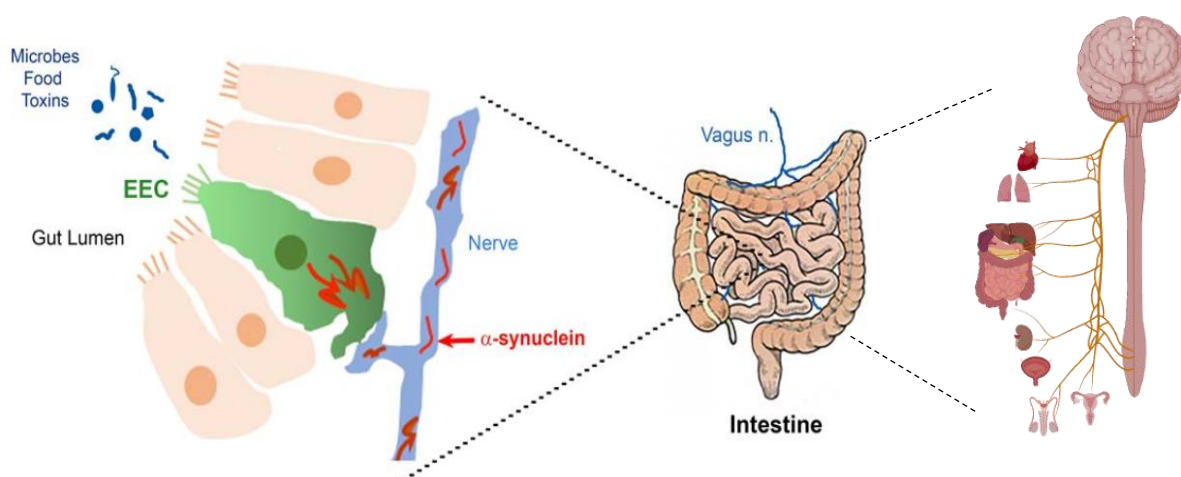


Figura 1. Conexão intestino-cérebro e o possível mecanismo de agregação e propagação da α Syn. A superfície apical das células enteroendócrinas (CEE, em verde) está exposta ao lúmen e, portanto, está em contato com toxinas e metabólitos ingeridos e/ou produzidos pelo microbioma do intestino. A superfície basolateral das CEEs está em contato com os nervos entéricos (em azul) e células da glia, que se conectam com o nervo craniano vago. Até o momento, hipotetiza-se que a absorção de toxinas pelas CEEs pode causar agregação da α Syn dentro destas células e esta proteína agregada pode migrar para os nervos entéricos, iniciando assim uma cascata patogênica levando às α -sinucleinopatias (Fonte: Chandra et al., 2017).

Diante disso, sabendo-se que as CEEs, se conectam aos neurônios periféricos e, ao mesmo tempo, interagem diretamente com o microbioma intestinal, e que esses fatores podem desempenhar um papel crítico na origem e transmissão da DP do intestino para o sistema nervoso central, o objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos da propagação da α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais. Esperamos que este estudo possa redirecionar

o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos e sustentar futuras intervenções clínicas para o tratamento/controlar o desenvolvimento e/ou progressão da DP esporádica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os mecanismos moleculares e celulares que podem estar envolvidos na translocação da α Syn entre células enteroendócrinas e neurônios.

2.2. Objetivos específicos

- a) Produzir *in house* a proteína α Syn monomérica;
- b) Sintetizar as fibrilas pré-formadas de α Syn (PFFs) e caracterizá-las bioquímica e biofisicamente;
- c) Avaliar a internalização de PFFs de α Syn por organoides cerebrais e epitélio intestinal de camundongos;
- d) Avaliar a internalização de PFFs de α Syn por células enteroendócrinas e neuronais;
- e) Verificar se núcleos de agregação de PFFs de α Syn podem iniciar uma cascata de fibrilização na α Syn endógena em células enteroendócrinas e neuronais;
- f) Estudar a possível transferência de PFFs de α Syn entre as células enteroendócrinas;
- g) Avaliar se, e como as PFFs de α Syn das células enteroendócrinas podem ser translocados para células neuronais;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

3.1. Doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva do SNC. É a segunda doença neurodegenerativa de maior prevalência depois da doença de Alzheimer, afetando cerca de sete a dez milhões de pessoas em todo o mundo (POEWE et al., 2017). A incidência de DP aumenta constantemente com a idade, sendo mais prevalente na população com mais de 80 anos (PRINGSHEIM et al., 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, cerca de 200 mil pessoas sofrem com a doença.

A DP é encontrada nas formas familiar ou esporádica, sendo esta última responsável por 90% dos casos (BRAAK et al., 2003b). Embora não se saiba a causa exata da DP esporádica, os principais fatores de risco são genéticos, idade avançada e exposição à toxinas ambientais (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Várias teorias tentam explicar os processos patológicos que estão envolvidos na origem da DP, entre elas: a) agregação proteica anormal b) disfunções mitocondriais; c) estresse oxidativo; d) neuroinflamação; e) excitotoxicidade (FUKAE; MIZUNO; HATTORI, 2007; HENCHCLIFFE; BEAL, 2008; ZHOU; HUANG; PRZEDBORSKI, 2008). Estes processos resultam na morte dos neurônios dopaminérgicos na SNpc do mesencéfalo, levando à uma série de déficits motores que incluem bradicinesia (movimentos lentos) ou acinesia (ausência de movimentos), tremores, rigidez muscular e instabilidade postural. Esses sintomas ocorrem primariamente, devido à redução da síntese e liberação de dopamina, neurotransmissor responsável por várias funções no sistema nervoso central, entre elas, a coordenação dos movimentos (JANKOVIC, 2012). Apesar dos distúrbios motores serem os mais comuns na avaliação do diagnóstico da doença, é importante mencionar que sintomas gastrointestinais, como constipação e gastroparesia, podem preceder os sintomas motores por décadas (EDWARDS et al., 1992; CLOUD; GREENE, 2011). Em alguns casos, os pacientes apresentam também sintomas autonômicos, cognitivos e psiquiátricos (RAO et al., 2003; SANTANGELO et al., 2017).

Além da morte neuronal e glial em regiões específicas do cérebro, uma das características mais comuns da DP é a formação de inclusões intracelulares denominadas corpos de Lewy (LBs) e neuritos de Lewy (LNs) nos neurônios dopaminérgicos remanescentes (KINGSBURY et al., 2010) e também no SNE (ANGOT; BRUNDIN, 2009). Estes agregados proteicos são compostos principalmente pela proteína α Syn estruturalmente agregada (HANSEN; LI, 2012; MARQUES; OUTEIRO, 2012).

3.2. α -sinucleína

A α Syn é uma proteína neuronal pré-sináptica de 140 aminoácidos, codificada pelo gene SNCA e amplamente expressa no cérebro (CLAYTON; GEORGE, 1998), no entanto, sua presença em tecidos não-neuronais também foi relatada (JO et al., 2000; SCHERZER et al., 2008). Embora as funções exatas dessa proteína ainda não sejam completamente definidas, estudos revelaram a participação de α Syn na liberação e tráfego de vesículas sinápticas, montagem do complexo SNARE, ligação à ácidos graxos e a regulação de enzimas e transportadores essenciais para a sobrevivência neuronal (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; BURRÉ et al., 2013; BUTLER; SAMBO; KHOSHBOUEI, 2017; KANAAN; MANFREDSSON, 2012; KAPLAN; RATNER; HAAS, 2003a; KOPRICH; KALIA; BROTHIE, 2017; SHARON et al., 2001; STEFANIS, 2012; WONG; KRAINC, 2017).

Sua estrutura compreende um domínio N- terminal α -helicoidal anfipático, um centro hidrofóbico de componente β - não-amilóide (NAC) e um domínio C-terminal hidrofílico. A região N-terminal é caracterizada pela presença de uma região anfipática que permite a ligação desta proteína com membranas celulares; o componente β -não-amilóide é responsável pela agregação da proteína; e o domínio C- terminal, medeia a interação da α Syn com outras proteínas, ligantes e íons metálicos incluindo o Ca^{2+} (KAPLAN; RATNER; HAAS, 2003b; MCLEAN et al., 2000; NORRIS; GIASSON; LEE, 2004; OTTOLINI, D; CALÍ, T; SZABÒ, I; BRINI, 2017; UVERSKY, 2017; WONG; KRAINC, 2017; YU et al., 2007).

A α Syn é uma proteína com notável plasticidade conformacional. No estado monomérico ela se encontra naturalmente solúvel no citoplasma e com conformação não-estruturada, mas também pode ser encontrada ligada às membranas celulares, apresentando estruturação α -helicoidal (ELIEZER et al., 2001; UVERSKY et al., 2002; WEINREB et al., 1996). Foi demonstrado *in vitro*, que após um período de incubação, o monômero solúvel se acumula em oligômeros (intermediários pré-fibrilares) através de estruturas de nucleação parcialmente dobradas, que eventualmente, sofrem alteração conformacional para folhas β -amiloides. Este estado conformacional se apresenta de forma altamente ordenada, sendo determinante para a formação dos agregados fibrilares insolúveis (CONWAY; HARPER; LANSBURY, 2000). O dobramento incorreto, agregação e acúmulo de α Syn nas formas de oligômeros e fibras tem implicações neurotóxicas graves na maioria das doenças neurodegenerativas, como na Atrofia de Múltiplos Sistemas, Doença de Gaucher e também em muitos dos casos esporádicos da DP (CHUNG et al., 2001; CUERVO et al., 2004; DETTMER et al., 2015; GOEDERT, 2001; KAMP et al., 2010; KOPRICH; KALIA; BROTHIE, 2017;

NAKAMURA et al., 2011; SNYDER et al., 2003; STEFANIS et al., 2001; WONG; KRAINIC, 2017; XILOURI et al., 2009).

Dessa forma, podemos dividir e classificar as conformações de α Syn em fisiológicas e patológicas, conforme mostrado na Figura 2.

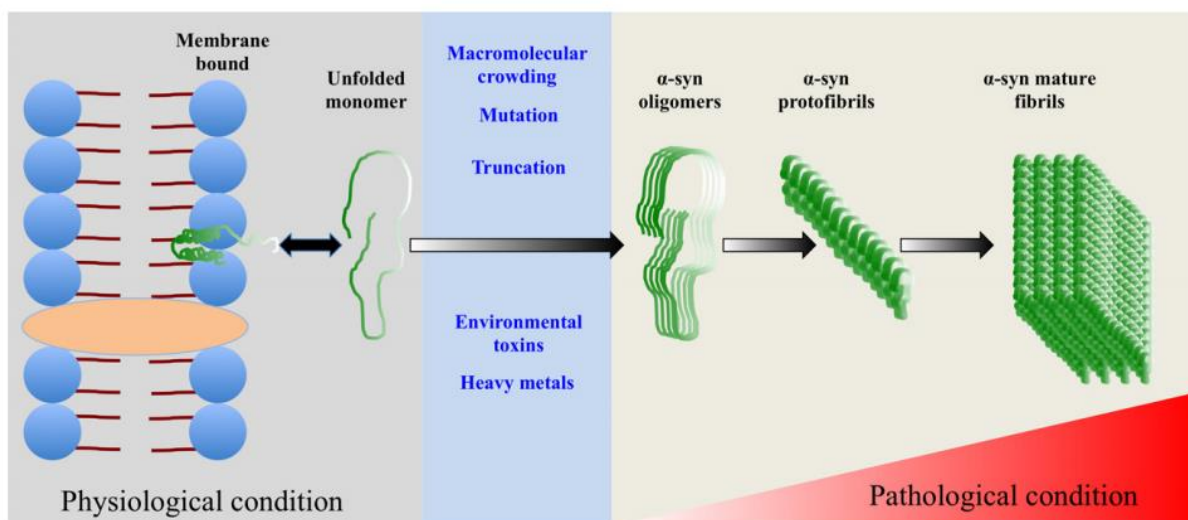


Figura 2. α Syn em condições fisiológicas e patológicas. Em condições fisiológicas, α Syn é um monômero solúvel não estruturado podendo estar associado às membranas com duas α -hélices. Sob condições patológicas, α Syn se dimeriza e subsequentemente se agrega em oligômeros/ protofibrilas, que por fim se formam em fibrilas maduras (Fonte: Vaikath et al., 2019).

3.3. O eixo intestino – cérebro

O eixo intestino–cérebro se apresenta como um sistema de sinalização bidirecional entre o trato gastrointestinal (TGI) e o SNC (STILLING; DINAN; CRYAN, 2014). O cérebro regula diversas atividades gastrointestinais como a motilidade, absorção, secreção de mucina, produção de hormônios e fluxo sanguíneo. De modo simultâneo, características ou condições intestinais podem afetar vários processos do cérebro, dentre elas, podemos citar o microbioma como um possível fator de susceptibilidade chave para distúrbios neurológicos, incluindo doença de Alzheimer e doença de Parkinson, dentre outras (CRYAN et al., 2020; DINAN; CRYAN, 2017; GHASAS; MAHER; KANTHASAMY, 2016; SPIELMAN; GIBSON; KLEGERIS, 2018).

Atualmente, essa área tem recebido grande atenção devido à várias descobertas envolvendo os campos da neurociência entérica, neuroimagem, microbiologia intestinal e interações microbianas do hospedeiro e, mais recentemente, sinalização microbiana intestinal-

cérebro (ARTIS; GRENCIS, 2008; COLLINS; BERCIK, 2009; FORSYTHE et al., 2010; FURNESS, 2012; MAYER et al., 2009; PEDRO AMORIM NETO et al., 2021; RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

O SNE é o sistema nervoso intrínseco do TGI e funciona de forma autônoma (DUTTA et al., 2019). Ele é composto por 200 a 600 milhões de neurônios que são classificados de acordo com sua morfologia e características eletrofisiológicas. Além disso, o SNE está em contato direto com a superfície intestinal, com o sistema imunológico associado ao intestino e com milhares de CEEs (FURNESS, 2012; WOOD, 2010).

As CEEs estão envolvidas tanto na regulação das funções digestivas através dos circuitos do SNE, quanto na regulação dos processos do SNC através da sinalização endócrina e parácrina aos aferentes vagais (MAYER, 2011). Estas células representam o primeiro nível de integração para os estímulos químicos e mecânicos provindos do lúmen intestinal. Determinadas CEEs possuem diversos receptores que respondem ao conteúdo luminal, incluindo nutrientes e metabólitos de microrganismos (HUGHES; SPERANDIO, 2008; RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009). Além disso, essas células possuem propriedades semelhantes a neurônios, visto que as mesmas são eletricamente excitáveis, apresentam receptores e proteínas neuronais típicas, como proteínas pré e pós-sinápticas, neurofilamentos e receptores de neurotrofina (BOHÓRQUEZ et al., 2014). Outra característica intrínseca das CEEs é sua comunicação direta com neurônios do SNE e com a luz do intestino, ou seja, elas se encontram entre o lúmen intestinal e o sistema nervoso, possibilitando a existência de uma via que permita que substâncias presentes no conteúdo intestinal interfiram na função nervosa (BOHÓRQUEZ et al., 2015).

A comunicação entre o SNC e o SNE se dá por meio de três mecanismos: transmissão sináptica através dos ramos do nervo vago, transmissão endócrina através dos hormônios e transmissão imunomediada através de citocinas do sistema imunológico (MAYER; TILLISCH; GUPTA, 2015; OCHOA-REPÁRAZ et al., 2011). O nervo vago participa da manutenção da homeostase do corpo, regulando o ritmo cardíaco, a motilidade do TGI, a produção das secreções do TGI e pâncreas e a produção da glicose hepática (MAYER; TILLISCH; GUPTA, 2015). Ele inerva o pescoço, tórax e abdômen, o que é fundamental para diversas funções vitais do nosso organismo. Além disso, o nervo vago controla as respostas imunitárias e a inflamação mediante a invasão de agentes patogênicos e de lesão tecidual (PAVLOV; TRACEY, 2012). Estudos *in vivo* confirmam a participação do nervo vago na comunicação entre o SNE e o SNC

(BRAVO et al., 2011; LYTE et al., 2006) e, devido a isso, seu papel em doenças neurodegenerativas com comportamento priônico vem sendo grandemente explorado.

3.4. Propagação da α Syn como mecanismo central no desenvolvimento da DP

Conforme visto, vários estudos *in vivo* (humanos e camundongos) confirmaram que os agregados de α Syn patológica desempenham um papel fundamental na patogênese da DP, comprometendo a atividade celular e induzindo a morte neuronal por vários mecanismos como por exemplo, a disfunção mitocondrial, comprometimento lisossomal, distúrbio da membrana celular, estresse do retículo endoplasmático e disfunção sináptica (LUNA et al., 2018; ROBERTS; BROWN, 2015; XU; PU, 2016; ZHANG et al., 2019). Além disso, evidências recentes suportam a ideia de que a α Syn patológica pode ser transferida de neurônios afetados para células neurais saudáveis (KORDOWER et al., 2008; LI et al., 2008; PAN-MONTOJO et al., 2010; RECASENS et al., 2014). Estes estudos sugerem que a α Syn incorretamente estruturada atua de uma forma semelhante a príons, podendo se propagar por todo o cérebro por meio de mecanismos de transmissão célula-célula.

Em 2003, Braak e colaboradores propuseram que uma das possíveis origens da DP esporádica seria partir do sistema nervoso periférico do intestino, com posterior propagação para o SNC, através do nervo vago (BRAAK et al., 2003a). Diversos estudos clínicos e experimentais suportam tal hipótese: portadores da DP apresentam distúrbios gastrointestinais bem antes dos sintomas motores (LEBOUVIER et al., 2009; NATALE et al., 2008); análise de tecidos do TGI de pacientes saudáveis e com DP indicaram a presença de α Syn no estômago, duodeno e cólon (SÁNCHEZ-FERRO et al., 2015; SHANNON et al., 2012); a α Syn estruturada incorretamente surge primeiramente nos neurônios do SNE e só depois são encontradas no cérebro (BRAAK et al., 2003a; HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010); a vagotomia bilateral diminui o risco de desenvolvimento da DP (SVENSSON et al., 2015). Acredita-se α Syn estruturada incorretamente se associa a α Syn nativa na célula receptora e passa a atuar como um núcleo de agregação, iniciando um processo de agregação da α Syn endógena que pode ser transmitido de uma célula para outra, e eventualmente levaria à formação de LBs e, consequentemente, a DP (ANGOT et al., 2012; DESPLATS et al., 2009; GOEDERT, 2015; HANSEN et al., 2011; KORDOWER et al., 2011; STEINER; ANGOT; BRUNDIN, 2011).

Atualmente, vários mecanismos de transmissão e propagação de núcleos de agregação fibrilares de α Syn de um neurônio para outro foram propostos, entre eles a penetração direta

pela membrana celular, endocitose ou transporte mediado por receptor, transferência direta de célula para célula através de nanotubos de tunelamento ou através de uma via transsináptica (Figura 3) (ABOUNIT et al., 2016; LUK et al., 2012; MAO et al., 2016; PAN-MONTOJO et al., 2010; ROSTAMI et al., 2017).

Embora os mecanismos de propagação não estejam totalmente elucidados, é bem aceito que controlar a disseminação de agregados de α Syn pode contribuir para o retardo da progressão da DP. Testes experimentais, realizado em camundongos, demonstraram que agregados de α Syn injetada na parede intestinal é capaz de migrar para o tronco cerebral por meio do nervo vago (KIM et al., 2019; S et al., 2014; VISANJI et al., 2014). Challis e colaboradores (2020) inoculando fibrilas pré-formadas de α Syn na parede duodenal de camundongos observaram um aumento na progressão da histopatologia de α Syn para o mesencéfalo e subsequentes distúrbios motores em camundongos idosos (CHALLIS et al., 2020). A α Syn expressa de forma heteróloga pode ser agregada *in vitro* para formar fibrilas semelhantes em estrutura às encontradas *in vivo* (VOLPICELLI-DALEY et al., 2014). Essas fibrilas pré-formadas (PFF) podem se espalhar de maneira semelhante a príons tanto em culturas neuronais *in vitro* quanto *in vivo* quando injetadas no cérebro de camundongo. Além disso, a injeção de fibrilas α Syn na parede intestinal de camundongos converte α Syn endógena em espécies patológicas que se espalham para o cérebro através de fibras vagais que inervam o intestino, causando disfunção comportamental (HOLMQVIST et al., 2014; KIM et al., 2019). Além disso, biópsias de tecido TGI de pacientes com DP encontraram acúmulo de α Syn no estômago, duodeno e cólon em células do SNE (SHANNON et al., 2012; SÁNCHEZ-FERRO et al., 2015). Estes estudos corroboram com a hipótese inicial de Braak (2013). No entanto, ainda não se sabe se o processo de agregação da α Syn pode se originar nas CEEs, e não diretamente nos neurônios do SNE. Portanto, resta elucidar se/como agregados de α Syn presentes nas CEEs podem migrar para neurônios adjacentes.

Diante do exposto, e sabendo que as CEEs expressam α Syn (CHANDRA et al., 2007), acreditamos que toxinas ou outras influências ambientais no lúmen do intestino poderiam afetar a expressão ou o dobramento de α Syn nestas células intestinais, com posterior migração da proteína estruturalmente incorreta para níveis superiores do sistema nervoso, semelhante a um príon, desencadeando uma cascata que leva ao desenvolvimento da DP.

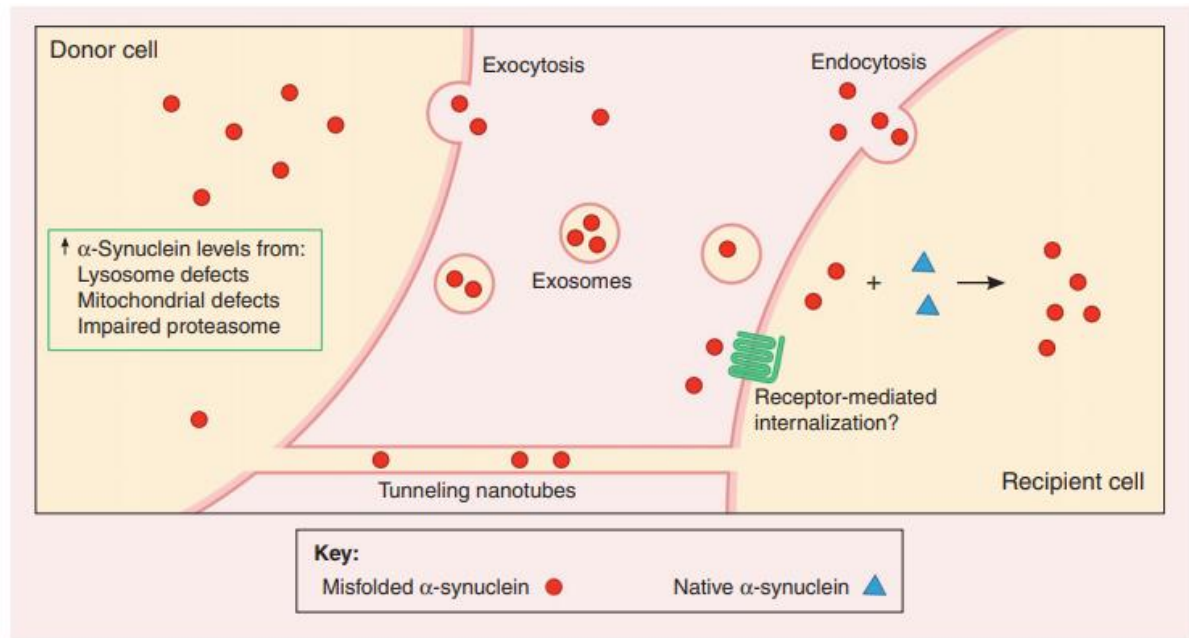


Figura 3. Possíveis rotas para a transferência de α Syn de célula para célula. A exocitose de um neurônio doador seguida por endocitose por um neurônio receptor é uma via possível para a transferência de α Syn entre as células. Não podemos excluir que um receptor nos neurônios receptores poderia facilitar essa transferência, embora ainda não haja evidências experimentais de endocitose mediada por receptor. O transporte mediado por exossomo é outra rota de transferência de α Syn de célula para célula. O tunelamento de nanotubos, que já foi mostrado para transportar organelas e proteínas como príons entre as células, continua sendo um possível mecanismo inexplorado para a transferência de α Syn de célula para célula. α Syn dobrado incorretamente (vermelho) da célula doadora pode semear a conversão de α Syn monomérico (verde) em α Syn dobrado incorretamente (conforme ilustrado na célula receptora). O comprometimento da atividade proteassomal ou lisossomal e o comprometimento da função mitocondrial são eventos que podem levar a aumentos na concentração de α Syn intracelular. Esta concentração tem impacto na taxa de transferência de célula a célula de α Syn (Fonte: Hansen e Li, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as atividades experimentais foram desenvolvidas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizada no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas – SP. Os ensaios realizados contaram com o apoio das seguintes facilities do centro de pesquisa: Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC), Laboratório de Cultura de células e Laboratório de Organismos geneticamente modificados.

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos FVB machos (7-8 semanas de idade) para os testes experimentais *in vivo*. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB- Unicamp) e mantidos, até o momento da realização dos experimentos, no depósito de animais do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), sob condições específicas livres de patógenos em um ambiente com temperatura e umidade controladas sob um ciclo claro-escuro de 12 horas e tiveram acesso *ad libitum* a comida e água. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA-CNPEM). (Protocolo nº 69 – Anexo 10.1).

4.2. Linhagens celulares

Neste estudo, foram utilizadas células STC-1 (células tumorais neuroendócrinas intestinais) obtidas do repositório America Type Culture Collection (ATCC CRL-3254) e células SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) (ATCC CRL-2266). As culturas celulares foram mantidas, respectivamente, em meio DMEM e DMEM/F12 (Gibco) suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (PSA) (Gibco), a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Além disso, utilizamos iPSCs humanas para a produção de organoides cerebrais, conforme descrito em Fonseca et al., 2021.

Para isso, eritroblastos de três controles normais (Wild Type - WT) foram infectados com o vírus Sendai (Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e mantidos em meio StemSpan (StemCell Technologies) contendo 50 ng / ml de SCF, 2 U / ml de EPO, 1 µM de dexametasona, 40 ng / ml de IGF1, 10 ng / ml de IL3 e 10 µg / ml de gentamicina. Quatro dias após a infecção, eritroblastos foram semeados nos alimentadores

iMEF e cultivados usando meio hESC. Após 3-4 semanas, os clones iPSC foram escolhidos manualmente e foram propagados clonalmente em alimentadores. Os clones de iPSCs foram normalmente expandidos em camadas alimentadoras de iMEF usando meio hES compreendendo DMEM-F12, 10% KSR (Invitrogen), 100 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 100 mM de L-Glutamina (Invitrogen), 100 μ M de beta-mercaptoetanol (Gibco), 4 ng / ml de FGF básico (Peprotech) e repicadas usando dispase (Life Technologies). Para cultura livre de camada alimentadora, as células foram cultivadas em placas revestidas com matrigel para hESC (Corning), mantidas em mTeSR1 (StemCell) e repicadas usando dispase.

4.3. Geração e obtenção de organoides cerebrais

O método de geração dos organoides cerebrais seguiram os protocolos de Lancaster et al. (2013), com pequenas modificações (FONSECA et al., 2021). No dia 0 da cultura, as células iPSCs foram dissociadas por tratamento com acutase (Millipore) para gerar células individuais. No total, 9000 células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços de baixa aderência (Corning) em mTeSR1 com 50 μ M de inibidor da proteína quinase associada a Rho (ROCK-inibitor) (Peprotech). No dia 2, o meio foi substituído por meio hES contendo FGF (4 ng / ml) 50 μ M de ROCK-inibitor ROCK) (Peprotech). Os corpos embrióides foram alimentados em dias alternados durante 6 dias e depois transferidos para placas de 24 poços de baixa adesão (Corning) em meio de indução neural contendo meio (DMEM) / F12, suplemento 1: 100 N2 (Invitrogen), Glutamax (Invitrogen), MEM-NEAA (Invitrogen) e 1 μ g/ml de heparina (Sigma-Aldrich). Estas estruturas começaram a formar tecidos neuroepiteliais, que foram alimentados em dias alternados durante 5 dias. No dia 11, os tecidos foram transferidos para gotículas de 25uL de Matrigel (Corning). Estas gotículas gelificaram a 37 ° C e foram subsequentemente cultivadas em meio de diferenciação contendo uma mistura 1:1 de DMEM/F12 e meio Neurobasal acrescido do suplemento N2 (1: 200) (Invitrogen), suplemento B27 (1: 100) sem vitamina A (Invitrogen), beta-mercaptoetanol (Gibco) 50 μ M, 2,5 μ g/ml insulina (Sigma-Aldrich), Glutamax 1%, MEM-NEAA 0,5% e penicilina e estreptomicina 1% (Invitrogen). Após 4 dias de crescimento estável, as gotículas de tecido foram transferidas (não mais que 20) para placas de baixa adesão de 100 mm (Corning) e mantidas sob agitação (85 RPM) em um agitador orbital contendo meios de diferenciação como acima, acrescido de suplemento B27 com vitamina A (Invitrogen). Os organoides foram utilizados 60 dias após a diferenciação.

4.4. Clonagem, expressão e purificação de α Syn monomérica e fibrilar

Todo o protocolo de clonagem, expressão e purificação da α Syn WT humana (H α Syn WT) no pET21b foi baseada no livro “*AlphaSynuclein: Methods and Protocols*” do autor Tim Bartels, e pode ser encontrado no capítulo 20 intitulado “*Expression and Purification of Untagged α Synuclein*” (Bartels, 2019).

Para as culturas de *E. coli*, tanto da cepa DH5 α quanto BL21(DE3), foi usado meio de cultura Luria Bertani (LB), composto por 10 g/L de peptona (Sigma Aldrich), 5 g/L de extrato de levedura (Sigma Aldrich) e 10 g/L de cloreto de sódio (Merck). Para o meio ágar- sólido, foi adicionado 20 g/L de ágar bacteriológico (KASVI). Todos os meios foram autoclavados por 20 min à 120°C antes do uso. Para a produção do inserto de DNA da α Syn WT humana, lançou-se mão da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A biblioteca usada para a amplificação do gene de interesse foi a de extrato de cérebro fetal humano. Os *primers* usados para a α Syn estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers usados para a amplificação dos insertos de DNA da α Syn WT.

Proteína	Primer	Sequência (5' - 3')
α Syn	HSnca.M1.HindIII.FOR	CATCTAAGCTTGCCATGGATGTATT CATGAAAGGAC
α Syn	HSnca.A140.SmaI.REV	ATGACACCCGGGGGCTTCAGGTTC GTAGTCTTGATAC

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler, com Taq HiFi Buffer 1X, MgCl₂ 1,25 mM, dNTP 0,2 mM, 10 pmol dos *primers forward* e *reverse* específicos (Tabela 1), 0,5 μ L de *Taq Platinum* DNA Polimerase – (Invitrogen) e DNA molde, com volume total, por tubo, de 50 μ L. A PCR foi programada com ciclagem seguinte ciclo: 94°C - 2:00 min [1X]; 94°C - 30 s, 60°C – 30 s, 72°C - 1:00 min [35X]; 72°C - 5:00 min [1X]. O resultado da amplificação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo *Sybr Safe* (Thermo Fisher). Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados com o kit *PCR Purification* (QIAGEN) ou kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). As células de *E. coli* linhagem DH5- α termo-competentes foram transformadas com a reação de ligação em pET21b. As células transformadas foram plaqueadas

em 20 ml de meio de cultura LB sólido contendo 20 µl do antibiótico de seleção e foram mantidas a 37°C *overnight*. Os clones foram confirmados por PCR de colônia e sequenciados.

Os plasmídeos pET21b gerados contendo os genes que codificam a α Syn humana selvagem (WT) e foram utilizados para a transformação da *E. coli* cepa BL21(DE3). Culturas contendo 50 mL de meio LB líquido, 100 µg/mL de ampicilina e 1 colônia de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo contendo a respectiva α Syn, foram mantidas a 37°C, 200 rpm, *overnight*. No dia seguinte, foram preparados dois inóculos, contendo 25 mL da cultura cultivada *overnight*, juntamente com mais 500 mL de meio LB e antibiótico, os quais foram mantidos a 37°C, 200 rpm até que o meio de cultura atingisse densidade óptica (D.O.) de ~0,6. Nesta etapa, as culturas foram induzidas com a adição de 1 mM de IPTG (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) durante 4h a 37°C, 200 rpm. Ao final do processo, o meio de cultura contendo as bactérias com as proteínas expressas, foi centrifugado por 45 min à 9000 g à 4°C, no qual foram coletados os *pellets* de bactérias contendo a H α SynWT.

As células obtidas a partir de um litro de indução, foram congeladas à -20°C *overnight*, sendo esse processo necessário para a lise bacteriana. No dia seguinte, os *pellets* foram descongelados e ressuspensos em 20 mL tampão A contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 25 mM e EDTA 1 mM pH 8,0. As células em suspensão foram incubadas em banho térmico à 95°C durante 15 min para complementar o processo de lise das bactérias, após isso as soluções foram resfriadas à 4°C e centrifugadas por 45 min à 20000 g à 4°C, no qual o sobrenadante, contendo as proteínas alvo, foi coletado e filtrado em filtro 0,45 µm. O volume do lisado foi ajustado para 100 mL com tampão A.

Para a purificação das proteínas recombinantes, usou-se uma coluna de troca-aniônica HiScreen Q HP (GE HealthCare) contendo 4,7 mL de volume de coluna (VC), previamente equilibrada com tampão A, no qual a amostra foi injetada sob fluxo de 1,0 mL/min com o uso do equipamento Akta FPLC (GE HealthCare). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão A, sob mesmo fluxo de 1,0 mL/min, até que o sinal de UV e a condutividade estivessem estabilizados, em seguida iniciou-se o processo de eluição da proteína com um gradiente de 0 a 100% de tampão B em 15 VC, no qual o tampão B era composto por tampão A + NaCl 1 M. Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 13%.

As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas, concentradas em concentrador UltraFree 4, 10 kDa (Millipore) e submetidas a purificação por exclusão molecular em sistema Akta FPLC (GE HealthCare). A coluna Superdex 200 16/60 prepgrad

(GE Healthcare) foi equilibrada em tampão contendo acetato de sódio 50 mM, pH 7,4 e toda esta etapa de purificação ocorreu sob fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 2 mL foram coletadas e posteriormente analisadas por SDS-PAGE 13%.

Após a purificação por cromatografia de exclusão molecular a amostra foi dialisada contra 2 L de tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e KCl 150 mM, overnight à 4°C sob agitação branda, com o uso de membranas SpectraPor (MWCO 6 – 8.000). Este foi o tampão recomendado para os posteriores experimentos com a H α SynWT.

4.5. Formação das fibrilas pré-formatadas de α Syn

A formação das fibrilas pré-formatadas (PFFs) foi realizada seguindo o protocolo descrito por Abounit (2016). 280 μ M da proteína foi incubado em tampão contendo Tris-HCl 50mM, pH 7,5 e KCl 150mM, a 37°C durante 7 dias em agitação continua em um termo agitador em 600rpm. Após este período, a solução foi centrifugada duas vezes a 20000g por 30 min e o *pellet* ressuspendido em PBS. Uma vez isolados, as fibras foram sonicadas durante 5 min com amplitude de 80%, e ciclo de pulso de 5 s ligado e 2 s desligado para formação das PFFs. Para os ensaios, as PFFs de α Syn foram marcados com o Protein Labeling Kit contendo o fluoróforo Alexa- Fluor™ 488, 555 ou 633 (Thermo Fisher Scientific) na razão de 1:2, de acordo com instruções do fabricante.

4.6. Produção da α Syn-GPF

A amplificação do gene *SNCA*, que codifica a proteína H α Syn WT, foi realizada através de PCR, utilizando-se uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano como molde. Os oligonucleotídeos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do gene *SNCA* (α Syn).

Proteína	Primer	Sequência (5' - 3')
α Syn WT	HSnca.M1.HindIII.FOR	CATCTAAGCTTGCCATGGATGTATT CATGAAAGGAC
A α Syn WT	HSnca.A140.SmaI.REV	ATGACACCCGGGGGCTTCAGGTTC GTAGTCTTGATAC

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf Master Cycler, e seus produtos foram purificados com o kit *PCR Purification* (QIAGEN) ou kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme descrito anteriormente. O inserto amplificado da α Syn e o vetor pEGFP-N2 foi clivado pela enzimas de restrição: HindIII e SmaI, para que possuíssem extremidades complementares e se ligassem, posteriormente, um ao outro. As reações de digestão foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% contendo *Sybr Safe*. Os fragmentos correspondentes aos DNAs de interesse produtos das reações de clivagem foram então recuperados do gel e purificados utilizando o kit *Gel Extraction* (QIAGEN).

As células de *E. coli* linhagem DH5- α termo-competentes foram transformadas com a reação de ligação. As células transformadas foram plaqueadas em 20 ml de meio de cultura LB sólido contendo 20 μ l do antibiótico de seleção e foram mantidas a 37°C *overnight*.

Para confirmar que a sequência de DNA que codifica a α Syn foi inserida no vetor, foram coletadas de 7 à 10 colônias transformantes, segundo o item 3.1.2.4, para realizar a PCR de colônia. Para cada construção, foram selecionados e sequenciados dois clones confirmados por PCR de colônia. Os clones selecionados foram cultivados em 4 mL de meio LB líquido, com o devido antibiótico, a 37°C *overnight*, 200 rpm. Após esse período, foi utilizado o kit *NucleoSpinPlasmid* (Macherey-Nagel), para a extração do DNA plasmidial das colônias selecionadas, para que fossem sequenciadas em sistema *Applied Biosystems 3500XL*, a fim de confirmar a integridade da sequência de nucleotídeos do gene em questão.

4.7. Identificação e caracterização da α Syn

Para confirmação da identificação e caracterização estrutural, as proteínas α Syn monomérica e fibrilar (PFF), foram submetidas aos ensaios biofísicos de espalhamento dinâmico de luz (DLS), dicroísmo circular (CD) e *Western Blotting* (WB).

4.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Com o intuito de avaliar o raio hidrodinâmico e os tipos de populações de proteína nas amostras de α Syn, tanto nas suas formas monoméricas e PFFs, as amostras foram submetidas a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) equipado com laser He-Ne 632,8 nm, em uma célula de quartzo com um ângulo de espalhamento de 90°. Para cada amostra, uma medida corresponde a 15-100 aquisições (de acordo com a concentração da amostra) de 10 segundos, com atenuador

automático (Atenuação 11). A distribuição do tamanho da intensidade, o raio da média Z (Z-ave) e o índice de polidispersidade (PdI) foram obtidos a partir da função de autocorrelação usando o “Modo de Análise de Proteína” para a amostra de proteína. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, em cubeta de quartzo, no qual as amostras foram previamente centrifugadas a 14000rpm a 4 °C por 10 min. As amostras foram analisadas na concentração final de 6,2 mg/mL em um volume final de 30 uL. O tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e KCl 150 mM. Os dados foram coletados através do software Zetasizer Nano v3.30.

4.7.2. Dicroísmo Circular (DC)

Para analisar a estruturação secundária da proteína, ambas amostras de α Syn, foram submetidas ao ensaio de dicroísmo circular (DC). A Espectropolarimetria de Dicroísmo circular foi realizada no UV distante (260 - 190 nm), por meio do uso do equipamento Jasco J-850 (JASCO). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, em cubeta de quartzo com caminho 12 ótico de 0,1 mm. As amostras utilizadas estavam na concentração final de 10 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e KCl 150 mM. Para cada medida foram coletados 20 espectros utilizando o software SpectraManager (JASCO) os dados foram tratados utilizando o software OriginPro 8.5 (Origin Corporation). Por fim, através da página Dichroweb, foram feitas as deconvoluções dos espectros obtidos. Os espectros de CD foram adquiridos a 10°C ou 37 ° C usando uma célula de comprimento de caminho de 0,1 mm em intervalos de 1 nm, tempo de resposta de 4 s e velocidade de varredura de 100 nm / min, na faixa de comprimento de onda de 195 a 260 nm. Cada ponto de dados foi gerado calculando a média de dez acumulações.

4.7.3. Western Blotting

Para realização do *Western Blotting* (WB), 30 μ g de proteína foram aplicadas em gel SDS-PAGE 13%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) durante 15min sob uma voltagem de 16V. Após a transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (5% de albumina 5% em TBST 1x) por 1 hora e posteriormente incubada *overnight* a 4°C em agitação com anticorpo primário anti- α Syn humana (ThermoFisher, rabbit, 1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST 1x, e incubadas com o anticorpo secundário (Souza-Cruz, anti-rabbit, 1:5000), por 1h em temperatura ambiente. A detecção

imunológica foi realizada utilizando um mix de reação quimioluminescente Thermo Plus Solution (BioRad). A quantificação de proteínas foi realizada utilizando uma imagem digital de 8bits, a partir de uma análise densitométrica com o auxílio do software ImageJ.

4.8. Internalização de PFFs de α Syn em organoides cerebrais

Os organoides cerebrais foram mantidos em constante agitação em meio de cultura específico e tratados com 1 μ M de PFFs de α Syn Alexa-633 por 24 e 48h. Em seguida, os tecidos foram fixados em PFA 4% por 4 horas a 4 °C seguido por três lavagens em PBS 1X por 10 min e incluídos em agarose de baixo ponto de fusão 4% (Sigma-Aldrich) em 1x PBS. Seções de tecido de 100 μ m foram obtidas usando um vibrátomo (Leica VT1000 S Vibratome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), seguindo as seguintes configurações: velocidade: 0,1 mm/s; amplitude: 0,6 mm; frequência 06. Para caracterização dos organoides, realizamos a técnica de imunofluorescência.

4.9. Imunofluorescência com fatias de organoides

As seções de 100 μ m foram permeabilizadas em 0,5% de Triton X-100 por 10 min e bloqueadas com 5% de albumina bovina e 0,5% de soro de cabra por 1 hora. Em seguida, as fatias foram incubadas com anticorpos primários (overnight a 4°C), MAP2 (1:500; Invitrogen) para marcação de citoesqueleto neuronal e SOX2 (1:500, Invitrogen) para marcação do fator de transcrição presente nas células progenitoras neurais. Após lavagens, as fatias foram incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 488, 594 (Thermo Fischer, 1: 250). As seções foram lavadas três vezes com PBS e montadas em lâminas usando VectaShield contendo DAPI (Vector laboratories). Para analisarmos o tratamento com PFFs de α Syn, as seções foram incubadas com faloidina 488 (1:500). Toda a análise foi feita em pelo menos 10 seções em quatro organoides diferentes em um microscópio confocal Leica SP8.

4.10. Administração de PFFs de α Syn em intestino de camundongo

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina / xilazina (80 mg/kg de peso corporal de cetamina e 10 mg/kg de xilazina peso corporal) através de injeção intraperitoneal. Resumidamente, o corpo do animal foi posicionado com a barriga para cima e foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm ao longo da linha média corporal com subsequente exposição do intestino. Um corte transversal foi realizado na porção cranial do duodeno e um clameamento na região distal. No lúmen da porção cranial exposta foi injetado

1mL de PBS contendo 1 μ M de PFFs de α Syn Alexa-633 e um novo clampeamento. A injeção foi conduzida usando uma seringa de Hamilton de 10 mL. 30 minutos após as injeções, os animais foram eutanasiados e as áreas de interesse foram coletadas. Animais do grupo controle também foram submetidos a injeções com um volume equivalente de PBS nos mesmos locais.

A preparação e secção do material foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Snippet et al., 2011. O duodeno foi lavado duas vezes com fixador para remover o conteúdo luminal e depois incubado em PFA a 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, transferimos a amostra para uma placa de Petri contendo PBS, e removemos o excesso de gordura e tecido conjuntivo com o auxílio de uma pinça. Abrimos cada pedaço ao longo de seu comprimento com uma tesoura para produzir um pedaço plano de tecido intestinal de ~ 1 cm². Em seguida os pré-cortes foram incorporados em agarose de baixo ponto de fusão a 4%. Os tecidos foram fatiados em Vibratome VT1000S (Leica) (velocidade: 1 mm/s; amplitude: 0,9 mm e frequência de vibração: 65 Hz). Os cortes foram transferidos para lâminas, e foram submetidos a técnica de imunofluorescência (conforme já descrito anteriormente). As seções foram incubadas com anticorpos primários nas seguintes diluições: faloidina (1:500) e anti- α Syn (1:250, Abcam). Os anticorpos secundários usados foram anti-mouse Alexa-488 (1:500; Thermo-Fischer). As seções foram lavadas três vezes com PBS e montadas em lâminas usando VectaShield contendo DAPI (Vector laboratories).

4.11. Ensaio de internalização e indução de formação de agregados de α Syn em cultura celular

Para os ensaios de internalização e para avaliar se núcleos de agregação de α Syn fibrilar podem iniciar a agregação da α Syn endógena (GFP), células enteroendócrinas (STC-1) e neuronais (SH-SY5Y) foram plaqueadas separadamente em placas de 96 poços com lamínulas de vidro estéreis a uma densidade de 4×10^5 células. Após 24h, as células foram transfectadas com FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) e 3 μ g de DNA plasmidial de α Syn WT GFP. Após 48h, as células foram tratadas com PFFs de α Syn marcada com Alexa- Fluor 555 (PFFs de α Syn 555), nas concentrações de 1 e 3 μ M, por 24h, fixadas com PFA 4% e analisadas em microscopia confocal (Figura 4). Para análise, foram contabilizadas a quantidade de proteína dentro das células utilizando uma imagem digital de 8bits, com o auxílio do software ImageJ.

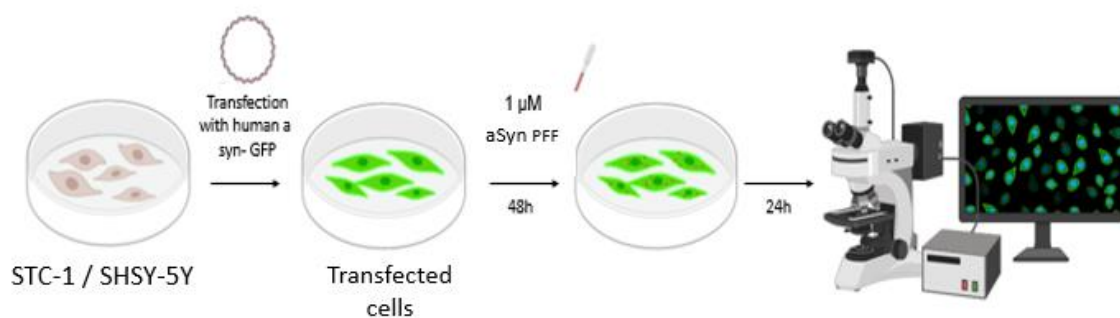


Figura 4. Ilustração esquemática do desenho experimental do ensaio de internalização e indução de formação de agregados de α Syn em células STC-1 e células SH-SY5Y. Células STC-1 e SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 6 poços, após a adesão, as células foram transfectadas com α Syn GFP e após 48h, foram tratadas com PFFs de α Syn e analisadas por imunofluorescência e microscopia confocal.

4.12. Endocitose monitorada com a sonda FM1-43

Após 24h de plaqueamento, as células STC-1 e SH-SY5Y foram incubadas por 10 min com 16 μ M da sonda fluorescente FM1-43fx (Invitrogen) em tampão HEPES (NaCl 142,2 mM, KCl 5,4 mM, NaH_2PO_4 1,0 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5,6 mM, MgSO_4 0,8 mM and CaCl_2 1 mM). A sonda FM1-43 permite uma visualização direta e dinâmica do ciclo de vesículas de endocitose, dessa forma, é usada para marcar e monitorar vesículas sinápticas, grânulos secretórios e outras estruturas endocíticas em uma variedade de preparações vivas (GAFFIELD; BETZ, 2007). Concluído o tempo de incubação com a sonda, iniciou-se o registro das imagens, por um minuto antes e por sessenta minutos após o tratamento com 1 μ M de PFFs de α Syn. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens, utilizado o software de domínio público ImageJ. Os dados são mostrados como $(\Delta F/F_0)$, ou seja, a variação de intensidade de fluorescência ($\Delta F = F - F_0$) dividida pela fluorescência basal (F_0) de forma a normalizar as variações de concentração do indicador fluorescente nas células. Todas as imagens foram adquiridas usando uma objetiva de 63X, 1,4 NA, excitação em 488 nm e emissão em 505-525 nm. Neste experimento também foi realizado o ensaio de imunofluorescência.

4.13. Sinalização intracelular de Ca^{2+}

Para investigar a ação das PFFs de α Syn sobre a sinalização de cálcio intracelular em células enteroendócrinas e neuronais, ambas linhagens celulares foram cultivadas em placas multi-poços com lamínulas. As células foram incubadas em tampão HEPES (NaCl 142,2 mM,

KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5,6 mM, MgSO₄ 0,8 mM, and CaCl₂ 1 mM) contendo a sonda FLUO-4/AM (6 μ M) por 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão e levadas para observação em microscópio confocal. Os sinais de Ca²⁺ foram monitorados em células individuais durante a estimulação com 1 μ M de PFFs de α Syn por 5 minutos. A emissão de fluorescência em resposta a detecção de Ca²⁺ intracelular foi monitorada utilizando a objetiva de 63x 1,4 NA, excitação em 488 nm e emissão em 505-525 nm para ambos os marcadores. Foram coletadas de 1-5 imagens por segundo. Os dados são expressos como fluorescência / fluorescência de linha de base x 100% dos valores médios de amostras de 3 réplicas biológicas (pelo menos 25 células foram analisadas individualmente).

4.14. Transferência de PFFs de α Syn entre STC-1 e SH-SY5Y

Células STC-1 e SH-SY5Y (4×10^5) foram plaqueadas em poços individuais e, após a adesão, células STC-1 foram tratadas com 1 μ M de PFFs de α Syn 555 (vermelha) e células SH-SY5Y foram tratadas com 1 μ M de PFFs de α Syn 88 (verde). Decorrido 24h de incubação, as células enteroendócrinas foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e 1×10^5 células foram transferidas para os poços contendo células neuronais tratadas com PFFs de α Syn 488. As coculturas foram mantidas por 4, 24, 48 e 72h e analisadas por citometria de fluxo e imunofluorescência em um microscópio confocal (Figura 5). Para as análises em citometria, as células foram lavadas três vezes com tripsina a 0,1% (Gibco), para remover os conjuntos ligados à membrana plasmática, e foram destacadas por pipetagem e, em seguida, passadas por filtros de células de náilon de 40 μ m estéreis (BD Falcon™) a fim de obter suspensões de uma única célula. As células foram fixadas usando PFA a 4%. A porcentagem de células Alexa-488, Alexa-555-positivas ou células positivas para ambos os corantes em cada ponto de tempo foram pontuadas usando Novocyte flow cytometer (ACEA) acoplado a um computador e os dados coletados foram analisados pelo software NovoExpress.

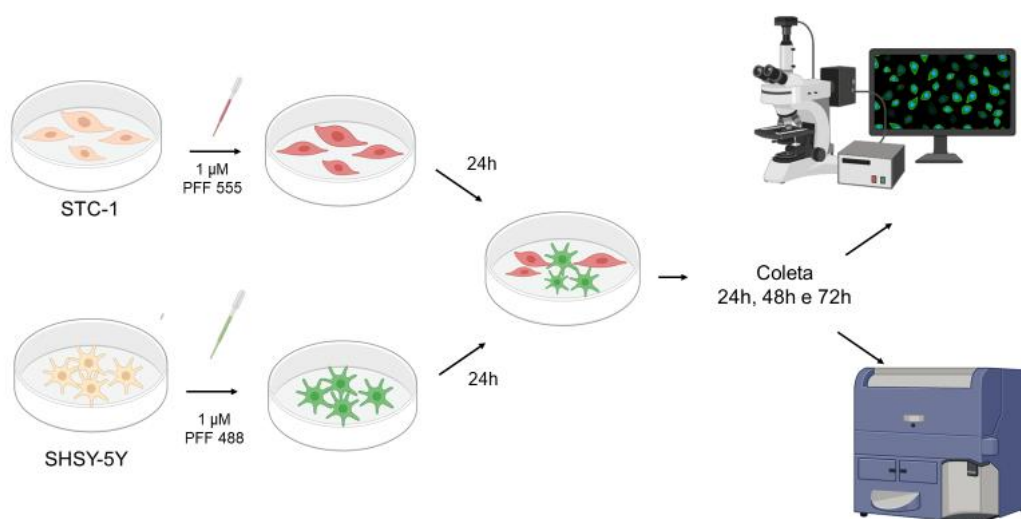


Figura 5. Esquema representativo do delineamento experimental do ensaio de transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais. Para analisar se o contato célula-célula se faz necessário para a transferência de grânulos, as células STC-1 e SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 6 poços, sendo 03 poços cada linhagem. Após 24h, as STC-1 foram tratadas com PFFs de α Syn 555 e as SH-SY5Y com PFFs de α Syn 488. Após 24h, as linhagens celulares foram misturadas e as amostras foram coletadas após 4, 24h, 48h e 72h para ensaio de citometria e imunofluorescência.

4.15. Ensaio de co-cultura em filtros *transwell*

Células STC-1 e SH-SY5Y foram plaqueadas em 02 placas de 06 poços com laminula, numa confluência de 1×10^5 . Após a adesão, 03 poços de cada tipo celular foram carregadas com 1 μ M PFFs de α Syn 555, e após 24h, as células contendo α Syn foram tripsinizadas, e transferidas para filtros *transwell* de 23,1 mm com inserção de membrana de tereftalato de polietileno (PET) de poros de 0,4 μ m (Falcon) que foram então colocados dentro de placas de 06 poços, e estes foram colocados sobre os outros 3 poços contendo células que não receberam tratamento.

Para facilitar o entendimento, nomearemos as células tratadas com PFFs de α Syn como doadoras e células não-tratadas como receptoras. Dessa forma células STC-1 tratadas com PFFs de α Syn 555 (doadoras) foram transferidas para filtros *transwell* que foram colocados sob os poços contendo células SH-SY5Y sem tratamento (receptoras). O mesmo foi feito com células SH-SY5Y tratadas com PFFs de α Syn 555 (doadoras), que foram transferidas para filtros *transwell* que foram posicionados sob os poços contendo células STC-1 sem tratamento (receptoras). As culturas foram mantidas por 24, 48 e 72h e analisadas por imunofluorescência e citometria, como descritos anteriormente (Figura 6).

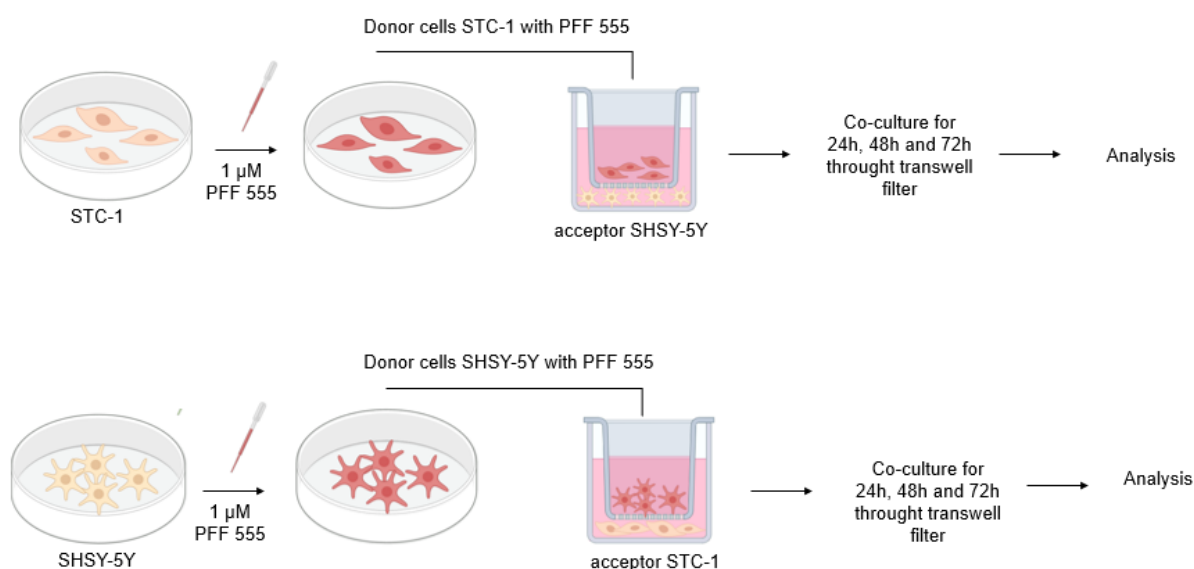


Figura 6. Esquema representativo do ensaio de transferência de PFFs de α Syn independente do contato célula-célula. Para analisar a transferência de PFFs de α Syn entre células sem o contato celular, nos plaqueamos células STC-1 e SH-SY5Y em placas de 6 poços, sendo 03 poços cada linhagem. Após 24h, ambas células foram tratadas PFFs de α Syn 555. Após 24h, células STC-1 carregadas com PFFs de α Syn (doadoras) foram transferidas para filtros *transwell* que foram colocados sob os poços contendo células SH-SY5Y sem tratamento (receptoras). O mesmo processo foi feito utilizando células SH-SY5Y carregadas com PFFs de α Syn (doadoras), foram transferidas para filtros *transwell* que foram posicionados sob os poços contendo células STC-1 sem tratamento (receptoras). As amostras foram coletadas após 24h, 48h e 72h de co-cultivo para ensaio de citometria e imunofluorescência.

4.16. Silenciamento (knockdown) da proteína Rab35

Células STC-1 (3×10^5) foram plaqueadas e transfectadas com 10, 25 e 50ng de siRNA (*small interfering RNA*) para Rab35 (siRNAs Invitrogen Silencer® pré-concebidos Silencer® (Thermo Fisher, EUA) *sense* e *antisense oligonucleotides* (ID 176638), utilizando FUGENE, segundo especificações do fabricante. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com tampão de lise (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, EDTA 5 mM) suplementado com inibidor de protease (protease inhibitor cocktail, Sigma). A quantificação de proteínas totais da amostra foi realizada pelo método de espectrofotômetro com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad). As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por imunoblotting com os anticorpos anti-Rab35 (1:1000, Abcam) e anti- β actina (1:5000, Souza-cruz). As análises densitométricas foram realizadas com o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). O ensaio também foi avaliado

por meio de imunofluorescência. As células STC-1 foram transfectadas com o plasmídeo pEGFP, em seguida, silenciadas para Rab35. As amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-Rab35 (rabbit, 1:150, Abcam) e anticorpo secundário (anti-rabbit Alexa 555, 1:500, Abcam). Apenas células GFP-positivas foram analisadas. A quantificação da intensidade de fluorescência de PFFs e a análise de co-localização em células controle e silenciadas foram realizadas às cegas.

4.17. Transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais

Para estudar se o silenciamento da Rab35 em células intestinais afeta a transferência de PFFs de α Syn entre as duas linhagens celulares (células intestinais e células neuronais), células STC-1 foram plaqueadas e silenciadas para Rab35 por 24h. Em seguida, as células foram tratadas com PFFs de α Syn marcadas com Alexa-633 por 24h, posteriormente, as células foram soltas e transferidas para poços contendo células SHY5Y. A co-cultura foi mantida por 24h. Após esse tempo, o citoesqueleto de actina foi marcado com faloidina- 488 e os núcleos com DAPI e analisadas por microscopia confocal.

4.18. Transferência de PFFs de α Syn entre células enteroendócrinas

Para estudar a transferência célula-célula de α Syn entre células intestinais silenciadas (ou não) para Rab35, usamos um repórter codificado geneticamente gentilmente doado pela Dra. Eleanna Kara (University College London, London, UK). Inspirado por um sistema desenvolvido anteriormente para estudar a propagação de tau (Wegmann et al., 2015), esse constructo codifica GFP-2a-aSinucleína-RFP sob o promotor CMV dentro do vetor de expressão de mamífero pcDNA3.1. Após o silenciamento por 24h, as células foram transfectadas com o plasmídeo. A proteína traduzida é clivada na posição 2a para produzir duas proteínas filhas, GFP e α Syn -RFP. α Syn-RFP pode então se espalhar para células vizinhas, sem transferência concomitante de GFP. As 2 populações celulares (células doadoras e receptoras de transferência de α Syn) poderão, portanto, ser identificadas por suas cores: as células que expressam α Syn geradas através da expressão do plasmídeo são positivas para fluorescência de GFP e RFP, enquanto as células que receberam α Syn por transferência serão positivas apenas para fluorescência RFP. As amostras foram coletas 3, 5 e 7 dias após co-transfecção e analisadas por imunofluorescência e microscopia confocal.

4.19. Avaliação da participação da Rab35 no processo de transferência de α Syn entre células enteroendócrinas

A fim de caracterizar de forma mais detalhada a participação da Rab35 no processo de transferência de α Syn entre as células, células STC-1 foram co-transfectadas com siRNA para Rab35 e um repórter, pGFP- N2. Em seguida, as células foram tratadas por 4 e 24h com α Syn PFF. O ensaio foi analisado pela técnica de imunofluorescência, conforme já descrito anteriormente, utilizando o anticorpo primário Rab35 (1:100) e anticorpo secundário, anti-habitt (1:500).

4.20. Avaliação da participação de lisossomos no processo de transferência de α Syn

Uma das evidências é que na ausência da RAB35, as vesículas contendo PFFs de α Syn podem ser direcionadas pra degradação por vias internas. Para verificar se existe a participação dos lisossomos neste processo, visto que estas organelas estão envolvidas no processo de degradação de proteínas fibrilares (Jakhria, et al., 2004), células STC-1 e SH-SY5Y foram incubadas com as PFFs de α Syn e posteriormente os lisossomos foram marcados por 30 minutos na diluição de 1: 100, com o marcador LysoTracker DN-99 (Thermo Fischer), em seguida, as células foram fixadas com PFA 4% por 20 min, lavadas com PBS e montadas em lâminas usando VectaShield com meio de montagem DAPI (Vector laboratories) e analisadas por imunofluorescência por microscópio confocal.

4.21. Análise das imagens

Os níveis de co-localização, intensidade de fluorescência e porcentagem de PFFs transferidos foram analisados em células de campos escolhidos aleatoriamente usando o programa ImageJ (NIH) de forma cega. As análises dos sinais de cálcio e da endocitose da vesícula também foram realizadas no ImageJ selecionando uma ROI no citoplasma de células individuais e monitorando o sinal de fluorescência da mesma ROI durante o curso do tempo. As análises de WB, foram realizadas em ImageJ ou Image Lab (Bio-Rad). As regiões de interesse (ROIs) foram desenhadas em torno das bandas de interesse ou do comprimento da pista e a densidade integrada foi medida. As densidades integradas relativas foram calculadas contra a média das amostras WT em cada membrana e normalizadas para genes de manutenção.

4.22. Análise de dados

Para a análise das imagens foi utilizado o software de domínio público ImageJ (Desenvolvido por Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). A análise dos resultados foi feita pelo programa GraphPad Prisma 5, usando o teste ANOVA (*Analysis of Variance*) de uma ou de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni, conforme detalhado na legenda de cada figura. O nível de significância foi considerado com $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da proteína α Syn

Estudos biofísicos, bioquímicos e morfológicos baseados nas mudanças físico-químicas da α Syn e na sua internalização celular requerem expressão da α Syn recombinante com alto grau de pureza. Desta maneira, o protocolo de purificação da proteína descrito aqui (adaptado de Bartel et.al, 2009) foi composto de três etapas: lise celular, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão de tamanho. Após a expressão e a purificação, α Syn humana WT monomérica e PFFs foram caracterizadas estruturalmente por meio de ensaios biofísicos de espalhamento dinâmico de luz e dicroísmo circular e também por *Western Blotting*.

O DLS é uma técnica biofísica que consiste em incidir um laser sobre uma suspensão contendo as partículas alvo. Estas partículas tendem a espalhar a luz do laser por todas as direções e o vetor de espalhamento pode ser detectado por um fotomultiplicador (BURCHARD, 2016). Dessa forma, foi possível avaliar o tamanho e a distribuição de partículas em suspensões. No caso de proteínas, é possível aferir o raio hidrodinâmico da estrutura, sua conformação e estabilidade estrutural (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

O raio hidrodinâmico e a polidispersão de cada uma das amostras de α Syn foi determinado conforme mostrado na Figura 7-A. Os dados mostram que a população de α Syn monomérica apresentou um raio hidrodinâmico de $3,22 \pm 0,55$ nm, e um pico monodisperso, indicando que a amostra se apresentava homogênea. Após a incubação da α Syn monomérica a 37°C e em agitação por 7 dias, a análise de DLS mostrou uma amostra com duas populações distintas: uma de raio de $15,51 \pm 2,09$ nm e outra de raio $51,56 \pm 15,1$. Com esses dados, podemos afirmar que houve a agregação da proteína, visto que a amostra de PFFs de α Syn apresentou um aumento considerável de seu raio hidrodinâmico em relação a estrutura monomérica.

Para caracterização adicional das amostras de α Syn, utilizamos a técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD), que consiste em medir a absorbância diferencial entre duas rotações da luz circularmente polarizada por um centro quiral, o que nos permite determinar a estrutura secundária de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos. A luz circularmente polarizada é composta por uma componente que gira em sentido anti-horário (L) e outra que gira no sentido horário (R), as duas de mesma magnitude, e, quando essa luz atravessa a amostra, as componentes R e L são absorvidas na mesma proporção, e não é gerado nenhum sinal de CD. Porém, quando existe uma diferença de absorção das duas componentes

R e L, o sinal de CD é diferente de zero (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Os dados obtidos nestas análises estão representados no gráfico abaixo (Figura 7-B) e foram comparadas com as curvas já padronizadas descritas na literatura (ROVERE et al., 2019). Os espectros de CD mostram que o processo de agregação acontece por meio de conformação rica em α -hélice (exemplificado com mínimos únicos em ~ 200 nm para monômeros α Syn) antes de converter em uma estrutura rica em folhas β com mínimos únicos em ~ 220 nm (Figura 7-B). As análises demonstram que a α Syn monomérica não possui estrutura secundária em sua conformação, visto que sua curva apresentou uma banda negativa próximo de 195 nm. Já as amostras submetidas ao processo de formação de PFFs apresentaram uma curva de CD típica de proteínas agregadas, com sinal menos intenso e perfil modificado, sendo esse um indicativo de alterações em sua estrutura secundária, que se deu principalmente pelo ganho de folhas- β .

Ao analisarmos ambas as amostras por *Western Blotting* (α Syn monomérica e PFFs) utilizando um anticorpo específico para α Syn, foi possível detectar a presença de diferentes padrões de corrida. A Figura 7-C, nos mostra que a α Syn monomérica apresentou apenas uma banda na região de 17 kDa, como esperado, e PFFs de α Syn apresentaram bandas de diferentes tamanhos, indicando a presença de agregados de diferentes tamanhos, característico de uma população heterogênea. Dessa forma, fomos capazes de produzir *in-house* utilizando sistemas heterólogos, α Syn humana WT monomérica e PFFs, sendo estes bem caracterizados por DLS, CD e WB (Figura 7).

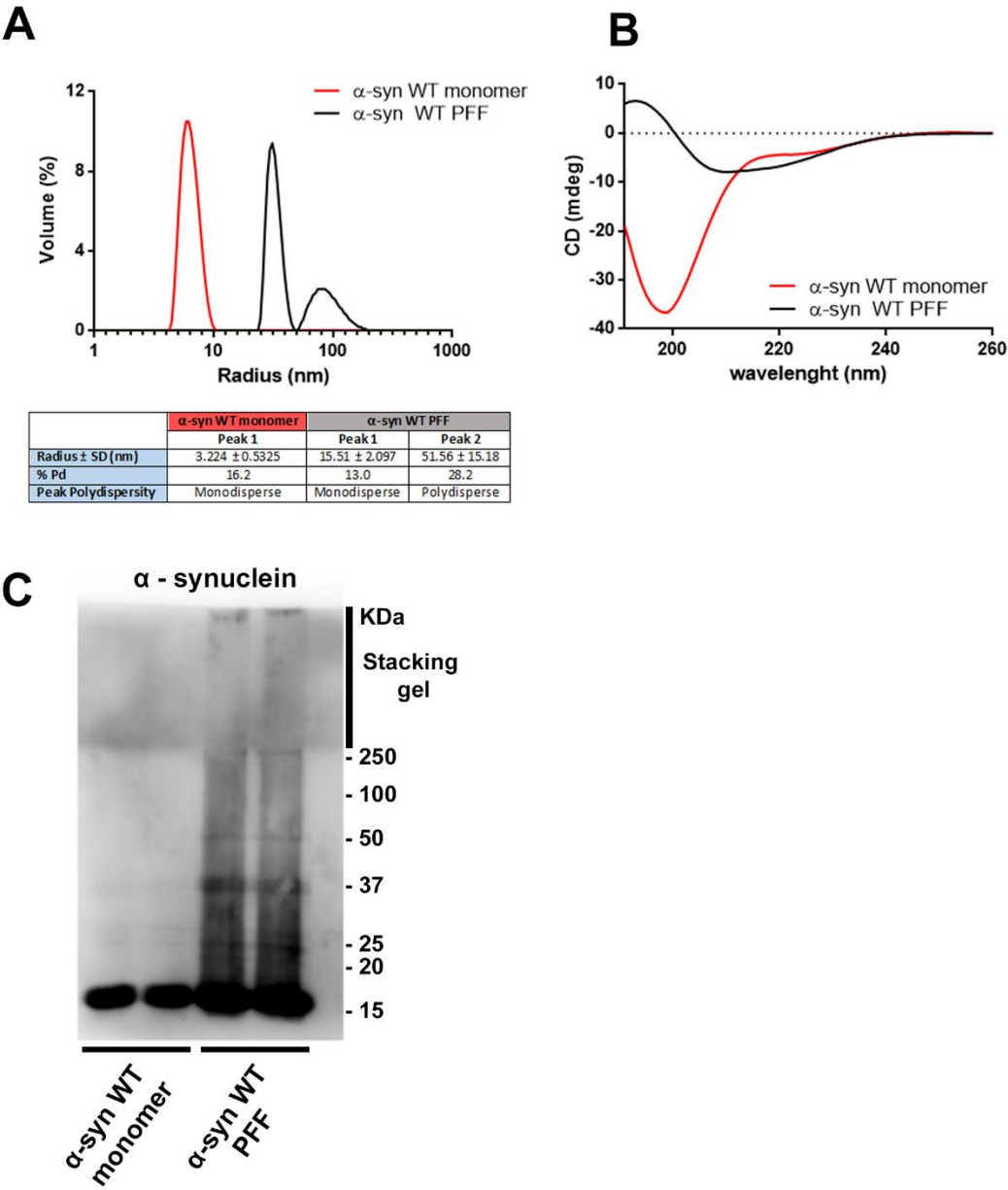


Figura 7. Características biofísicas da α Syn monomérica e PFFs. A) Espalhamento dinâmico de luz (DLS) da α Syn monomérica e PFF. A linha vermelha corresponde as análises realizadas com a proteína em estado monomérica enquanto a linha preta é referente as amostras submetidas ao processo de agregação para formação de PFFs. A tabela demonstra os valores de raios hidrodinâmicos e polidispersão para cada amostra. B) Caracterização estrutural por Dicroísmo Circular (CD) da α Syn monomérica e PFF sendo expressos pela variação ótica em miligras (mDeg) x comprimento de onda (nm), em que α Syn WT monomérica está representada em vermelho e α Syn WT PFF em preto. Com base em dados da literatura, é possível observar que a amostra monomérica (linha vermelha) apresenta curva típica de proteínas estruturalmente incorreta), enquanto as PFFs (linha preta) apresentam curva típica de proteínas com estruturação secundária rica em folhas β . C) Imagem representativa de *Western Blotting* (WB) para detecção das proteínas α Syn WT monomérica e PFF. Enquanto a amostra de α Syn apresenta uma banda única de aproximadamente 17kDa, as amostras de PFFs apresentam bandas de diversos tamanhos no gel separador e algumas amostras retidas no gel concentrador (Stacking gel).

5.2. PFFs de α Syn são eficientemente internalizados por organoides cerebrais

Organoides são estruturas tridimensionais derivadas tanto de células-tronco adultas ou células pluripotentes induzidas que possuem propriedades semelhantes a vários órgãos, mimetizando seu funcionamento e padrão de organização, sendo, portanto, modelos mais complexos para análises *in vitro*, principalmente no estudo da fisiopatologia de doenças (DIXON; WOODWARD, 2018). Nos últimos anos, os avanços científicos no campo das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e a formação de organoides cerebrais se tornaram modelos alternativos para investigar distúrbios do SNC utilizando células humanas (NASCIMENTO et al., 2019). Vários estudos mostram que os organoides cerebrais são formados por uma massa celular com organização semelhante ao cérebro em desenvolvimento, apresentando estruturas semelhantes aos ventrículos cerebrais, zonas ventriculares e zonas subventriculares (CAMP et al., 2015; LUO et al., 2016; QUADRATO et al., 2017; VELASCO et al., 2019). Além disso, buscamos esses modelos porque os organoides cerebrais representam um sistema mais sinapticamente interconectado.

Já se sabe que em condições patológicas, a α Syn se dimeriza e subsequentemente se agrega em oligômeros/ protofibrilas, que por fim se montam em fibrilas maduras. Desta maneira, objetivamos aqui utilizar o modelo proposto para caracterizar a internalização de PFFs de α Syn e verificar se essa internalização poderia induzir um processo de formação intracelular de agregados de α Syn, processo típico da neurodegeneração induzida por esta proteína (VAIKATH et al., 2019).

Para caracterizar os organoides cerebrais gerados, após a fixação, as amostras foram submetidas ao fatiamento (100 μ m) e marcadas por imunofluorescência. A Figura 8 mostra a expressão dos marcadores de citoesqueleto neuronal (MAP2, proteína associada à microtúbulo envolvido com o crescimento de neuritos) e fator de transcrição Sox2 presente nas células progenitoras neurais. Podemos notar que Sox2 (em verde) foi expresso nas estruturas mais internas dos organoides, apontando o fenótipo celular de progenitoras neurais e indicando a zona ventricular, e MAP2 foi abundantemente expresso em áreas mais externas dos organoides, indicando o fenótipo de neurônios maduros (Figura 8).

Uma vez diferenciados, procuramos investigar se estas estruturas seriam capazes de internalizar PFFs de α Syn. Para isso, PFFs de α Syn marcados com o fluoróforo Alexa-633 (1 μ M) foram incubados por 24 ou 48h no meio de cultura contendo os organoides. Na Figura 9-A podemos observar que após 24h de incubação já é possível confirmar a internalização da proteína marcada com Alexa-633. No entanto, após 48h de incubação, é notável o aumento deste evento, além da formação de estruturas maiores, indicando um processo de agregação

intracelular das PFFs (Figura 9-B). Ao analisarmos o número destas estruturas com diâmetro maior que 0,5µm nos organoides incubados por 24 e 48h com PFFs de α Syn, observamos que os organoides incubados por 48h apresentam 20x mais destas inclusões do que os organoides incubados por 24h (Figura 9-C). Com estes dados, demonstramos que os organoides cerebrais não só internalizam PFFs de α Syn, mas também mimetizam o processo cronológico da agregação da α Syn nas sinucleinopatias.

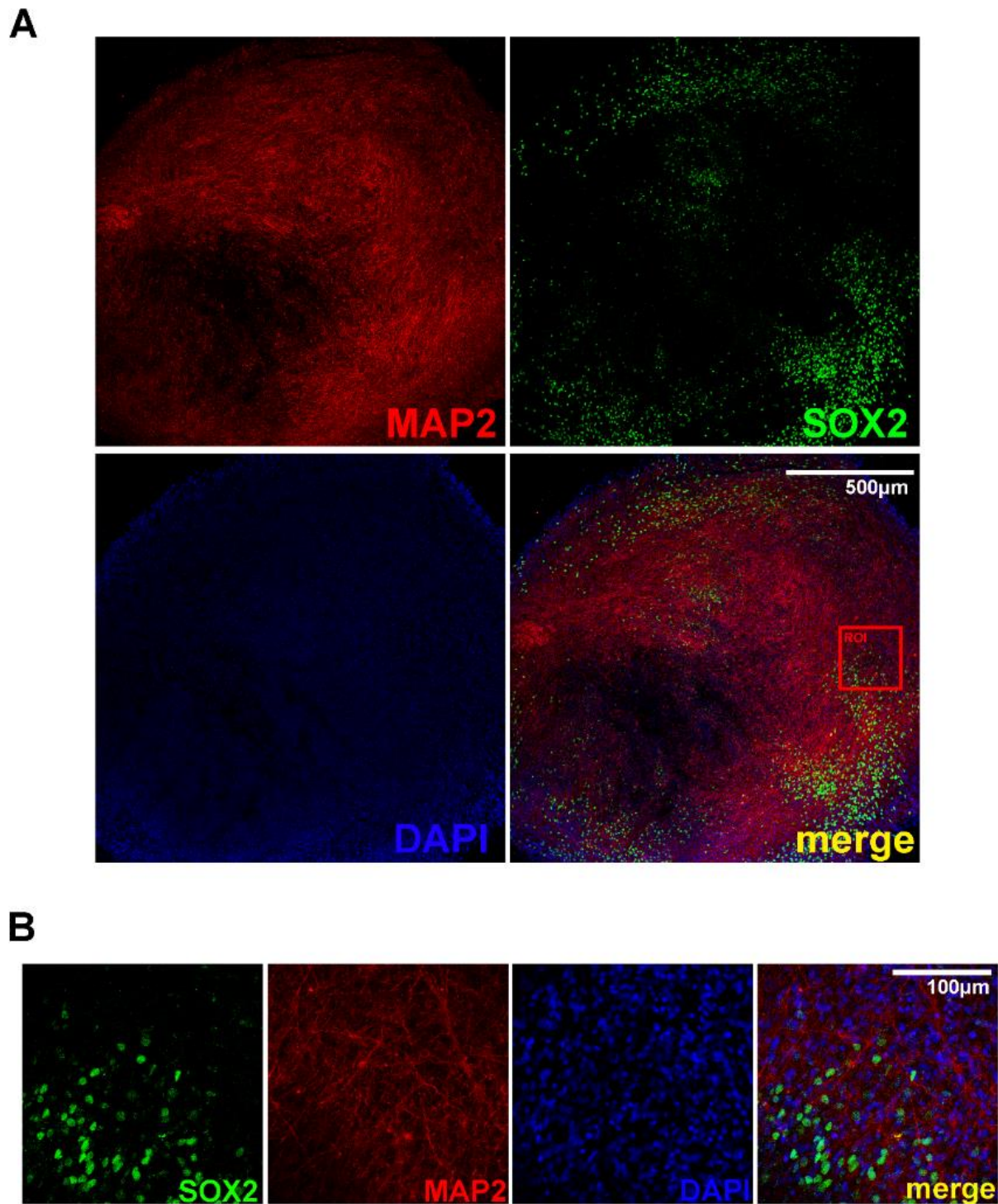


Figura 8. Organoides cerebrais desenvolvidos a partir de iPSCs humanas expressam marcadores neuronais específicos após 60 dias de diferenciação. A). Imagens de microscopia confocal representativas de organoides cerebrais após 60 dias de diferenciação e marcados para MAP2 (vermelho), Sox2 (verde) e DAPI (azul). B) Imagens de maior aumento do ROI (Region of Interest) assinalado em (A). Escala das barras em (A) = 500 μm , em (B) = 100 μm .

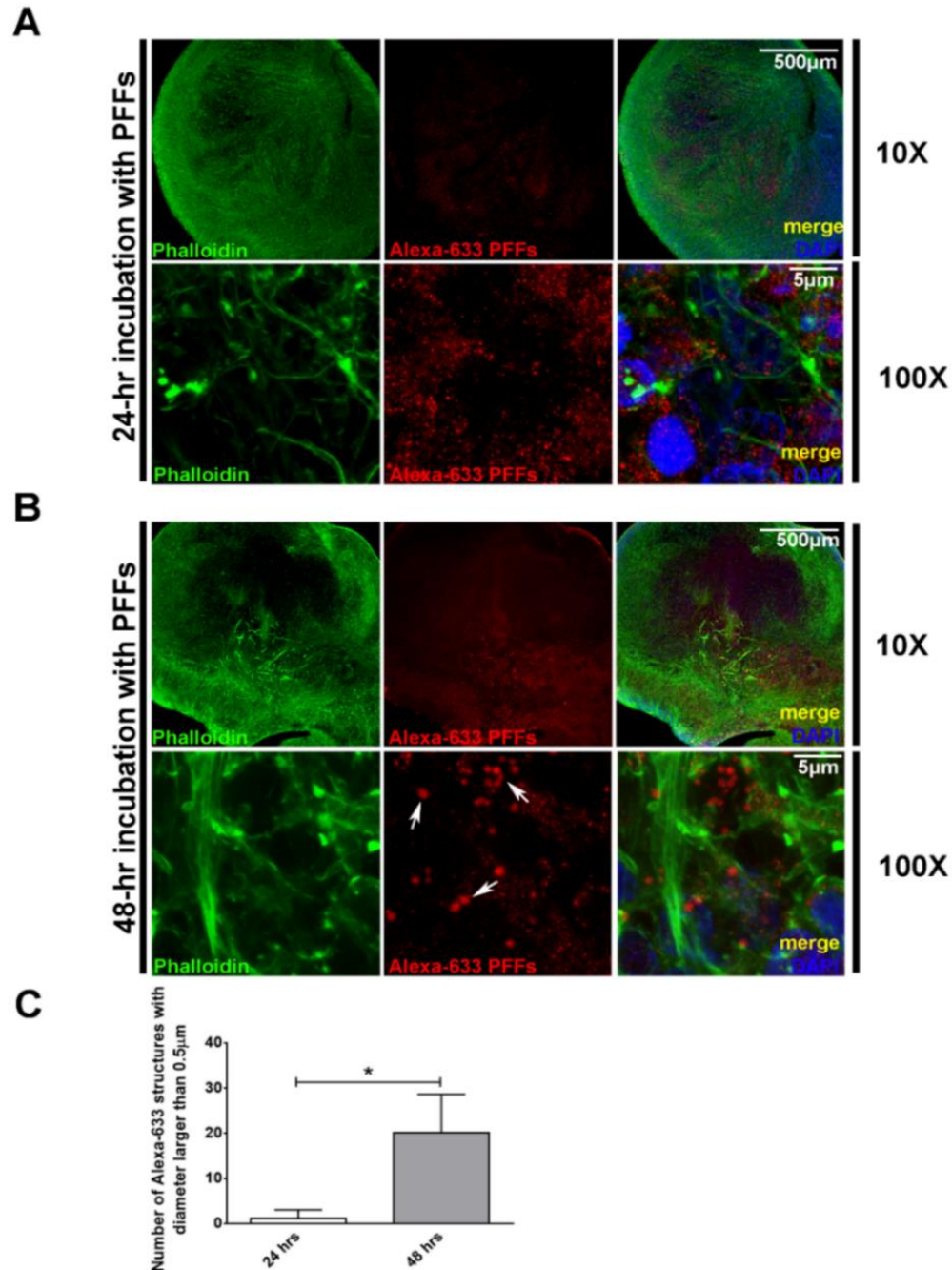


Figura 9. Organoides cerebrais gerados a partir de iPSCs humanas internalizam PFFs de α Syn e mimetizam o processo de agregação cronológico destas proteínas nas sinucleinopatias. A) Imagens representativas de microscopia confocal de fatias de organoides cerebrais incubados com PFFs de α Syn por 24h (A) e 48h (B), em aumentos de 10 e 100x. PFFs de α Syn estão marcados com Alexa-633 (vermelho). Em verde, vemos citoesqueleto de actina marcado com faloidina-Alexa 488. No painel a direita, vemos a imagem sobreposta, com o núcleo corado de azul, marcado com DAPI. É possível notar a diferença morfológica entre as espécies de α Syn entre as duas imagens. Setas demonstram estruturas globulares de α Syn com diâmetro acima de 0,5µm. As barras de escala representam 500 µm (painel superior) e 5 µm (painel inferior); C) Quantificação do número de agregados de α Syn com o diâmetro maior que 0,5 µm, nos tempos de 24 e 48h. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ pelo teste t de Student bicaudal. Este experimento foi repetido independentemente com 3 organóides de diferentes lotes e pelo menos 14 imagens por grupo (24 e 48 horas) foram analisadas. Barras de escala, 10 µm.

5.3. PFFs de α Syn são internalizados pelo epitélio intestinal de camundongos

Um dos sintomas não motores mais comuns observados na DP é a disfunção gastrointestinal, que muitas vezes precede o desenvolvimento de sintomas motores (O'SULLIVAN et al., 2008). Em um trabalho realizado por Uemura e colaboradores (2018), as PFFs de α Syn foram injetados diretamente na parede gástrica de camundongos e foi observado que estes PFFs foram capazes de induzir a formação de agregados de α Syn fosforilada no SNE e posteriormente, no núcleo dorsal do nervo vago (UEMURA et al., 2018). Dessa forma, a administração de α Syn PFFs é um modelo reconhecido e estabelecido de sinucleinopatia idiopática no SNC que representa de perto a patologia humana (LUK et al., 2009a; VOLPICELLI-DALEY et al., 2011). No entanto, ainda não se sabe se PFFs administrados diretamente no lúmen intestinal podem ser absorvidos, migrar para o SNE e, desta maneira, interromper o controle neural gastrointestinal. Desta maneira, desenvolvemos um método de administração de PFFs fluorescentes de α Syn diretamente na luz duodenal de camundongos. Como pode ser observado na Figura 10-A, a parede do duodeno apresenta coloração α Syn-positiva na camada submucosa, mas também em CEEs epiteliais que são posicionados com sua porção apical voltada para o lúmen intestinal e sua porção basolateral em direção aos nervos entericos. Por alguma razão que não conseguimos identificar, o anticorpo anti- α Syn usado marcou fortemente as microvilosidades. Semeando o lúmen duodenal de camundongos adultos do tipo selvagem (WT) com PFFs α Syn marcados com Alexa por 30 min, observamos a disseminação de sementes fluorescentes por toda a mucosa e submucosa do órgão. Curiosamente, pontos α Syn positivos para Alexa-633 também foram detectados no citoplasma de CEEs positivos para α Syn (Figura 10-B), indicando que a administração simples de PFFs α Syn no lúmen intestinal sem injetá-los no intestino parede é suficiente para induzir sua internalização por enterócitos e CEEs.

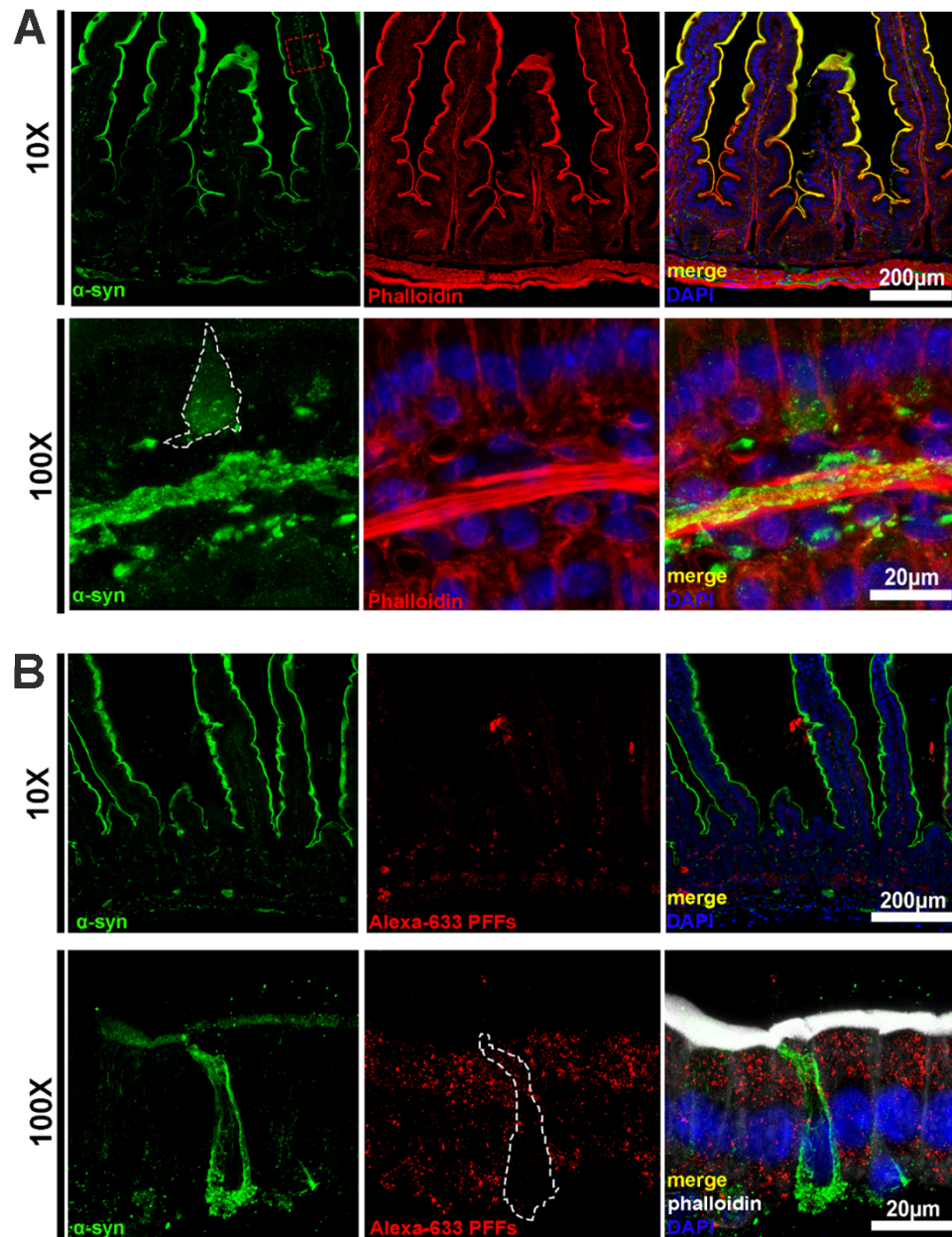


Figura 10. PFFs de α Syn são internalizados pelo lumen intestinal de camundongos. A) Imagens de imunocoloração de fatias de duodeno de 150 μ m de espessura. A α Syn entérica é mostrada em verde, o citoesqueleto de actina em vermelho e os núcleos em azul (DAPI). ROI (quadrado vermelho) mostra um revestimento de células α Syn-positivas no epitélio. A imagem de alta ampliação (100x) mostra um zoom desta célula enteroendócrina (α Syn-positiva) marcada acima. Observe a proximidade com os terminais nervosos entéricos (verde, abaixo). Barras de escala, 200 (painel superior) e 20 (painel inferior) μ m. B) Imagem de imunocoloração de um duodeno de camundongo após a administração de 30 min de Alexa-633-PFFs. A α Syn endógena foi imunomarcada e mostrada em verde (imagem à esquerda). Alexa-633 PFFs (imagem do meio) são mostrados em vermelho e distribuídos por toda a camada mucosa e submucosa. A imagem inferior de alta ampliação mostra um CEE positivo para α Syn contendo pontos positivos para Alexa-633 após a administração duodenal das PFFs. Barra de escala, 200 μ m e 20 μ m.

5.4. PFFs de α Syn são internalizados por células enteroendócrinas e neuronais e iniciam um processo de agregação da α Syn endógena

Vários estudos identificaram o acúmulo de α Syn em neurônios e células gliais entéricas do SNE em biópsias gastrointestinais de pacientes com DP (SHANNON et. al, 2012; SÁNCHEZ-FERRO et al., 2015). Isso sugere que a agregação α Syn pode originar-se nos tecidos periféricos e progredir para o cérebro por meio de fibras autonômicas. Recentemente, foi relatado que CEEs que fazem parte do epitélio intestinal e estão diretamente expostos ao lúmen intestinal e seu microbioma, possuem muitas propriedades semelhantes a neurônios, como a expressão de α Syn, e são sinapticamente conectados aos nervos entéricos (Figura 10) (CHANDRA et al., 2017). Portanto, formulamos a hipótese de que o dobramento incorreto de α Syn e a agregação poderiam iniciar neste tipo de célula e, em seguida, progredir para o SNE. Embora amplamente mostrado em neurônios (PEELAERTS et al., 2015; BOUSSET et al., 2013), uma questão chave aqui é se e como essas fibrilas seriam internalizadas pelas CEEs, semeariam a agregação de α Syn citoplasmática solúvel e, em seguida, seriam transferidas para os neurônios a partir do SNE. Para responder a essas perguntas, células STC-1 e SH-SY5Y foram transfectadas com plasmídeo contendo a construção α Syn-GFP humana WT e, 48h após a transfecção, foram tratadas com 1 e 3 μ M de PFFs de α Syn por 24h. Em ambas as linhagens, observamos que 100% das células analisadas internalizaram a proteína de forma independente da concentração administrada (Figuras 11-A e B e 12-A e B). Dessa forma, optamos por padronizar os ensaios utilizando 1 μ M de α Syn PFF.

Como pode ser observado na Figura 11-A e 12-A, células não-tratadas com as PFFs apresentam a α Syn-GFP distribuída homogeneamente por todo citoplasma e núcleo. No entanto, após o tratamento com as PFFs por 24h, grânulos de α Syn-GFP são observados em colocalização com as PFFs, sugerindo que os núcleos de agregação de α Syn agregada iniciam o processo de agregação da proteína monomérica endógena (Figura 11-A e D, 12-A e D). Este evento foi observado em células STC-1 e em células SH-SY5Y. Desta maneira, podemos concluir que houve a internalização de PFFs de α Syn em células enteroendócrinas e também neuronais e que os agregados de α Syn exógena são capazes de iniciar um processo de agregação intracelular da própria α Syn endógena das células. Nossos resultados vão de acordo com os estudos de Luk (2009) e Volpicelli-Daley (2011) e reforçam a ideia de que as PFFs podem semear o recrutamento de α Syn endógena e induzir sua conversão na forma patológica.

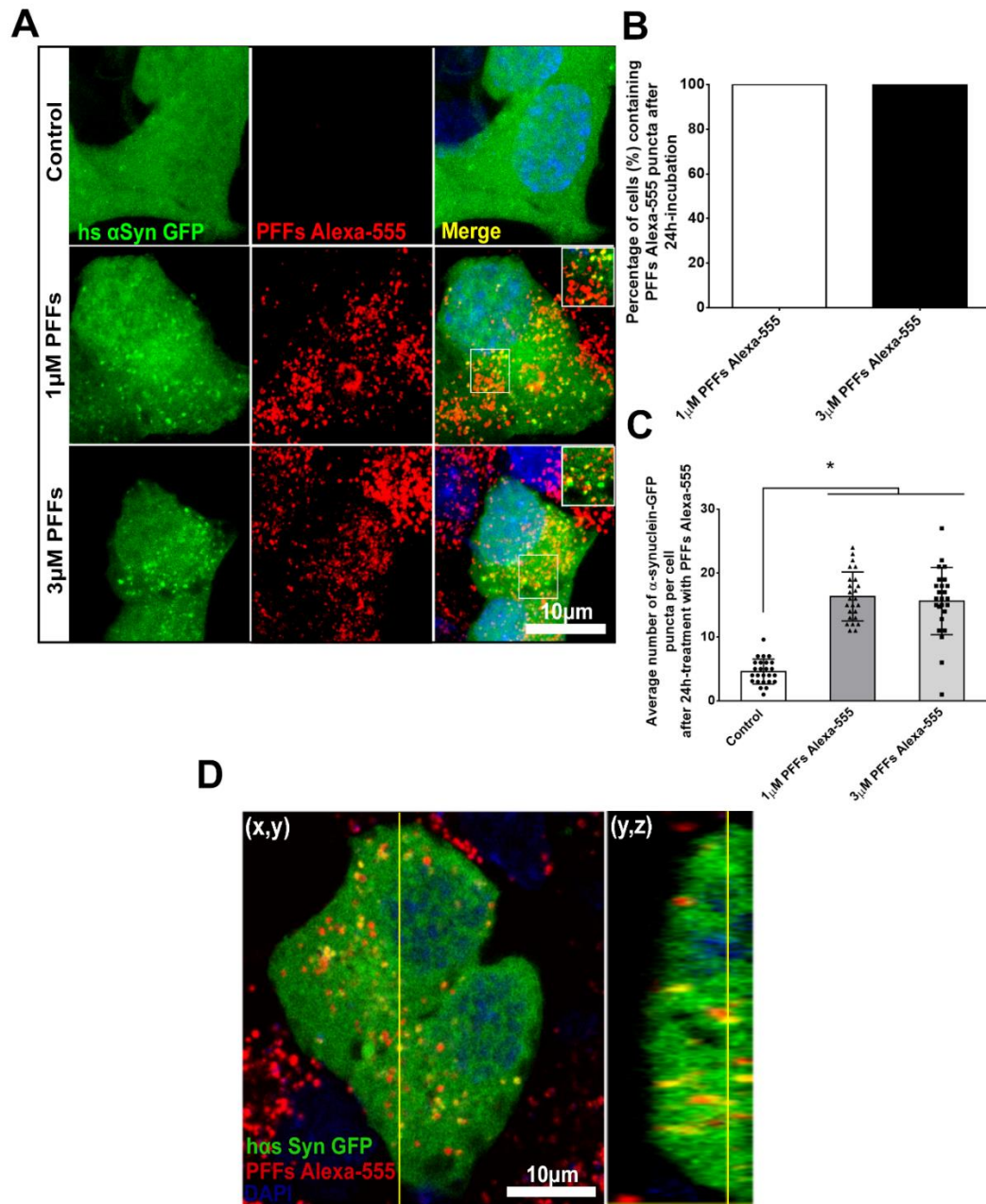


Figura 11. PFFs de α Syn induzem a agregação da α Syn monomérica em células STC-1. A) Imagens representativas de microscopia confocal de células STC-1 transfectadas com vetor α Syn WT GFP (em verde). Após o início da expressão as células foram incubadas por 24h com PFFs de α Syn (em vermelho) nas concentrações de 1 e 3 μ M. Os núcleos estão corados em azul, com DAPI. A sobreposição das imagens está representada no painel à direita. A barra de escala representa 10 μ m. B) Porcentagem de células STC-1 contendo PFFs de α Syn após 24h de incubação. C) Quantificação do número médio de grânulos de α Syn GFP por após 24h, nos grupos tratados com 1 e 3 μ M de PFFs de α Syn e grupo controle. D) Imagens em maior aumento representando células STC-1 transfectadas com vetor α Syn GFP (em verde) e posteriormente tratadas com PFFs de α Syn (em vermelho). Em azul, núcleos corados com DAPI. A esquerda, reconstrução das projeções ortogonais nos eixos X e Y. A direita, corte longitudinal, eixos Y e Z. Seta indicando a colocalização de grânulos verdes e vermelhos. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do one-way ANOVA ou t-test student (* $p < 0,05$, $n =$ três experimentos independentes com no mínimo 25 células analisadas).

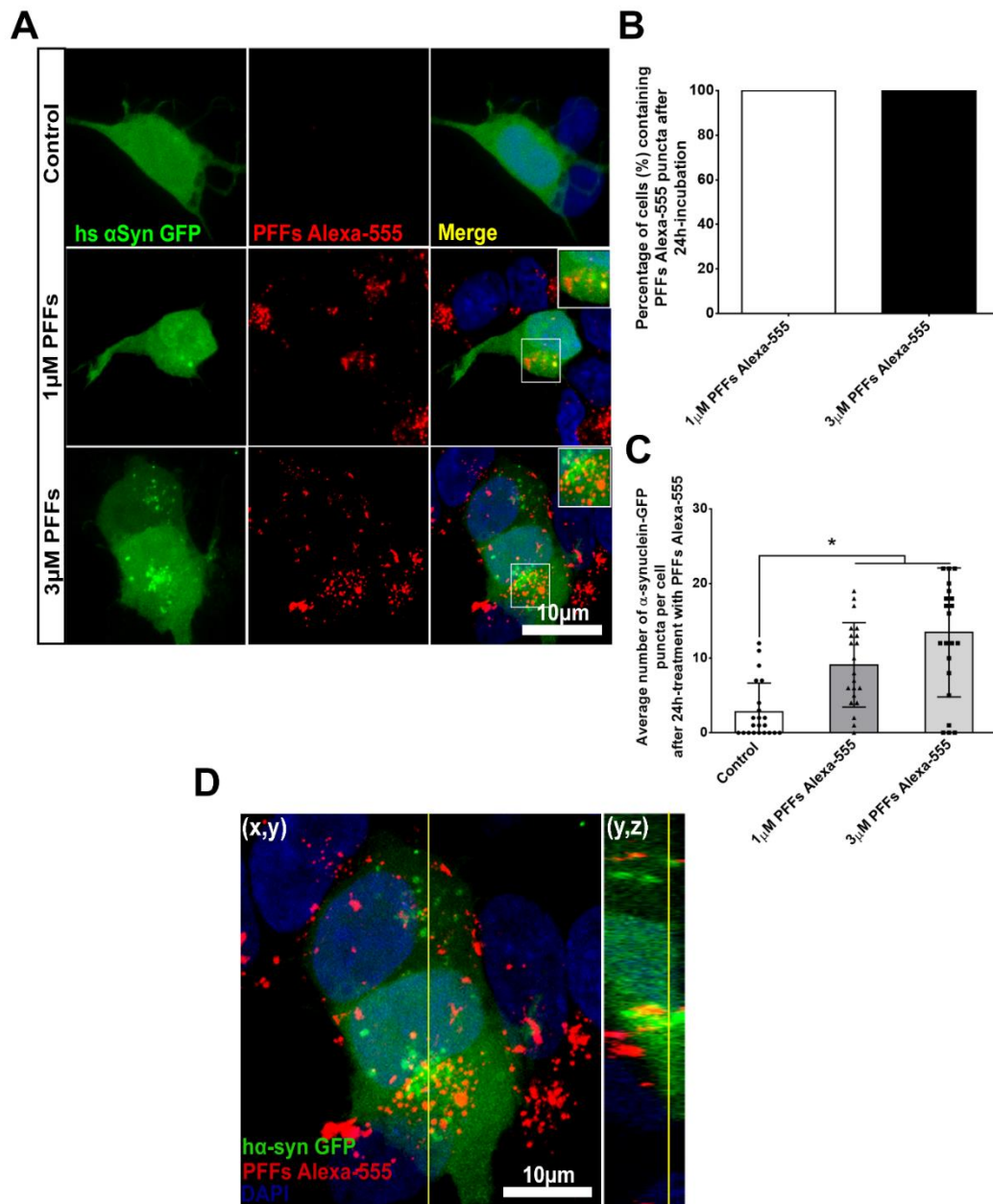


Figura 12. PFFs de α Syn induzem a agregação da α Syn monomérica em células SH-SY5Y. A) Imagens representativas de microscopia confocal de células SH-SY5Y transfectadas com vetor α Syn WT GFP (em verde). Após o início da expressão as células foram incubadas por 24h com PFFs de α Syn (em vermelho) nas concentrações de 1 e 3 μ M. Os núcleos estão corados em azul, com DAPI. A sobreposição das imagens está representada no painel à direita. A barra de escala representa 10 μ m. B) Porcentagem de células SH-SY5Y contendo PFFs de α Syn após 24h de incubação. C) Quantificação do número médio de grânulos de α Syn GFP por após 24h, nos grupos tratados com 1 e 3 μ M de PFFs de α Syn e grupo controle. D) Imagens em maior aumento representando células SH-SY5Y transfectadas com vetor α Syn GFP (em verde) e posteriormente tratadas com PFFs de α Syn (em vermelho). Em azul, núcleos corados com DAPI. A esquerda, reconstrução das projeções ortogonais nos eixos X e Y. A direita, corte longitudinal, eixos Y e Z. Seta indicando a colocalização de grânulos verdes e vermelhos. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do one-way ANOVA ou t-test *student* (* $p < 0,05$, n= três experimentos independentes com no mínimo 25 células analisadas).

5.5. PFFs de α Syn iniciam uma resposta intracelular de cálcio e são internalizados por eventos de endocitose em células enteroendócrinas e neuronais

Estudos anteriores demonstraram que neurônios primários cultivados *in vitro* internalizam rapidamente PFFs de α Syn recombinante que são adicionadas ao meio (ABOUNIT et al., 2016; GOEDERT, 2015). Em experimentos *in vivo*, as fibrilas de α Syn administradas por injeção estereotáxica no cérebro de camundongos são absorvidas em poucas horas pelos neurônios e glias ao redor do local da injeção (REY et al., 2013). A captação pode ocorrer tanto no soma / dendritos, bem como no compartimento do axônio. Foi-se demonstrado também que a α Syn interage com as membranas celulares e afetam a sinalização de Ca^{2+} de uma maneira específica da estrutura. Além disso, foi demonstrado que α Syn induz um aumento no Ca^{2+} intracelular basal em seu estado monomérico desdobrado, bem como em seu estado oligomérico, uma vez aplicado a neurônios e astrócitos (ANGELOVA et al., 2016). No entanto, o mecanismo exato de internalização da α Syn por células intestinais e neuronais ainda é bastante obscuro. É sugerido que o influxo de Ca^{2+} desencadeia e acelera a endocitose, que recicla vesículas em terminais nervosos e células secretoras não-neuronais. O modelo emergente é que o influxo de Ca^{2+} via canais para cálcio voltagem-dependentes (um grupo de proteínas transmembranas que forma canais iônicos que são ativados por alterações no potencial da membrana e encontrados em células excitáveis com permeabilidade para o íon Ca^{2+}) desencadeia e controla a taxa de endocitose e que esse evento conta com a participação de duas proteínas de ligação ao cálcio, calmodulina e sinaptotagmina, que atuam como sensores para Ca^{2+} neste processo (WU et al., 2014).

No entanto, ainda não se sabe se este mecanismo pode desempenhar um papel na internalização de PFFs em CEEs. Dessa forma, nós buscamos investigar se PFFs de α Syn teriam algum efeito sobre a sinalização de Ca^{2+} intracelular das células enteroendócrinas e neuronais. Para isso, células enteroendócrinas e neuronais foram incubadas com a sonda para Ca^{2+} Fluo-4/AM (4 μ M), estimuladas com PFFs de α Syn e imageadas por *live imaging*. Nossos resultados indicam que PFFs de α Syn foram capazes de iniciar uma resposta intracelular de Ca^{2+} tanto nas células enteroendócrinas quanto nas células neuronais (Figura 13A-C). Curiosamente, foram observados dois padrões de sinalização de Ca^{2+} induzida por α Syn-PFF. Em células SH-SY5Y, PFFs induziram um pico único de Ca^{2+} enquanto em células STC-1 a cinética de Ca^{2+} foi caracterizada por vários picos, também com recuperação completa à linha de base (Figura 13B).

No entanto, não foram observadas diferenças nas amplitudes de Ca^{2+} que ocorrem em resposta à estimulação de PFF entre as linhas de células.

Para verificar se as PFFs de αSyn estariam induzindo eventos de endocitose, incubamos as células com a sonda fluorescente FM1-43, um marcador vital para o estudo de ciclo de vesículas celulares (AMANDA J. COCHILLA; JOSEPH K. ANGLESON; BETZ, 2003) e novamente imageamos as células por microscopia confocal durante o estímulo. Com este experimento, foi possível visualizar a formação de vesículas de endocitose imediatamente após o estímulo (Figura 13-D). FM1-43 liga membranas e durante a endocitose é internalizado e preso em vesículas, oferecendo uma medida de eficiência endocítica (SMITH, BETZ, 1996; COCHILLA et al., 1999; VERSTREKEN et al., 2008). A Figura 13D mostra células STC-1 e SH-SY5Y coradas com FM1-43 antes e durante a estimulação com PFFs de αSyn . FM1-43 (4 μM) estava presente no meio das células em todas as imagens. Após a estimulação com PFFs de αSyn , vários eventos de brotamento da vesícula da membrana plasmática em ambos os tipos de células foram observados. Ao mensurarmos a intensidade de fluorescência da sonda FM1-43, inicialmente localizada apenas na membrana externa da célula, observamos um grande sinal intracelular, indicando eventos de internalização da sonda após o estímulo com as PFFs (Figura 13-E). Além disso, após 15 minutos de estimulação, as células foram fixadas e analisadas por microscopia confocal. Observamos que aproximadamente 80% dos que foram internalizados se colocalizam com vesículas FM1-43 positivas (Figura 13-F e G).

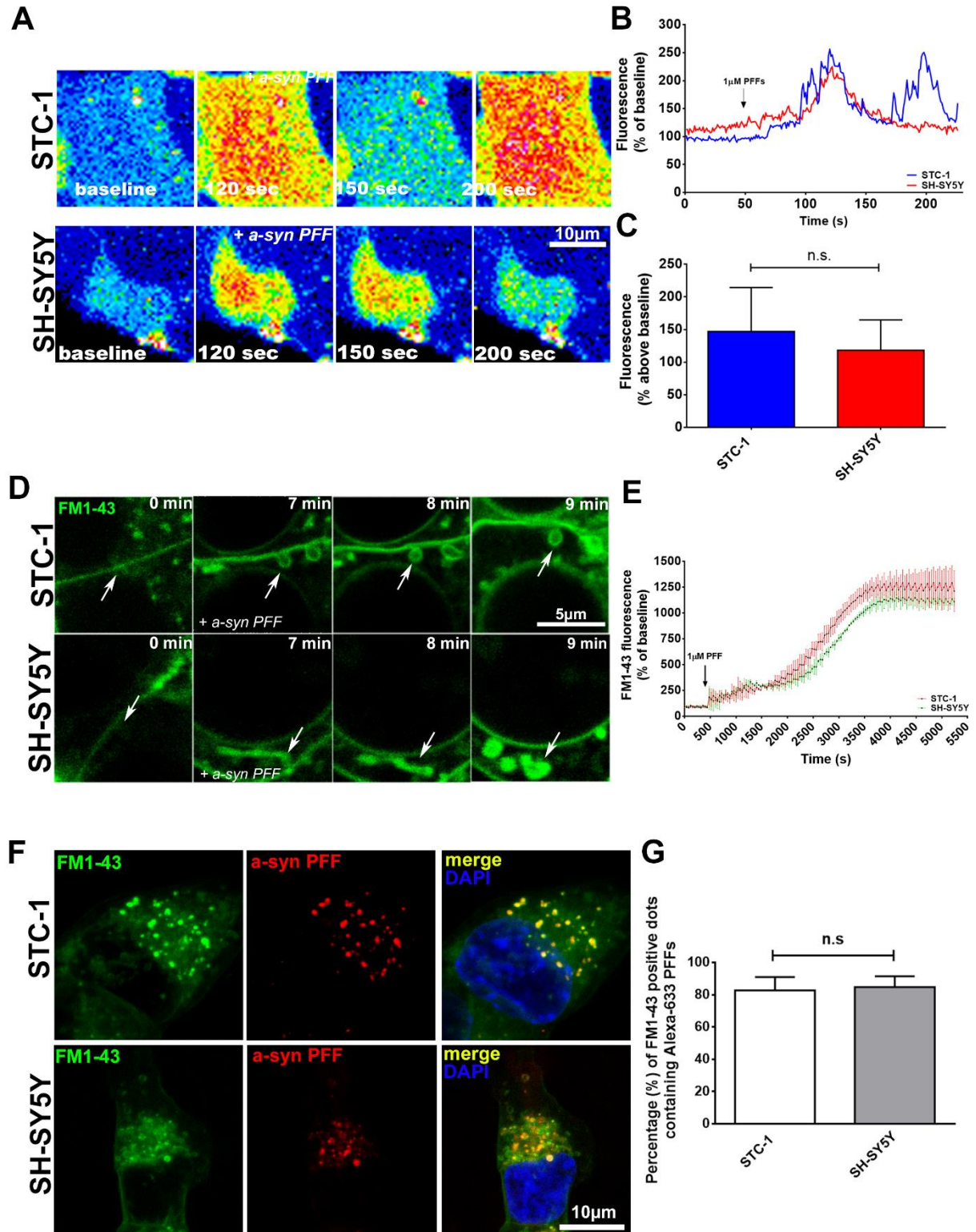


Figura 13. PFFs de α Syn iniciam uma resposta intracelular de Ca^{2+} e eventos de endocitose em células STC-1 e SH-SY5Y. A) Imagens de microscopia confocal de células STC-1 e SH-SY5Y carregadas com Fluo-4/AM (6 μ M), estimuladas com PFFs de α Syn (1 μ M) e visualizados durante 5 minutos *in vivo*. A alteração de cor na imagem indica aumento do Ca^{2+} intracelular. Barra de escala = 10 μ m. B) Representação gráfica ao longo do tempo do aumento de fluorescência das células STC-1 (linha azul) e SH-SY5Y (linha vermelha) quando estimuladas com PFFs de α Syn. C) Quantificação do aumento do transiente de Ca^{2+} nas células STC-1, em azul, e nas células SH-

SY5Y em vermelho (n=55 células analisadas por grupo). D) Imagens de microscopia confocal de células STC-1 (painel superior) e SH-SY5Y (painel inferior) incubadas com 16 μ M da sonda fluorescente FM1-43 e tratadas com PFFs de α Syn. As imagens foram registradas durante 1h ao vivo. Barras de escala representam 5 μ m. E) Representação gráfica, ao longo do tempo, do aumento da fluorescência intracelular gerada pelo FM1-43 em células estimuladas com PFFs de α Syn. Linha vermelha representa as células STC-1 e SH-SY5Y em azul. F) Imagens de microscopia confocal de células STC-1 (painel superior) e SH-SY5Y (painel inferior) incubadas com a sonda FM1-43 (verde) e tratadas com PFFs de α Syn marcados com Alexa-633 (vermelho). G) Gráfico representativo mostrando a porcentagem de estruturas positivas para FM1-43 e PFFs de α SynAlexa-633. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student* (* $p < 0,05$, n=55 células por grupo, 3 experimentos individuais).

Para verificar o papel do cálcio extracelular e intracelular no processo de endocitose das PFFs de α Syn, nos repetimos o experimento anterior, utilizando o meio HEPES sem Ca^{2+} , contendo o quelante extracelular de Ca^{2+} EGTA (2mM). Dessa forma, impedimos a captação de Ca^{2+} pela célula. Nossos resultados mostram que na ausência de Ca^{2+} , a sinalização intracelular do íon não é iniciada (Figura 14 A-C). Desta maneira, concluímos que PFFs de α Syn iniciam uma resposta de Ca^{2+} intracelular em células STC-1 e SH-SY5Y de forma dependente de estoques extracelular de Ca^{2+} .

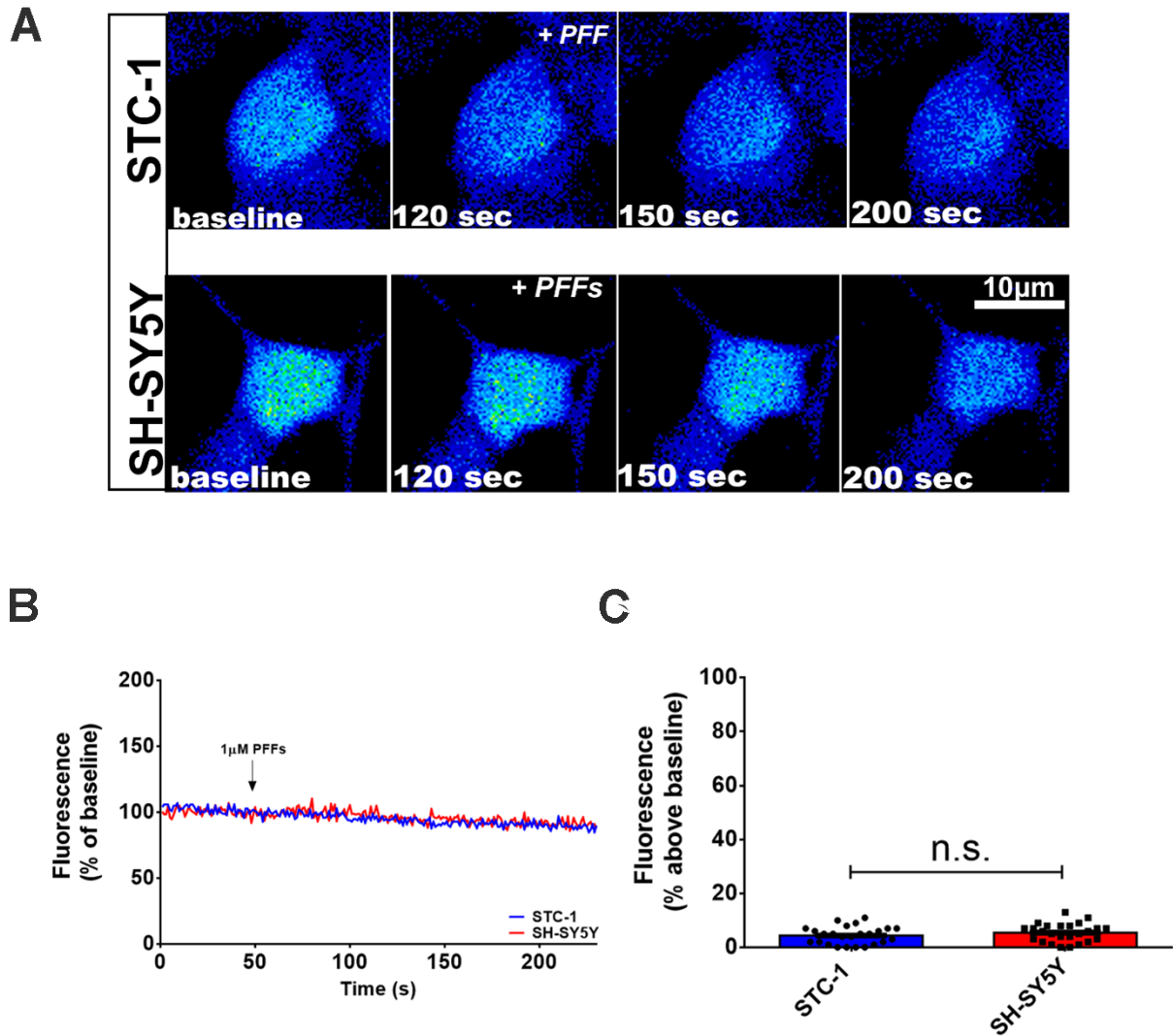


Figura 14. Na ausência de Ca^{2+} extracelular, PFFs de αSyn não induzem sinalização intracelular de Ca^{2+} em células STC-1 e SH-SY5Y. A) Imagens de microscopia confocal de células STC-1 e SH-SY5Y carregadas com Fluo-4/AM ($6\mu\text{M}$), estimuladas com PFFs de αSyn ($1\mu\text{M}$) e visualizados durante 5 minutos *in vivo*, em meio modificado pela substituição equimolar do CaCl_2 (cloreto de cálcio) pelo MgCl_2 (cloreto de magnésio) e adição do quelante extracelular de cálcio EGTA 2mM . Barra de escala = $10\mu\text{m}$. B) Representação gráfica ao longo do tempo do aumento de fluorescência das células STC-1 (linha azul) e SH-SY5Y (linha vermelha) quando estimuladas com PFFs de αSyn . C) Quantificação do aumento do transiente de Ca^{+2} nas células STC-1, em azul, e nas células SH-SY5Y em vermelho ($n=55$ células analisadas por grupo). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student* (* $p<0,05$, $n=55$ células por grupo, 3 experimentos individuais).

5.6. PFFs de α Syn são transferidos entre células STC-1 e SH-SY5Y

Como demonstrado, a α Syn estruturada incorretamente é capaz de recrutar a α Syn endógena da célula receptora e atuar como um núcleo de agregação para o desenvolvimento de agregados que eventualmente levam à formação de corpos de Lewy e, finalmente, DP (ANGOT; BRUNDIN, 2009; GOEDERT, 2015; STEINER; ANGOT; BRUNDIN, 2011). Achados anteriores também demonstraram que os núcleos de agregação fibrilares são transmitidas de uma célula para outra (LUK et al., 2009a; VOLPICELLI-DALEY et al., 2011). Embora a transferência de fibrilas α Syn entre células neuronais já tenha sido caracterizada (BAE et al., 2018) ainda está para ser demonstrado se os agregados α Syn poderiam ser transferidos do CEE para os neurônios.

Desta maneira, uma vez dentro das células, buscamos investigar como as PFFs de α Syn são transferidos de uma CEEs para uma célula neuronal. Nosso primeiro objetivo foi analisar se o contato célula a célula é importante. Para isso, células STC-1 e SH-SY5Y foram tratadas respectivamente com PFFs de α Syn-Alexa-555 (vermelho) ou Alexa-488 (verde) por 24h e, posteriormente, estas células foram tripsinizadas, misturadas e 3×10^5 células de cada linhagem foram mantidas em co-cultura durante 4, 24, 48 e 72h (Figura 15-A). Como demonstramos anteriormente, após 24h de tratamento com PFFs de α Syn, aproximadamente 100% das células internalizam a proteína correspondente ao seu tratamento (Figura 15-B e D). Na Figura 15-B (coluna da esquerda), está demonstrado imagens representativas de células contendo PFFs de α Syn 488 (verde) e na segunda coluna, células contendo PFFs de α Syn 555 (vermelho). Na última coluna, temos a imagem sobreposta com a presença do núcleo, marcado por DAPI. É possível identificar os diferentes tipos celulares usando a morfologia do núcleo como referência, visto que o núcleo das células enteroendocrinas, quando corados com DAPI, apresentam nucléolos mais evidentes (indicados pela seta vermelha), enquanto o núcleo de células neuronais se mostra mais homogêneo (indicados pela seta verde). Como pode ser observado na Figura 15-B e E, após 24h de co-cultura, o número de células positiva para os dois tipos de PFFs é estatisticamente maior do que a co-cultura por 4h. A Figura 15-C nos mostra com maior detalhe, um prolongamento celular de célula STC-1, apresentando ambos os tipos de PFFs de α Syn, indicando que estes são transferidos entre os dois tipos celulares. Além disso, através de citometria de fluxo, observamos que a eficiência máxima de transferência entre os agregados parece estancar em 30%, não importando o aumento no tempo de co-cultura (48 ou 72h, Figura 15-E). No entanto, analisando a porcentagem de células STC-1 ou SH-SY5Y positivas para PFFs de α Syn vermelhos e verdes, nossos resultados mostram que houve uma maior transferência de PFFs de α Syn de células neuronais e para as células enteroendocrinas,

do que ao contrário (Figura 15-F). Em resumo, estes dados nos permitem concluir que PFFs de α Syn podem ser transferidos de células enteroendócrinas para células neuronais sendo que o processo inverso se mostra mais eficiente.

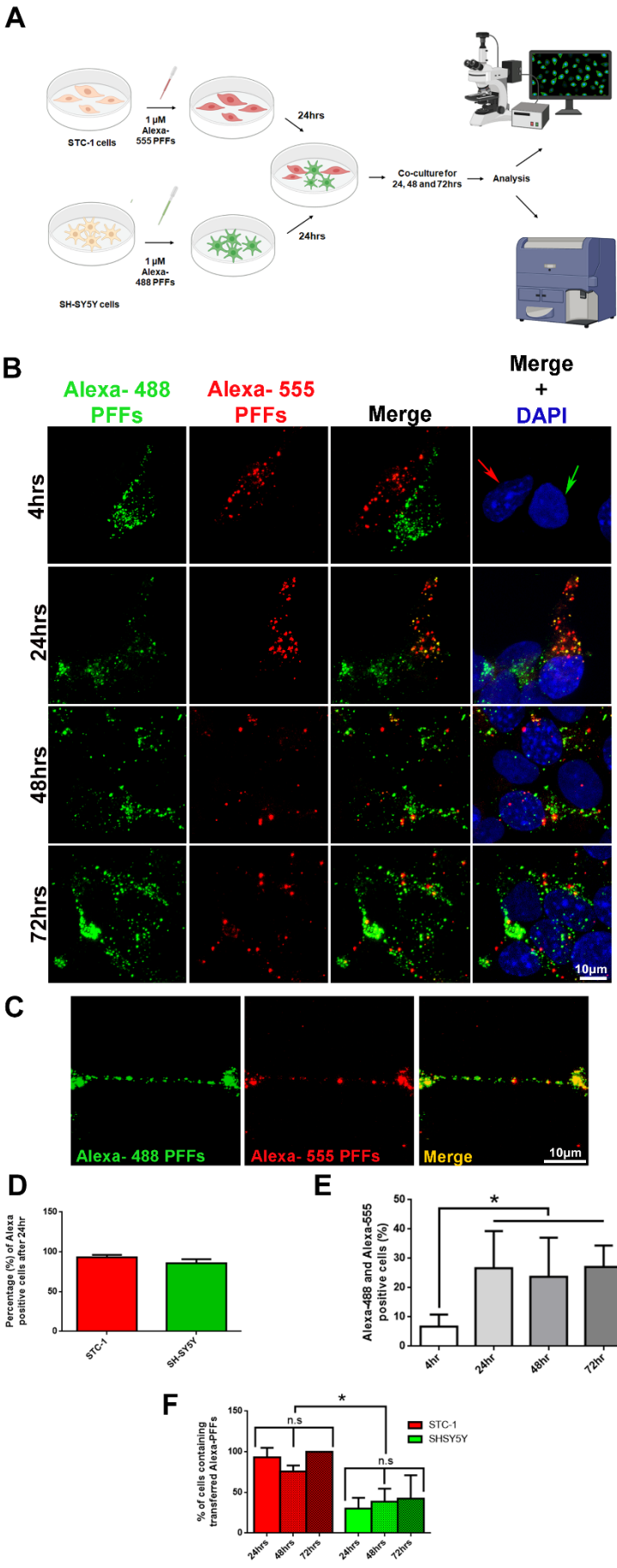


Figura 15. PFFs de α Syn se transferem entre células STC-1 e SH-SY5Y. A) Esquema representativo do delineamento experimental do ensaio de citometria e imunofluorescência para avaliação da transferência de PFFs de α Syn entre duas linhagens celulares. Células STC-1 e SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 6 poços e, após a adesão, as STC-1 foram tratadas com PFFs de α Syn 555 e as SH-SY5Y com PFFs de α Syn 488. Em seguida, as células foram co-cultivadas e após 4, 24, 48 e 72h foram coletadas para realização do ensaio de citometria e imunofluorescência. B) Imagens de microscopia confocal representando em verde, grânulos de PFFs de α Syn 488 em células STC-1 tratadas com 1 μ M de proteína, e em vermelho, grânulos de PFFs de α Syn 555 em células SH-SY5Y tratadas com 1 μ M de α Syn PFF. Na imagem sobreposta é possível ver a colocalização dos grânulos verdes e vermelho (em amarelo). A sobreposição de ambas as marcações está representada no painel à direita. Núcleos estão corados em azul (DAPI). Seta verde indica núcleo da célula STC-1 e seta vermelha indica núcleo da célula SH-SY5Y. C) Imagens representativas de microscopia confocal focalizando um prolongamento de célula STC-1 contendo PFFs de α Syn 555 e PFFs de α Syn 488. Barra de escala dos painéis B e C =10 μ m. D) Gráfico representativo da porcentagem de células STC-1 contendo PFFs de α Syn Alexa-555 (barra vermelha) e de células SH-SY5Y contendo PFFs de α Syn 488 (barra verde) após 24h de incubação. E) Gráfico representando a porcentagem de células positivas, independente da linhagem, para PFFs de α Syn 555 e PFFs de α Syn 488 em relação ao tempo de co-cultura, quantificadas por citometria de fluxo. F) Quantificação da porcentagem de células da co-cultura entre STC-1 e SH-SY5Y imageada por microscopia confocal, contendo PFFs transferidos. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student* (* $p < 0,05$, $n = 55$ células por grupo, 3 experimentos individuais).

Para investigar se a transferência dos agregados de α Syn entre células STC-1 e SH-SY5Y é dependente do contato celular, as células neuronais e enteroendócrinas foram plaqueadas e incubadas com PFFs de α Syn vermelha, e posteriormente, as células foram tripsinizadas, e co-cultivadas separadamente em filtros *transwell*, que permite com que as células sejam cultivadas em um mesmo microambiente, compartilhando o meio de cultura, mas impedidas de realizarem contato físico, conforme está representado na Figura 6. As células que foram previamente tratadas com as PFFs marcados fluorescentemente foram denominadas células doadoras e as células que receberam as PFFs por transferência, células receptoras.

No painel superior das Figuras 16-A, utilizando células STC-1 como doadoras, e 16-C, utilizando as células SH-SY5Y como doadoras, observamos a presença de α Syn apenas nestas células doadoras, não sendo visto o mesmo em células receptoras (painel inferior). Em ambos os casos, independentemente do tempo de co-cultivo entre as linhagens celulares, não houve a transferência de PFFs de α Syn entre células doadoras e receptoras, sugerindo fortemente que o contato célula-célula é fundamental para a transferência de PFFs de uma célula para outra.

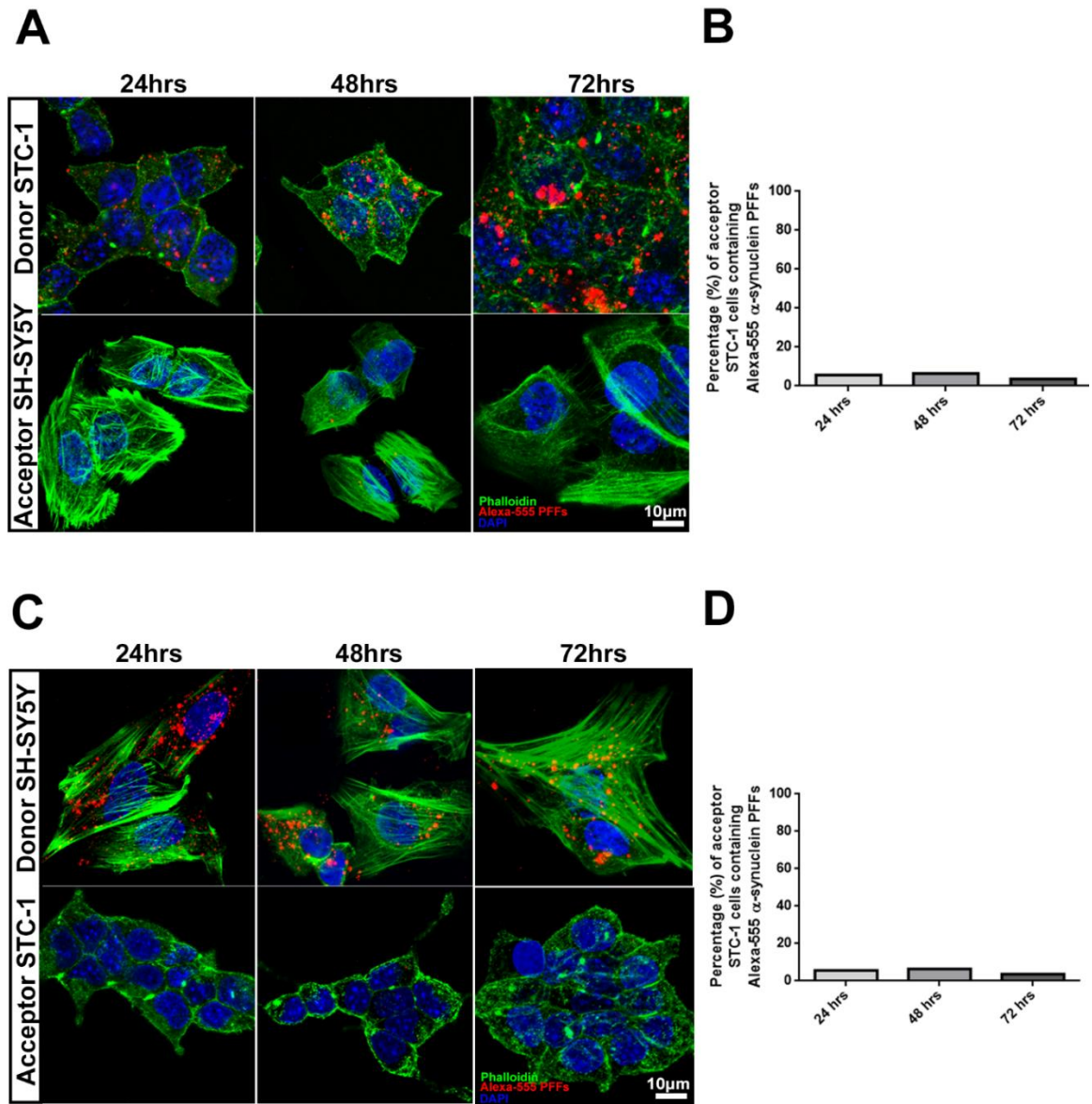


Figura 16. Transferência da α Syn independente do contato célula-célula. A e C) Imagens de microscopia confocal de células doadoras (painel superior) e receptoras (painel inferior) após co-cultura de 24, 48 e 72 horas. Em vermelho, α Syn PFF 555; em verde, citoesqueleto de actina marcado por faloidina-Alexa-488; e em azul, núcleos corados com DAPI. Barras de escala representam 10 μ m. B e D) Gráficos representativos indicando a porcentagem de células STC-1 receptoras de PFFs de α Syn provenientes de células doadoras (SH-SY5Y). E) Porcentagem de células receptoras SH-SY5Y contendo PFFs de α Syn provenientes de células doadoras (STC-1). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Dados foram analisados através do *one-way* ANOVA ou *t-test student* (n=55 células por grupo, de 3 experimentos individuais).

5.7. O silenciamento da Rab35 prejudica a transferência de α Syn PFFs das células enteroendócrinas para as neuronais

Recentemente, utilizando um modelo de *C. elegans*, foi proposto que a transferência de α Syn entre as células é através da participação da Rab35 (BAE et al., 2018). Rabs são pequenas GTPases que participam do tráfego de reciclagem de endossomos em direção a membrana plasmática (GRANT; DONALDSON, 2009). Bae e colaboradores (2018) utilizando vetores lentivirais nas células receptoras viram que aproximadamente 35% da α Syn internalizada colocalizou-se com Rab35. Estes mesmos autores, também viram em um modelo de célula de neuroblastoma, que a superexpressão de Rab35 levou ao aumento da agregação e secreção de α Syn A53T66 e que a Rab35, está diretamente envolvida na propagação de agregados de α Syn de um neurônio para outro no sistema nervoso central (BAE et al., 2018). No entanto, ainda não é conhecido se a Rab35 também é essencial para a transferência de α Syn entre células enteroendócrinas e neuronais. Dessa forma, com intuito de investigar se a Rab35 apresenta função no comportamento *príon-like* da α Syn no eixo intestino-cérebro utilizamos siRNA para o silenciamento desta proteína em células STC-1. Imagens de imunofluorescência (Figura 17A) mostram que células STC-1 expressam Rab35 e que esta pode ser silenciada com 50nM de siRNA específico, como demonstrado pela quantificação dose-resposta realizada por *Western Blotting* (Figura 17C e D).

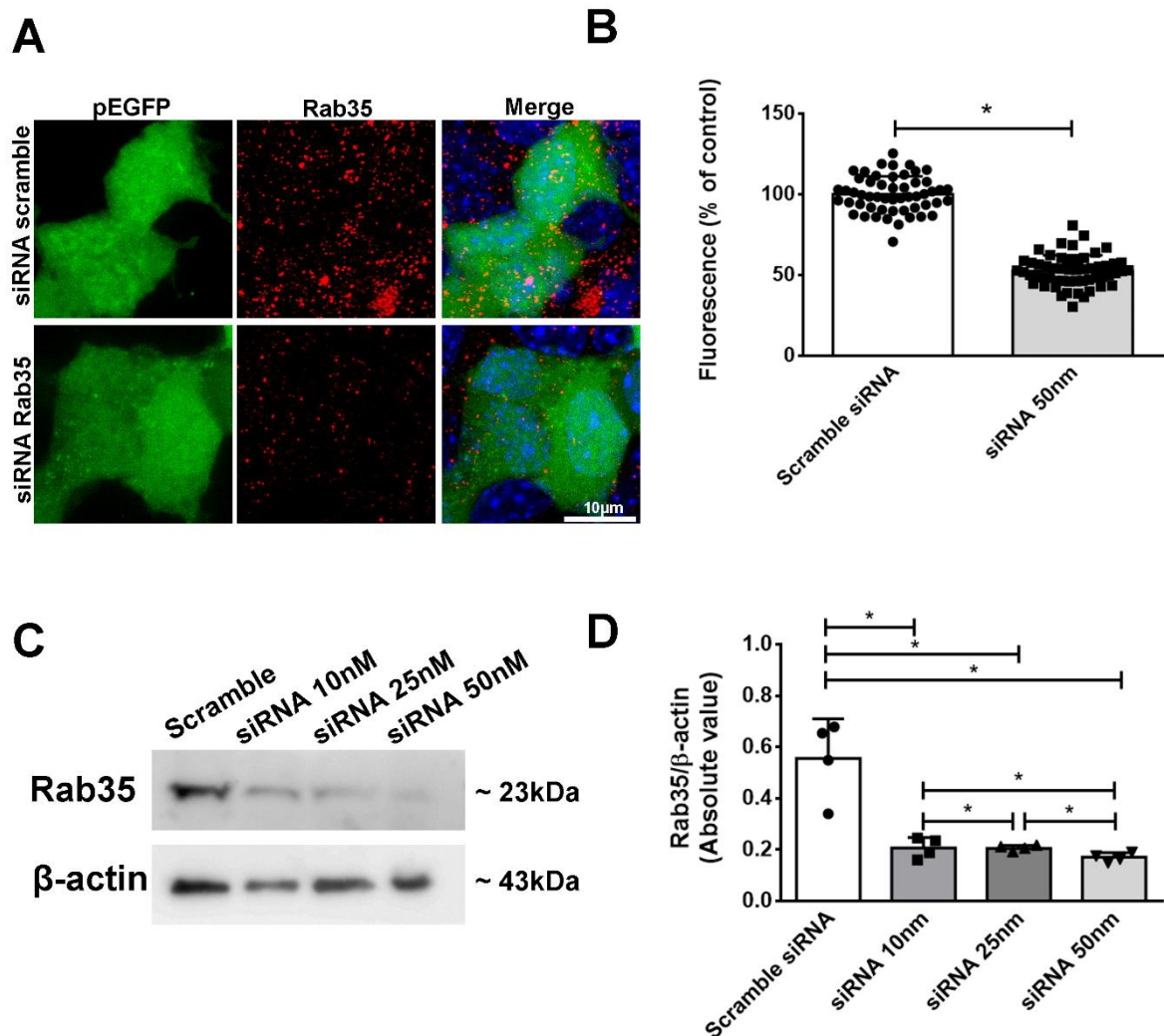


Figura 17. Caracterização do silenciamento de Rab35 em células STC-1 utilizando siRNA. A) Imagens de microscopia confocal demonstrando a redução do sinal fluorescente da Rab35 (vermelho) em células STC-1 após o silenciamento com 50nM de siRNA Scramble (Painel da esquerda) ou Rab35 (painel da direita). As células silenciadas foram identificadas utilizando a cotransfecção com um plasmídeo repórter de GFP B) Quantificação da fluorescência da Rab35. (* $P < 0,05$ pelo teste t de student. $N = 55$ células de 3 experimentos individuais). C) Western blotting do silenciamento utilizando diferentes concentrações de siRNA e siRNA scramble como controle. D) Quantificação densitométrica da Rab35 em células controle e silenciadas. (* $P < 0,05$, teste-t de Student. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos individuais por grupo).

Para abordar se Rab35 está associada à transferência célula-a-célula de fibrilas α Syn de STC-1 para células SH-SY5Y, células STC-1 foram silenciadas com siRNA específico de Rab35, carregadas com PFFs de α Syn marcadas com Alexa-633 e co-cultivadas células SH-SY5Y por 48 horas. As figuras 18 A-B mostram imagens representativas da co-cultura de células STC-1 silenciadas e células SH-SY5Y. Conforme mencionado anteriormente, é possível identificar cada linhagem celular pela morfologia nuclear (núcleos das células SH-SY5Y

marcados com asteriscos). Quando quantificado o número de células SH-SY5Y contendo PFFs positivos para Alexa-633 em relação ao número total de SH-SY5Y em cada imagem, detectamos um número reduzido no grupo co-cultivado com células STC-1 silenciadas com Rab35, sugerindo que a GTPase desempenha um papel importante na transferência de fibrilas de α Syn entre as células.

Para confirmar que os efeitos observados não foram devido a um déficit na internalização de PFF devido ao silenciamento de Rab35, mas especificamente devido ao comprometimento na transferência de PFF de células STC-1 silenciadas para células SH-SY5Y, usamos um repórter GFP-2A- α Synucleína-RFP (KARA et al., 2021; WEGMANN et al., 2015). Nesta construção, a proteína traduzida é clivada no peptídeo 2A em duas proteínas: GFP e α Syn-RFP. α Syn-RFP é então transferido para células vizinhas sem transferência concomitante de GFP (Figura 18C). Desse modo, células doadoras e receptoras podem ser identificadas por suas cores: as células que expressam α Syn por meio de transfecção são positivas para GFP e RFP, enquanto as células que recebem α Syn por transferência são positivas apenas para RFP. Neste caso, as células STC-1 foram co-transfectadas com siRNA específico de Rab35 e a construção de DNA plasmidial. Após 48 h de expressão, monitoramos o número de células STC-1 positivas para RFP (RFP +), mas negativas para GFP (GFP-). Em um experimento de curso temporal (3, 5 ou 7 dias de co-cultura) com células de controle, encontramos um aumento ao longo do tempo do número de células RFP + GFP- que receberam α Syn-RFP por transferência. No entanto, a taxa de transferência de α Syn-RFP é muito reduzida em células silenciadas com Rab35 (Figura 18 D-F). Portanto, com as duas abordagens utilizadas, confirmamos que o silenciamento de Rab35 na linhagem de células enteroendócrinas STC-1 diminui a taxa de transferência de fibrilas α Syn entre as células.

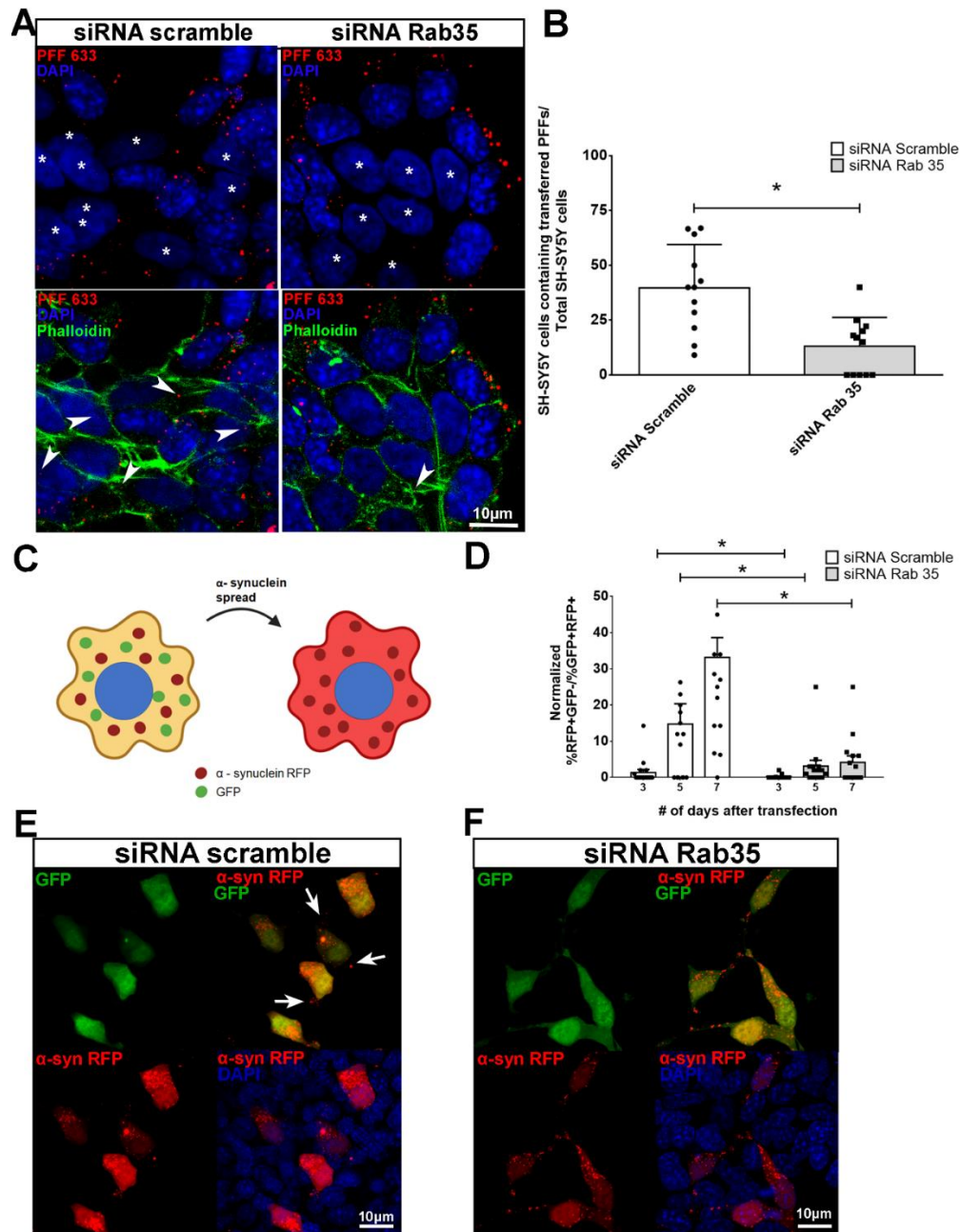


Figura 18. O silenciamento de Rab35 GTPase em células STC-1 inibe a translocação e a propagação das fibrilas α Syn. A) Imagens de microscopia confocal de células STC-1 silenciadas por siRNA específico para Rab35 e co-cultivadas com células SH-SH5Y (asteriscos) por 24h. As células STC-1 foram silenciadas por 24 h, carregadas com PFFs marcados com Alexa-633 pelas próximas 24 h, tripsinizadas e co-cultivadas com o mesmo número de células SH-SY5Y por 24 h. O citoesqueleto de actina foi marcado com faloidina-Alexa 488 e os núcleos com DAPI. B) As barras mostram o número de células SH-SY5Y contendo PFFs marcados com Alexa-633 transferidos normalizados pelo número total de núcleos de células SH-SY5Y por imagem. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. de 12 imagens obtidas a partir de 4 experimentos independentes por condição. * $p < 0,05$ pelo teste t de *Student* bicaudal. C) Desenho animado que descreve a lógica por trás do ensaio de transferência α Syn usado, com base na construção GFP-2A- α Syn-RFP. D) Experimento de curso temporal em que as células

STC-1 foram silenciadas com siRNA específico para Rab35 (ou scramble) por 24 h, transfectadas com o construto GFP-2A- α Syn-RFP, seguido por coleta nos dias 3, 5 e 7 e análise por citometria de fluxo. Este experimento foi repetido independentemente 5 vezes. Os dados foram normalizados para as amostras coletadas 3 dias após a transfecção (ANOVA unilateral com um teste de tendência, * $p < 0,05$). E) Imagens de microscopia confocal representativas que mostram células STC-1 controle que foram transfectadas com o construto GFP-2A- α Syn-RFP e são duplamente positivas para GFP e RFP, e células que receberam α Syn-RFP por transferência e são positivas para RFP, mas negativas para GFP (setas). Barras de escala, 10 μ m. F) Imagens de microscopia confocal representativas mostrando células STC-1 silenciadas por Rab35 que foram transfectadas com o construto GFP-2A- α Syn-RFP e são duplamente positivas para GFP e RFP. Nenhuma transferência de α Syn-RFP pôde ser detectada. Para os experimentos retratados em (E) e (F), as células foram cultivadas por 3, 5 e 7 dias. Barras de escala, 10 μ m.

5.8. O silenciamento de Rab35 redireciona as fibrilas α Syn para compartimentos lisossomais

Rab35 desempenha papéis importantes na reciclagem endossômica e na remodelação do filamento de actina (CHINEAU et al., 2013; KLINKERT, ECHARD, 2016). Considerando seu papel na reciclagem endossômica, é tentador especular se o silenciamento de Rab35 direcionaria os agregados α Syn internalizados para a via de degradação lisossomal. Quando silenciamos Rab35 e incubamos células STC-1 com α Syn PFFs por 4 e 24 h, observamos que o nível internalizado de PFFs foi significativamente reduzido quando comparado às células controle. Curiosamente, nenhuma diferença foi observada imediatamente após 4 h de incubação (Figura 19 A e B). Uma vez que o silenciamento de Rab35 também diminui a transferência de PFFs entre as células, esta observação reforçou nossa hipótese de que de alguma forma o silenciamento de Rab35 poderia estar levando as PFFs de α Syn à degradação lisossomal. A incubação de células STC-1 controle com PFFs por 1, 4 e 24 h mostrou que, após 4 h, ~ 60% dos pontos de α Syn estavam co-localizados com vesículas positivas para Lysotracker (Figura 20). Estendendo esta observação para células STC-1 silenciadas para Rab35, realizamos uma co-transfecção com siRNA específico de Rab35 e um plasmídeo expressando GFP para visualizar células silenciadas. A incubação das células com PFFs por 4 e 24 h mostrou que a taxa de co-localização de pontos positivos para Alexa-633 com vesículas positivas para Lysotracker foi consideravelmente maior em células silenciadas para Rab35 em comparação com as células controle imediatamente após o período de incubação de 4 horas. Tomados em conjunto, esses resultados apoiam a noção de que Rab35 desempenha um papel importante no mecanismo de transferência de fibrilas α Syn iniciadas em CEEs e que a inibição de Rab35 aumenta a depuração de fibrilas α Syn, redirecionando-as para o compartimento lisossomal.

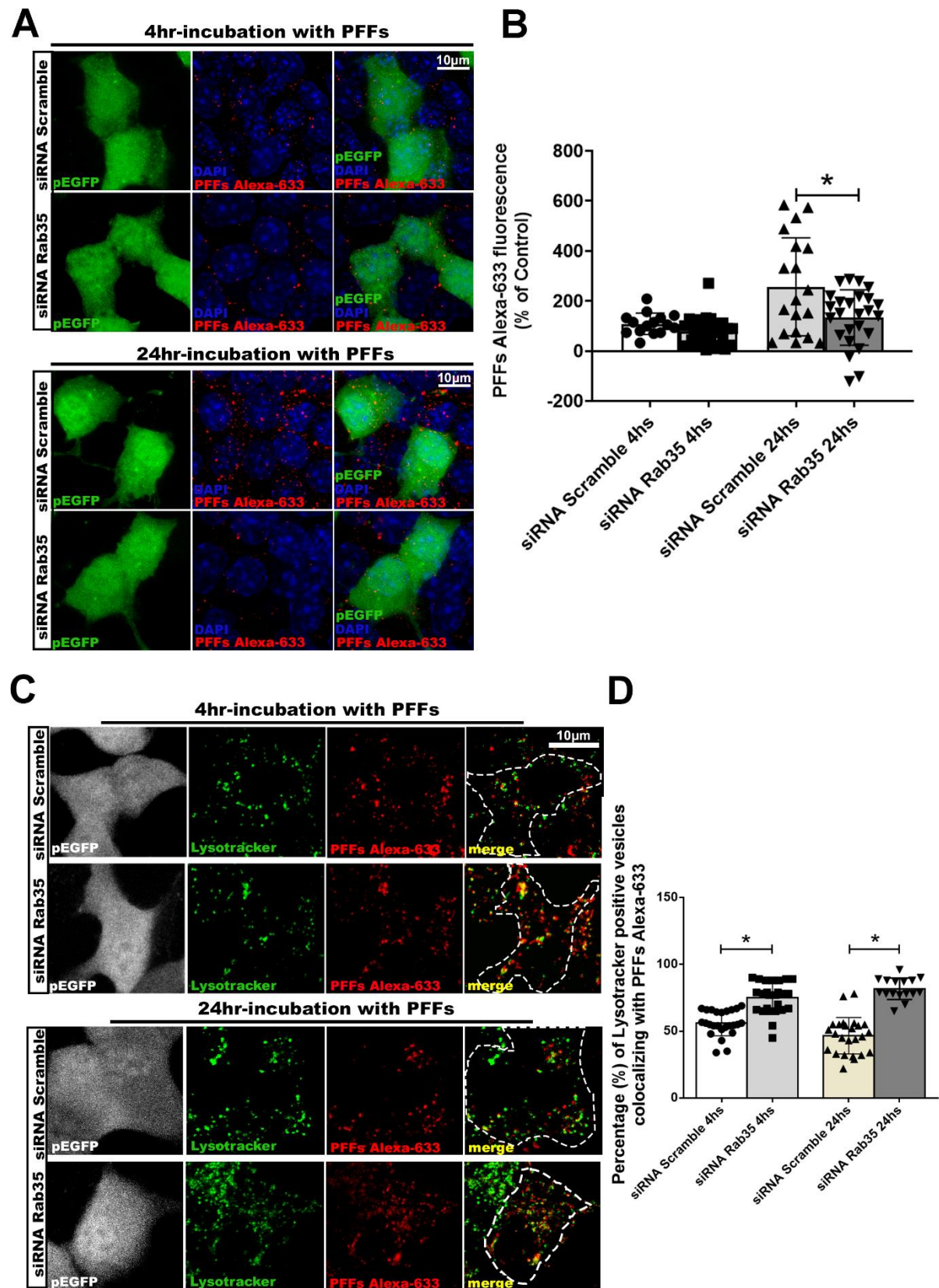


Figura 19. Silenciamento de Rab35 GTPase em células STC-1 redireciona as PFFs de α Syn para lisossomos.

A) Imagens representativas de células STC-1 co-transfectadas com pEGFP e *scramble* / siRNA específico para Rab35 e incubadas por 4 (painel superior) ou 24 h (painel inferior) com PFFs de α Syn -Alexa 633 marcados. B) O gráfico mostra a quantificação da fluorescência de Alexa-633 em células pEGFP-positivas como as

representadas em (A). Pode-se observar que após 24 h de incubação com PFFs, as células STC1 silenciadas para Rab35 apresentam um nível reduzido de fluorescência do Alexa-633, mas nenhuma diferença foi observada no período de incubação de 4 h. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. ANOVA unilateral com um teste de tendência, * $p < 0,05$. Este experimento foi repetido independentemente 5 vezes e pelo menos 20 imagens foram analisadas. C) Imagens representativas de células STC-1 co-transfectadas com pEGFP e *scramble* / siRNA específico para Rab 35 e incubadas por 4 (painel superior) ou 24 h (painel inferior) com PFFs de α Syn marcados com Alexa-633. Após o período de incubação, as células foram marcadas com Lysotracker. D) O gráfico mostra a quantificação (%) de vesículas Lysotracker-positivas (verdes) co-localizadas com PFFs Alexa-633 (vermelho) em células pEGFP-positivas (cinza) como as representadas em (c). Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. ANOVA unilateral, * $p < 0,05$. Este experimento foi repetido independentemente 5 vezes e pelo menos 20 imagens foram analisadas. Barras de escala, 10 μ m.

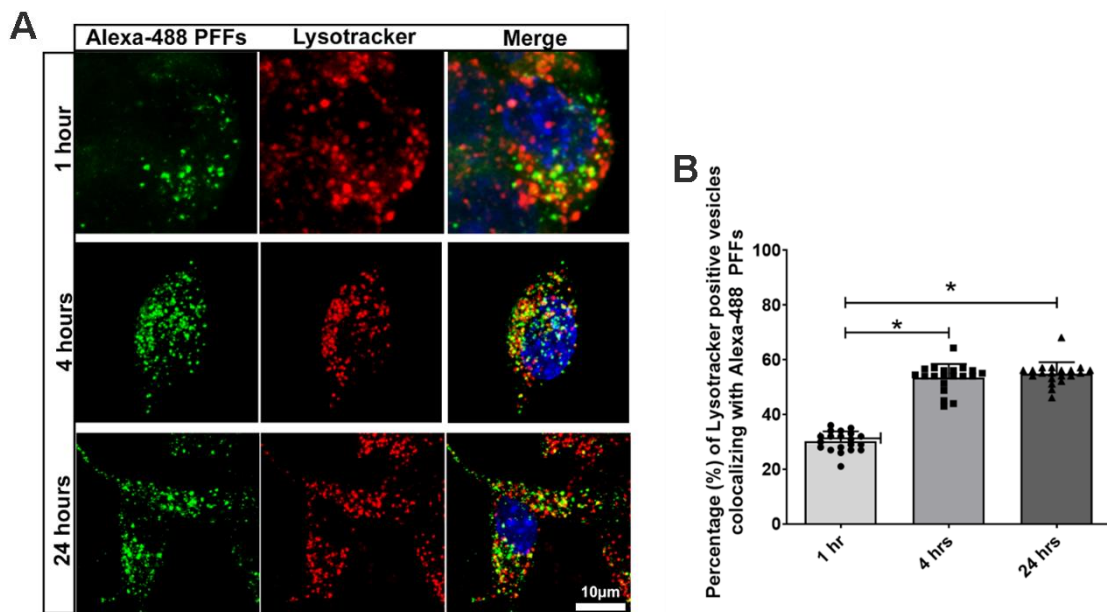


Figura 20. As PFFs de α Syn internalizadas são encontradas em vesículas lisossômiais no citosol das células STC-1. A) Imagens representativas da co-localização de pontos α Syn positivos para-Alexa-488 (em verde) com vesículas lisossômicas (Lysotracker red DND-99) (em vermelho) após 4, 24 e 48 horas de tratamento. A barra de escala representa 10 μ m. B) A porcentagem de colocalização de vesículas LysoTracker-positivas com fibrilas α Syn revelou que 80% das PFFs internalizados colocalizam com lisossomas após 24 horas. Os valores são expressos como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ por média $\pm$ S.E.M. ANOVA unilateral de três experiências independentes.

6. DISCUSSÃO

Embora os riscos genéticos tenham sido identificados e com aproximadamente 90% dos diagnósticos da DP sendo caracterizados como esporádicos (NAALS et al., 2014), os fatores que causam a doença permanecem obscuros. Interações entre fatores genéticos e ambientais, como toxinas, provavelmente desencadeiam a patogênese ao estimular a oligomerização e agregação da α Syn. Curiosamente, a presença da α Syn patológica na DP não se limita ao cérebro. Esta hipótese é apoiada por observações de inclusões contendo α Syn em tecido nervoso periférico, incluindo o SNE, de pacientes com DP e de indivíduos saudáveis. Além disso, a ideia de propagação patológica de α Syn ganhou muita atenção desde que foi demonstrada a propagação hospedeiro-para-enxerto da patologia do tipo Lewy α Syn-positiva em transplantes mesencefálicos de longo prazo em DP (LI et al., 2008; DESPLATS et al., 2009). A transferência de α Syn entre células neuronais co-cultivadas *in vitro* (ABOUNIT et al., 2016; DESPLATS et al., 2009) e a indicação de propagação bidirecional de α Syn através do nervo vago também foram demonstradas (VAN DEN BERGE et al., 2019). No entanto, desde o surgimento das CEEs como um possível local para o surgimento da patologia, ainda está por ser demonstrado se / como os agregados de α Syn podem ser transferidos das CEEs para as células neuronais.

As CEEs são diretamente influenciadas pelo microambiente do lúmen intestinal e estão em contato com os neurônios do SNE. Portanto, é razoável supor que o dobramento incorreto de α Syn pode começar nas CEEs (PEDRO AMORIM NETO et al., 2021), se propagar do epitélio intestinal para o SNE e então ser transferido para o SNC. A caracterização desse processo é fundamental para a compreensão da patologia e para o desenho de estratégias que visem interferir na propagação da DP.

Neste trabalho, determinamos como as PFFs de α Syn são internalizadas por CEEs e, em seguida, transmitidos desta linhagem de células para a linhagem de células neuronais SH-SY5Y. Observamos que PFFs de α Syn podem ser internalizados com eficiência por organóides cerebrais derivados de iPSCs e desencadear um processo de agregação uma vez dentro da estrutura. Quando PFFs de α Syn são administrados no lúmen duodenal de camundongos, essas fibrilas são absorvidas pelo órgão em 30 minutos. Curiosamente, as PFFs foram encontradas não apenas nos enterócitos, mas também no citoplasma de CEEs do epitélio intestinal positivas para α Syn. Embora as CEEs estejam localizados no epitélio intestinal, elas se comportam de maneira diferente dos enterócitos regulares, podendo residir na mucosa por meses, em vez de

serem substituídos a cada 3-5 dias (BOHÓRQUEZ et al., 2015). Portanto, é provável que a conexão neuronal-CEEs seja longa o suficiente para transmitir eventos patológicos.

Ao caracterizar completamente a internalização das PFFs pelas CEEs, mostramos que estes PFFs de α Syn iniciam uma sinalização de Ca^{2+} intracelular e ativam eventos endocíticos na linhagem de células enteroendócrinas STC-1, compartilhando essas semelhanças com a linhagem de células neuronais SH-SY5Y. A observação direta do brotamento da vesícula endocítica em tempo real que oferecemos aqui, fortalece os achados anteriores relatando que a presença de inibidores de dinamina (que bloqueiam a cisão da membrana) bloqueia a internalização das fibrilas, sugerindo o envolvimento da via endocítica neste processo (MASARACCHIA et al., 2018; APETRI et al., 2016). Além disso, mostramos que a propagação das PFFs de α Syn de CEEs para neuronais é dependente do contato físico célula-célula e da Rab35 GTPase.

Foi anteriormente relatado que o contato célula-célula entre células neuronais *in vitro* reduziu a transferência de fibrilas α Syn (ABOUNIT et al., 2016). Além disso, embora a secreção de fibrilas α Syn já tenha sido sugerida como o principal caminho para a transferência α Syn, o contato físico entre as células aumenta significativamente a taxa de transferência (DESPLATS et al., 2009; BAE et al., 2018; HANSEN et al., 2011). Isso indica que o contato físico célula-célula ou a proximidade entre as células é essencial para a transferência eficiente de fibrilas de α Syn. Vale ressaltar que os mecanismos de transferência de α Syn entre CEEs e células neuronais nunca foram demonstrados. Usando PFFs de α Syn com diferentes fluoróforos, também demonstramos aqui que a transferência intercelular de fibrilas de α Syn pode acontecer de forma retrógrada do sistema nervoso para CEEs. Esta noção é apoiada por um estudo recente realizado *in vivo* em que a evidência da propagação de α Syn para o coração através do nervo vago veio à tona (VAN DEN BERGE et al., 2019). Curiosamente, em nossas condições experimentais, a propagação de fibrilas α Syn de células neuronais para CEEs mostrou-se ainda mais eficiente do que a rota oposta. Portanto, se a presença de agregados α Syn nos CEEs é um evento secundário da patologia de α Syn iniciada no SNE ou no SNC pode ter uma importância significativa para a compreensão do papel das CEEs na DP.

Nosso trabalho também reforça o papel da Rab35 GTPase como um personagem molecular chave na propagação de α Syn. Rab35 foi reconhecida como o regulador de vários eventos importantes da fisiologia neuronal, incluindo crescimento de neuritos (CHEVANLLIER et al., 2009), citocinese (DAMBOURNET et al., 2011), polaridade celular

(KLINKERT et al., 2016) e secreção de exossomos (HU et al., 2010). Os achados de um estudo anterior refletem os nossos, já que esse estudo relatou que a propagação de α Syn entre os neurônios é aumentada devido à ativação de Rab35 (BAE et al., 2018). No entanto, de acordo com nossos resultados, este parece ser um mecanismo compartilhado entre neurônios e CEEs, uma vez que as CEEs silenciadas para Rab35 exibiram níveis aumentados de PFFs Alexa-633 positivos internalizados após 24 horas em comparação com as células controle. Além disso, mostramos que Rab35 está principalmente envolvido na propagação de Rab35 e não na internalização, desviando os agregados de α Syn internalizados da degradação lisossomal, o que leva à amplificação de agregados e propagação contínua. Embora seja conhecido o papel do Rab35 na reciclagem endossômica e na remodelação do filamento de actina (CHINEAU et al., 2013; KLINKERT et al., 2016), como a ativação do Rab35 regula com precisão a propagação do α Syn ainda não está claro.

7. CONCLUSÃO

Em resumo, nossas descobertas sugerem que as CEEs representam um elemento-chave na hipótese do intestino-cérebro para o surgimento e progressão da patologia da α Syn. Essas células mostraram ser capazes de internalizar e propagar fibrilas de α Syn para células neuronais vizinhas de uma maneira dependente do contato celular e Rab35 de forma semelhante ao que foi mostrado anteriormente em neurônios (BAE et al., 2018). Isso representa um grande avanço na compreensão dos mecanismos subjacentes à progressão das sinucleinopatias, mudando o foco da etiologia da DP para o sistema nervoso periférico e colocando o Rab35 GTPase como um alvo a ser considerado em futura intervenção farmacológica para prevenir a progressão da DP.

8. REFERENCIAS

- ABOUT, S. et al. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 19, p. 2120–2138, 2016.
- AMANDA J. COCHILLA; JOSEPH K. ANGLESON, A.; BETZ, W. J. MONITORING SECRETORY MEMBRANE WITH FM1-43 FLUORESCENCE. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.1>, v. 22, p. 1–10, 28 nov. 2003.
- ANGELOVA, P. R. et al. Ca²⁺ is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 9, p. 1792–1801, 2016.
- ANGOT, E. et al. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 21 jun. 2012.
- ANGOT, E.; BRUNDIN, P. Dissecting the potential molecular mechanisms underlying α -synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. SUPPL. 3, dez. 2009.
- APETRI M.M., et al. Direct Observation of alpha-Synuclein Amyloid Aggregates in Endocytic Vesicles of Neuroblastoma Cells. *PloS one*, 11(4):e0153020, 2016.
- ARTIS, D.; GRENCIS, R. K. **The intestinal epithelium: Sensors to effectors in nematode infection** *Mucosal Immunology* Mucosal Immunol, , jul. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079187/>>. Acesso em: 28 jul. 2021
- ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 1 nov. 2016.
- BAE, E. J. et al. LRRK2 kinase regulates α -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.
- BARTELS, Tim (Ed.). **Alpha-Synuclein: Methods and Protocols**. Hertfordshire: Humana Press, 2019.
- BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of α -synuclein. **Neuron**, v. 79, n. 6, p. 1044–1066, 18 set. 2013.
- BOHÓRQUEZ, D. V. et al. An enteroendocrine cell - Enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89881, 26 fev. 2014.
- BOHÓRQUEZ, D. V. et al. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 2, p. 782–786, 2 fev. 2015.
- BOUSSET, L. et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, mar. 2003a.

BRAAK, H. et al. Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 5, p. 517–536, 1 maio 2003b.

BRAAK, H. et al. **Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology** *Cell and Tissue Research*, out. 2004.

BRAVO, J. A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16050–16055, 20 set. 2011.

BURCHARD, W. Dynamic light scattering. **Polysaccharide Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications**, p. 167–207, 2016.

BURKE, R. E.; O'MALLEY, K. **Axon degeneration in Parkinson's disease** *Experimental Neurology* Exp Neurol, , ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285449/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

BURRÉ, J. et al. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. **Science**, v. 329, n. 5999, p. 1663–1667, 24 set. 2010.

BURRÉ, J. et al. Properties of native brain α -synuclein. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. E4–E6, 12 jun. 2013.

BUTLER, B.; SAMBO, D.; KHOSHBOUEI, H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 83–84, p. 41–49, 1 out. 2017.

CAMP, J. G. et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 51, p. 15672–15677, 22 dez. 2015.

CHAI NEAU M., et al. Rab35: GEFs, GAPs and effectors. **Traffic** 2013, **14**(11):1109-1117.

CHALLIS, C. et al. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 327–336, 2020.

CHANDRA, R. et al. α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. **JCI insight**, v. 2, n. 12, p. 1–13, 2017.

CHEVALLIER J., et al. Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape. *FEBS letters*, 583(7):1096-1101, 2009.

CHUNG, H. K. et al. Modeling α -Synuclein Propagation with Preformed Fibril Injections.

Journal of Movement Disorders, v. 13, n. 1, p. 77–79, 2020.

CHUNG, K. K. K. et al. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: Implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. **Nature Medicine**, v. 7, n. 10, p. 1144–1150, 2001.

CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. The synucleins: A family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 6, p. 249–254, 1 jun. 1998.

CLOUD L.J., GREENE J.G. Gastrointestinal features of Parkinson's disease. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 11:379–384, 2011.

COCHILLA A.J., ANGLESON J.K., BETZ W.J. Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. **Annual review of neuroscience**, 1999, 22:1-10, 1999

COLLINS, S. M.; BERCIK, P. The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 2003–2014, 2009.

CONWAY, K. A.; HARPER, J. D.; LANSBURY, P. T. Fibrils formed *in vitro* from α -synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. **Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2552–2563, 14 mar. 2000.

CRYAN, J. F. et al. The gut microbiome in neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 2, p. 179–194, 1 fev. 2020.

CUERVO, A. M. et al. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. **Science**, v. 305, n. 5688, p. 1292–1295, 27 ago. 2004.

DAMBOURNET D., et al. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature cell biology*, 13(8):981-988, 2011.

DESPLATS, P. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 13010–13015, 4 ago. 2009.

DETTMER, U. et al. KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal α -synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 31, p. 9596–9601, 4 ago. 2015.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. **The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease** *Gastroenterology Clinics of North America* Gastroenterol Clin North Am, , 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164854/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

DIXON, E. E.; WOODWARD, O. M. Three-dimensional *in vitro* models answer the right

questions in ADPKD cystogenesis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 315, n. 2, p. F332–F335, 1 ago. 2018.

DUTTA, S. K. et al. **Parkinson's disease: The emerging role of gut dysbiosis, antibiotics, probiotics, and fecal microbiota transplantation** *Journal of Neurogastroenterology and Motility* J Neurogastroenterol Motil, , 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31327219/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

EDWARDS L.L., QUIGLEY E.M.M., HOFMAN R., PFEIFFER R.F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* 42:726–732, 1992.

ELIEZER, D. et al. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 4, p. 1061–1073, 2001.

FONSECA, Matheus et al. Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X. *Isience*, v. 24, n. 8, p. 102841, 2021.

FORSYTHE, P. et al. **Mood and gut feelings** *Brain, Behavior, and Immunity* Brain Behav Immun, , jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19481599/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

FUKAE, J.; MIZUNO, Y.; HATTORI, N. **Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease** *Mitochondrion* Mitochondrion, , fev. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17300997/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 2012.

GAFFIELD, M. A.; BETZ, W. J. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2916–2921, jan. 2007.

GHAISAS, S.; MAHER, J.; KANTHASAMY, A. **Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases** *Pharmacology and Therapeutics* Pharmacol Ther, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26627987/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 492–501, jul. 2001.

GOEDERT, M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. **Science**, v. 349, n. 6248, 7 ago. 2015.

GRANT, B. D.; DONALDSON, J. G. **Pathways and mechanisms of endocytic recycling** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , set. 2009.

Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm2755>>. Acesso em: 28 jul. 2021

HANSEN, C. et al. α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 715–725, 1 fev. 2011.

HANSEN, C.; LI, J. Y. Beyond α -synuclein transfer: Pathology propagation in Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 248–255, 1 maio 2012.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. **A timeline for Parkinson's disease****Parkinsonism and Related Disorders**Parkinsonism Relat Disord, , fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846332/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, F. M. **Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis****Nature Clinical Practice Neurology**Nat Clin Pract Neurol, , 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18978800/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

HU C, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of cell biology*, 189(2):223-232, 2010.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. **Inter-kingdom signalling: Communication between bacteria and their hosts****Nature Reviews Microbiology**Nat Rev Microbiol, , fev. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18197168/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

JAKHRIA, T. et al. β 2-microglobulin amyloid fibrils are nanoparticles that disrupt lysosomal membrane protein trafficking and inhibit protein degradation by lysosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35781–35794, 26 dez. 2014.

JANAS, J.; SKOWRONSKI, J.; VAN AELST, L. **Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons****Methods in Enzymology**Methods Enzymol, , 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16472690/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

JANKOVIC, J. Current concepts in Parkinson's disease and other movement disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 25, n. 4, p. 429–432, ago. 2012.

JO, E. et al. α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34328–34334, 3 nov. 2000.

KAMP, F. et al. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. **EMBO Journal**, v. 29, n. 20, p. 3571–3589, out. 2010.

KANAAN, N. M.; MANFREDSSON, F. P. Loss of Functional Alpha-Synuclein: A Toxic Event in Parkinson's Disease? **Journal of Parkinson's Disease**, v. 2, n. 4, p. 249–267, 1 jan. 2012.

KAPLAN, B.; RATNER, V.; HAAS, E. **α -synuclein: Its biological function and role in neurodegenerative diseases****Journal of Molecular Neuroscience**J Mol Neurosci, , abr. 2003a.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12794302/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

KAPLAN, B.; RATNER, V.; HAAS, E. α -synuclein: Its biological function and role in neurodegenerative diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 83–92, abr. 2003b.

KARA E, CRIMI A, WIEDMER A, EMMENEGGER M, MANZONI C, BANDRES-CIGA S, D'SA K, REYNOLDS RH, BOTIA JA, LOSA M. An integrated genomic approach to dissect the genetic landscape regulating the cell-to-cell transfer of alpha-synuclein. **Cell reports**, 35(10):109189, 2021

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. **How to study proteins by circular dichroism***Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*Biochim Biophys Acta, , 10 ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16027053/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

KIM, S. et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627– 641.e7, 2019.

KINGSBURY, A. E. et al. Brain stem pathology in Parkinson's disease: An evaluation of the Braak staging model. **Movement Disorders**, v. 25, n. 15, p. 2508–2515, nov. 2010.

KLINKERT K., ECHARD A. Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. **Traffic**, 17(10):1063-1077, 2016

KOPRICH, J. B.; KALIA, L. V.; BROTHIE, J. M. **Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development***Nature Reviews Neuroscience*Nat Rev Neurosci, , 21 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747776/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

KORDOWER, J. H. et al. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 504–506, maio 2008.

KORDOWER, J. H. et al. Transfer of host-derived alpha synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 3, p. 552–557, set. 2011.

LEBOUVIER, T. et al. **The second brain and Parkinson's disease***European Journal of Neuroscience*Eur J Neurosci, , set. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19712093/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

LI, J. Y. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 501–503, maio 2008.

LUK, K. C. et al. Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 47, p. 20051–20056, 2009a.

LUK, K. C. et al. PNAS-2009-Luk-20051-6.pdf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 20051–20056, 2009b.

LUK, K. C. et al. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 975–988, 7 maio 2012.

LUNA, E. et al. Differential α -synuclein expression contributes to selective vulnerability of hippocampal neuron subpopulations to fibril-induced toxicity. **Acta Neuropathologica**, v. 135, n. 6, p. 855–875, 1 jun. 2018.

LUO, C. et al. Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. **Cell Reports**, v. 17, n. 12, p. 3369–3384, 20 dez. 2016.

LYTE, M. et al. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. **Physiology and Behavior**, v. 89, n. 3, p. 350–357, 30 out. 2006.

MAO, X. et al. Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. **Science**, v. 353, n. 6307, 2016.

MARQUES, O.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein: From secretion to dysfunction and death. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 7, jul. 2012.

MASARACCHIA C, et al. Membrane binding, internalization, and sorting of alpha-synuclein in the cell. **Acta neuropathologica communications**, 6(1):79, 2018.

MAYER, E. A. et al. **Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: A Rome Working Team Report** *Neurogastroenterology and Motility* Neurogastroenterol Motil, , jun. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19646070/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

MAYER, E. A. Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 453–466, 2011.

MAYER, E. A.; TILLISCH, K.; GUPTA, A. **Gut/brain axis and the microbiota** *Journal of Clinical Investigation* J Clin Invest, , 2 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25689247/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

MCCANN H., STEVENS C.H., CARTWRIGHT H., HALLIDAY G.M.: **alpha-Synucleinopathy phenotypes**. *Parkinsonism & related disorders* 2014, **20 Suppl 1**:S62-67.

MCLEAN, P. J. et al. Membrane association and protein conformation of α -synuclein in intact neurons. Effect of Parkinson's disease-linked mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8812–8816, 24 mar. 2000.

NALLS M.A. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. **Nature genetics** 2014, 46(9):989-993.

NAKAMURA, K. et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20710–20726, 10 jun. 2011.

NASCIMENTO, J. M. et al. Human Cerebral Organoids and Fetal Brain Tissue Share Proteomic Similarities. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 28 nov. 2019.

NATALE, G. et al. Parkinson's disease and the gut: A well known clinical association in need of an effective cure and explanation. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, n. 7, p. 741–749, jul. 2008.

NORRIS, E. H.; GIASSEN, B. I.; LEE, V. M. Y. α -Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 60, p. 17–54, 2004.

O'SULLIVAN, S. S. et al. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: A clinicopathological study. **Movement Disorders**, v. 23, n. 1, p. 101–106, 15 jan. 2008.

OCHOA-REPÁRAZ, J. et al. Gut, bugs, and brain: Role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 240–247, fev. 2011.

ORIMO, S. **Clinical and pathological study on early diagnosis of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies**. Clinical Neurology. **Anais...Rinsho Shinkeigaku**, 2008Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19198094/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

OTTOLINI, D; CALÍ, T; SZABÒ, I; BRINI, M. Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: functional and dysfunctional implications. **Biological chemistry**, v. 398, n. 1, p. 77–100, 1 jan. 2017.

PAN-MONTOJO, F. et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 19 jan. 2010.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. **The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism****Nature Reviews Endocrinology**Nat Rev Endocrinol, , dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23169440/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

PEDRO AMORIM NETO, D. et al. Commensal Gut Bacterium Akkermansia Muciniphila Secretome Induces Mitochondrial Calcium Overload and α -Synuclein Aggregation in Enteroendocrine Cells. 14 jul. 2021.

PEELAERTS W., BOUSSET L., VAN DER PERREN A., MOSKALYUK A., PULIZZI R., GIUGLIANO M., VAN DEN HAUTE C., MELKI R., BAEKELANDT V.: alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. **Nature**.

522(7556):340-344, 2015.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 23 mar. 2017.

PRINGSHEIM, T. et al. **The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis** *Movement Disorders*, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24976103/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

QUADRATO, G. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. **Nature**, v. 545, n. 7652, p. 48–53, 4 maio 2017.

RAO, G. et al. Does this patient have Parkinson disease? **Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 3, p. 347–353, 15 jan. 2003.

RCOM-H'CHEO-GAUTHIER, A.; GOODWIN, J.; POUNTNEY, D. L. **Interactions between calcium and alpha-synuclein in neurodegeneration** *Biomolecules*, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25256602/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

RECASENS, A. et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. **Annals of Neurology**, v. 75, n. 3, p. 351–362, 2014.

REY, N. L. et al. Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 4, p. 555–573, 1 out. 2013.

RHEE, S. H.; POTHOUKAKIS, C.; MAYER, E. A. **Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19404271/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

ROBERTS, H. L.; BROWN, D. R. **Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein** *Biomolecules*, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25816357/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

ROSTAMI, J. et al. Human astrocytes transfer aggregated alpha-synuclein via tunneling nanotubes. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 49, p. 11835–11853, 6 dez. 2017.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. **The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease** *Nature Reviews Immunology*, maio 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19343057/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

ROVERE, M. et al. E46K-like α -synuclein mutants increase lipid interactions and disrupt membrane selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 25, p. 9799–9812, 21 jun. 2019.

S, H. et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the

brain in rats. **Acta neuropathologica**, v. 128, n. 6, p. 805–820, 14 nov. 2014.

SÁNCHEZ-FERRO, Á. et al. *In vivo* gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 4, p. 517–524, 1 abr. 2015.

SANTANGELO, G. et al. Personality in Parkinson's disease: Clinical, behavioural and cognitive correlates. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 374, p. 17–25, 15 mar. 2017.

SAVICA, R. et al. Survival and causes of death among people with clinically diagnosed Synucleinopathies with parkinsonism: A population-based study. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 7, p. 839–846, 1 jul. 2017.

SCHERZER, C. R. et al. GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene α -synuclein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 10907–10912, 5 ago. 2008.

SHANNON, K. M. et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 27, n. 6, p. 709–715, maio 2012.

SHARON, R. et al. α -synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9110–9115, 31 jul. 2001.

SMITH C.B., BETZ W.J. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. **Nature**. 380(6574):531-534, 1996

SNIPPERT HJ, SCHEPERS AG, DELCONTE G, SIERSEMA PD, CLEVERS H. Slide preparation for single-cell-resolution imaging of fluorescent proteins in their three-dimensional near-native environment. **Nat Protoc**. 28;6(8):1221-8, 2011.

SNYDER, H. et al. Aggregated and monomeric α -synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 14, p. 11753–11759, 4 abr. 2003.

SPIELMAN, L. J.; GIBSON, D. L.; KLEGERIS, A. **Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases** *Neurochemistry International* Neurochem Int, , 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30114473/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

STEFANIS, L. et al. Expression of A53T mutant but not wild-type α -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9549–9560, 15 dez. 2001.

STEFANIS, L. α -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, 2012.

STEINER, J. A.; ANGOT, E.; BRUNDIN, P. **A deadly spread: Cellular mechanisms of α -synuclein transfer** *Cell Death and Differentiation* Nature Publishing Group, , set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2178422/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. **Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences** *Biophysical Reviews* Biophys Rev, , 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28510011/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

STILLING, R. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. **Genes, Brain and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 69–86, jan. 2014.

SVENSSON, E. et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 4, p. 522–529, 1 out. 2015.

UEMURA, N. et al. Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. **Molecular Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2018.

UVERSKY, V. N. et al. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 14, p. 11970–11978, 5 abr. 2002.

UVERSKY, V. N. Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism. **F1000Research**, v. 6, 2017.

VAN DEN BERGE N., et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. **Acta neuropathologica** 2019, 138(4):535-550.

VELASCO, S. et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. **Nature**, v. 570, n. 7762, p. 523–527, 27 jun. 2019.

VERSTREKEN P., OHYAMA T., BELLEN H.J. FM 1-43 labeling of synaptic vesicle pools at the Drosophila neuromuscular junction. **Methods in molecular biology**, 440:349-369, 2008

VISANJI, N. P. et al. **The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future** *Acta Neuropathologica Communications* Acta Neuropathol Commun, , 27 jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24252164/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

VOLPICELLI-DALEY, L. A. et al. Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. **Neuron**, v. 72, n. 1, p. 57–71, 6 out. 2011.

WEGMANN S, MAURY EA, KIRK MJ, SAQRAN L, ROE A, DEVOS SL, NICHOLLS S, FAN Z, TAKEDA S, CAGSAL-GETKIN O. Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. **The EMBO journal**, 34(24):3028-3041, 2015

WEINREB, P. H. et al. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. **Biochemistry**, v. 35, n. 43, p. 13709–13715, 1996.

WONG, Y. C.; KRAINIC, D. **α -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies** *Nature Medicine* Nat Med, , 7 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28170377/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

WOOD, J. D. **Enteric nervous system: Sensory physiology, diarrhea and constipation** *Current Opinion in Gastroenterology*, mar. 2010. Disponível em: <https://journals.lww.com/co-gastroenterology/Fulltext/2010/03000/Enteric_nervous_system__sensory_physiology,.5.aspx>. Acesso em: 28 jul. 2021

WU, L. G. et al. Exocytosis and endocytosis: Modes, functions, and coupling mechanisms*. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 301–331, fev. 2014.

XILOURI, M. et al. Abberant α -synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 13 maio 2009.

XU, L.; PU, J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. **Parkinson's Disease**, v. 2016, 2016.

YU, S. et al. Extensive nuclear localization of α -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 539–555, 16 mar. 2007.

ZHANG, B. et al. Stereotaxic targeting of alpha-synuclein pathology in mouse brain using preformed fibrils. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] NIH Public Access, 2019. v. 1948p. 45–57.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **Anais. Ann N Y Acad Sci**, 2008 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19076434/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

ZWETSLOOT, A. J.; TUT, G.; STRAUBE, A. **Measuring microtubule dynamics** *Essays in Biochemistry* Essays Biochem, , 7 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287587/>>. Acesso em: 28 jul. 2021

9. ANEXOS

9.1. Protocolo nº 69



Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

Certificamos que o projeto intitulado **“Conectando o intestino e o cérebro: Envolvimento do microbioma intestinal no surgimento e progressão da doença de parkinson esporádica”** (protocolo nº 69), sob responsabilidade de **Matheus de Castro Fonseca** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 26/08/2019.

Vigência do projeto	01/09/2019 a 01/09/2021
Espécie/linhagem	Camundongo FVB ou C57/BL6
Número de animais	53
Peso/idade	20 g / 7 semanas
Sexo	37 fêmeas e 16 machos
Origem	Biotério CEMIB - Unicamp

Campinas, 02 de setembro de 2019.

Hozana A. Castillo

Hozana Andrade Castillo
Coordenadora CEUA/CNPEM

Veruska Mazon Soares

Veruska Mazon Soares
Bióloga Titular

9.2. Declaração de biossegurança

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processador: 2020-05

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: **Mecanismos celulares e moleculares do Parkinson Idiopático**

2. Pesquisador responsável: **Matheus de Castro Fonseca**

3. Experimentador(es):

Matheus de Castro Fonseca, Celisa Caldana Tonoli, Dionísio Pedro Amorim Neto, Paulla Vieira Rodrigues, Katiane Tostes, Beatriz Pelegrini Bosque, João Victor Pereira Godoy

Nível do treinamento do experimentador: [KT]-Iniciação científica, [CCT, DPAN, BPB, JVPBG] -mestrado, [PVR]-doutorado, []-doutorado direto, [MCF]-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique

4. Unidade operativa: [] LNLS [] LNNano [] LNBR [x] LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: [x] Risco I [] Risco II [] Risco III [] Risco IV

6. O projeto é confidencial? [X] não [] sim

7. No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? [] não [X] sim

8. Qual é o objetivo do projeto? O objetivo do projeto consiste em estudar mecanismos de Parkinson idiopático em nível celular. Utilizaremos proteínas recombinantes e estudos envolvendo microscopia para verificar localização de marcadores e inferir sinalizações.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM.

(1) pEGFP ha-sinucleína, células de mamífero, *E.coli* DH5alpha, pEGFP ha-sinucleína, classe 1

(2) pet21b ha-sinucleína, *E.coli* DH5alpha, *E.coli* DH5alpha, pet21b ha-sinucleína, classe 1

(3)pEGFP-Parvalbumin-MTS, células de mamífero, *E.coli* DH5alpha, pEGFP-Parvalbumin-MTS, classe 1

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM:

(1) a-sinucleína: exocitose de vesículas sinápticas em células neuronais.

(2) Parvalbumin-MTS: tamponante de cálcio mitocondrial

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? [X] Não [] Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? [X] Não [] Sim: _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva

Não

15. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores? [X] Não [] Sim. Que tipo de avaliação? (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?

16. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores? [X] Não [] Sim. Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2020-05

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

Por não se tratar de organismos patogênicos, esporulantes e com contenção controlada, as medidas a serem tomadas em casos emergenciais são as medidas gerais de contenção (isolamento da área para evitar alastramento), auxílio na descontaminação de equipamentos e pessoal e acionamento de Pessoal de Emergências do CNPEM.

18. Projetos que façam uso de organismos ou genes associados ao patrimônio genético brasileiro precisam de cadastro na plataforma SISGEN (www.sisgen.gov.br). É de total responsabilidade do pesquisador responsável esse cadastramento e cumprimento da legislação. O projeto envolve manipulação, transferência, modificação, armazenamento, coleta de Organismos e derivados relativos ao patrimônio genético brasileiro? () SIM, (X) Não. No caso de responder sim, mencionar a seguir quais os códigos de acesso do cadastro no SISGEN, caso já tenha realizado _____.

O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

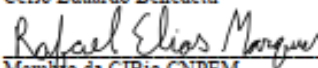
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 11/06/2020

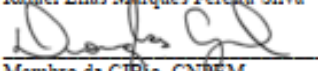
Parecer final: [x]-projeto aprovado. []-projeto recusado. []-projeto com deficiências.

comentários da CIBio:


Presidente da CIBio CNPEM
Marcio Chaim Bajgelman

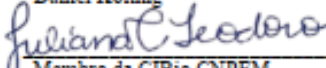

Membro da CIBio CNPEM
Celso Eduardo Benedetti

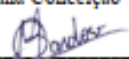

Membro da CIBio CNPEM
Rafael Elias Marques Pereira Silva


Membro da CIBio CNPEM
Douglas Galante


Membro da CIBio CNPEM
Juliana Velasco de Castro Oliveira


Membro da CIBio CNPEM
Daniel Kolling


Membro da CIBio CNPEM
Juliana Conceição Teodoro


Membro da CIBio CNPEM
Mateus Borba Cardoso

9.3. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de dezembro de 2021.

Assinatura : Paula Vieira Rodrigues
Nome do(a) autor(a): **Paula Vieira Rodrigues**
RG n.º 17031593

Assinatura : Matheus de Castro Fonseca
Nome do(a) orientador(a): **Matheus de Castro Fonseca**
RG n.º 14427049

9.4. Produção científica

• Artigos Publicados

Rodrigues, P. V.; Toste, K.; Bosque, B. P.; Amorim Neto, D. P.; Fonseca, M. C. Illuminating the Brain With X-Rays: Contributions and Future Perspectives of High-Resolution Microtomography to Neuroscience. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, p. 00, 2021.

Rodrigues, Paulla Vieira; Lemos, Bruna Moreira Silva; Da Silva, Maria Vitoria; De Campos Lima, Taís ; De Oliveira Santos, Débora ; Lemes, Júlia Borges Paes ; Da Cruz Lotufo, Celina Monteiro . Alloxan as a better option than streptozotocin for studies involving painful diabetic neuropathy. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 112, p. 107090, 2021.

Fonseca, Matheus De Castro ; De Oliveira, Juliana Ferreira ; Araújo, Bruno Henrique ; Canateli, Camila ; Do Prado, Paula Favoretti Vital ; Amorim Neto, Dionísio Pedro ; Bosque, Beatriz Pelegrini ; Rodrigues, Paulla Vieira ; De Godoy, João Vitor Pereira ; Ribeiro Filho, Helder Veras ; Nascimento, Andrey Fabricio Ziem ; Saito, Angela ; Tonoli, Celisa Caldana Costa ; Batista, Fernanda Aparecida Heleno ; De Oliveira, Paulo Sergio Lopes ; Figueira, Ana Carolina ; Da Costa, Silvia Souza ; Krepisch, Ana Cristina Victorino ; Rosenberg, Carla ; Westfahl Jr, Harry ; Roque Da Silva, Antonio Jose ; Franchini, Kleber Gomes. Molecular and Cellular Basis of Hyper-Assembly, Protein Aggregation and Impaired Neurodevelopment Driven by a Rare Pathogenic Mutation in DDX3X. *iScience*, p. 102841, 2021.

• Artigos submetidos para publicação

Rodrigues, P.V., Godoy, J.V.P., Amorim Neto, D. P., Bosque, B.P., Tostes, K.; Tonoli, C.C.C., Fonseca, M.C. Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent. *npj Parkinson's Disease*. 2021 (submetido)

Amorim Neto, D. P., Bosque, B.P., Godoy, J.V.P., Rodrigues, P.V., Meneses, D. D.; Tostes, K.; Tonoli, C.C.C., González-Billault, C., Fonseca, M.C. Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium *Akkermansia muciniphila* secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells. *iScience*. 2021 (submetido)

• Capítulo de livro

Chang, Roberto; Rocha, Rodrigo Ribeiro; De Oliveira, Alberto; Do Nascimento, Evandro Afonso; De Moraes, Sérgio Antônio Lemos; De Aquino, Francisco José Torres; Martins, Mário Machado; Da Silva, Cláudio Vieira; Rodrigues, Paulla Vieira. Composition of the essential oil

of leaves *Qualea grandiflora* and *Qualea multiflora* Mart. and antileishmanial activities. *Pesquisas Agrárias e Ambientais: Volume III. 3ed.: Pantanal Editora, 2021, v., p. 18-27.*

- **Prêmios**

Menção honrosa pela apresentação no I WORKSHOP DE BIOLOGIA CELULAR, Universidade Federal de Uberlândia.

- **Estágio docente**

Participou do Programa de Estágio Docente Pós-Graduação (PED), no Grupo C - Atividades de Apoio à Docência Parcial, no 1º período de 2021, sob supervisão da Profª Dra. Luciana Bolsoni do IB - Instituto de Biologia, curso: Ciências Biológicas, na disciplina: Biologia celular.

- **Participação de eventos**

1. 18ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia
2. I Semana da Biologia dos Institutos Federais. 2021.
3. I Congresso Nacional Multidisciplinar de COVID-19. 2021.
4. IV Encontro de Morfofisiologia. 2021.
5. 8º WORKSHOP TEÓRICO-PRÁTICO Explorando a Microscopia Confocal e a Óptica não Linear na Análise de Materiais Biológicos. 2020.

- **Organização de eventos**

II Curso de verão em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP. 2021.

- **Curso de curta duração ministrados**

RODRIGUES, P. V.; AMORIM NETO, DIONÍSIO PEDRO. Noções básicas de cultura de células. I Semana de Biologia dos Institutos Federais. 2021.

- **Apresentação de trabalho**

RODRIGUES, P. V.; BOSQUE, B. P. ; AMORIM NETO, DIONÍSIO PEDRO ; DE GODOY, JOÃO VITOR PEREIRA ; TOSTE, K. ; FONSECA, M. C. . Mecanismo de Transferência Celular de Fibrilas Pré-Formadas de Alfa- Sinucleína de Células Intestinais para Neurônios. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Rodrigues, P. V.; Godoy, J. V. P. ; Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Cellular Transfer Of AlphaSynuclein Pre-Formed Fibrils From Gut To Neurons Depends On Cell-Cell Contact. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; Godoy, J. V. P. ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Akkermansia Muciniphila Secretome Promotes Mitochondrial Stress And ASynuclein Aggregation In Enteroendocrine Cells: Hallmarks Of Parkinsons Disease Outside The Brain. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Bosque, B. P. ; Amorim Neto, D. P. ; Godoy, J. V. P. ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K.; Fonseca, M. C. . Selective toxicity of 6-hydroxydopamine towards dopaminergic cells is independent of LRRK2 activation. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

- **Resumos publicados em anais de congressos**

Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; Godoy, J. V. P. ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Akkermansia Muciniphila Secretome Promotes Mitochondrial Stress And ASynuclein Aggregation In Enteroendocrine Cells: Hallmarks Of Parkinsons Disease Outside The Brain. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Bosque, B. P. ; Amorim Neto, D. P. ; Godoy, J. V. P. ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K.; Fonseca, M. C. . Selective toxicity of 6-hydroxydopamine towards dopaminergic cells is independent of LRRK2 activation. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Rodrigues, P. V.; Godoy, J. V. P. ; Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Cellular Transfer Of AlphaSynuclein Pre-Formed Fibrils From Gut To Neurons Depends On Cell-Cell Contact. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

- **Participação em bancas avaliadoras**

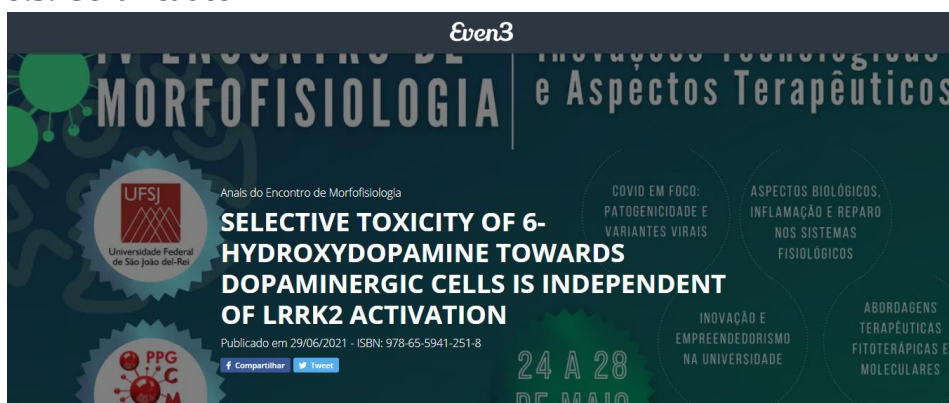
XXVIII Congresso de Iniciação científica da Unicamp. 2020. Universidade Estadual de Campinas.

XXV Ciência viva. 2020. Universidade Federal de Uberlândia.

- **Outros cursos**

1. Ambientação para a educação a distancia
2. Introdução a divulgação científica
3. Mendeley do básico ao avançado
4. Metodologia da pesquisa científica
5. Formação para docentes no Moodle
6. Estudando as estratégias para o ensino superior
7. ImageJ
8. Google for education

9.3. Certificados



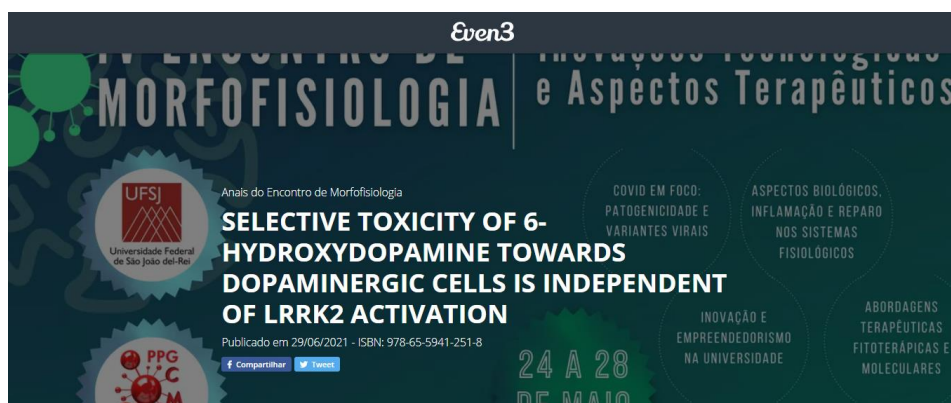
Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351148-SELECTIVE-TOXICITY-OF-6-HYDROXYDOPAMINE-TOWARDS-DOPAMINERGIC-CELLS-IS-INDEPENDENT-OF-LRRK2-ACTIVATION



Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351144-AKKERMANSIA-MUCINIPHILA-SECRETOME-PROMOTES-MITOCHONDRIAL-STRESS-AND-A-SYNUCLEIN-AGGREGATION-IN-ENTEROENDOCRINE-CE



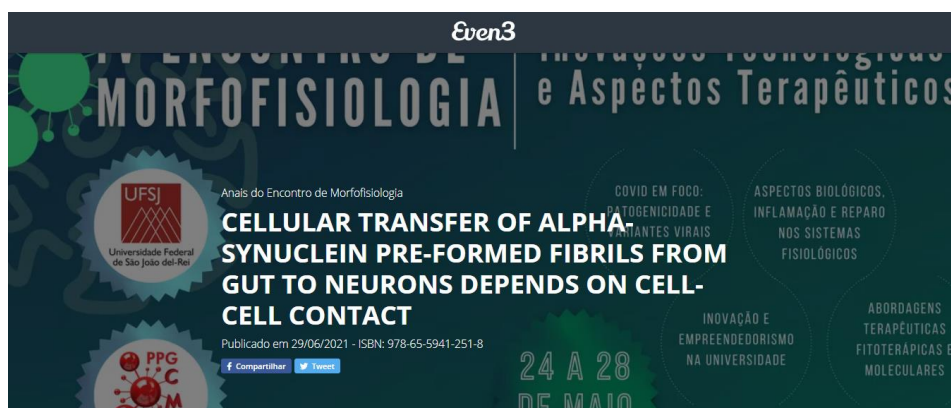
Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351158-CELLULAR-TRANSFER-OF-ALPHA-SYNUCLEIN-PRE-FORMED-FIBRILS-FROM-GUT-TO-NEURONS-DEPENDS-ON-CELL-CELL-CONTACT



Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351148-SELECTIVE-TOXICITY-OF-6-HYDROXYDOPAMINE-TOWARDS-DOPAMINERGIC-CELLS-IS-INDEPENDENT-OF-LRRK2-ACTIVATION



Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351144-AKKERMANSIA-MUCINIPHILA-SECRETOME-PROMOTES-MITOCHONDRIAL-STRESS-AND-A-SYNUCLEIN-AGGREGATION-IN-ENTEROENDOCRINE-CE



Página do Trabalho: www.even3.com.br/Anais/encontromorfofisiologia_ufsj/351158-CELLULAR-TRANSFER-OF-ALPHA-SYNUCLEIN-PRE-FORMED-FIBRILS-FROM-GUT-TO-NEURONS-DEPENDS-ON-CELL-CELL-CONTACT



MENÇÃO HONROSA

Certificamos que o trabalho intitulado "Mecanismo de Transferência Celular de Fibrilas Pré-Formadas de Alfa-Sinucleína de Células Intestinais para Neurônios" de autoria Paula Vieira Rodrigues, João Vitor Pereira de Godoy, Dionísio Pedro Amorim Neto, Beatriz Pelegrini Bosque, Katiane Tostes, Matheus de Castro Fonseca, recebeu menção honrosa pela apresentação no I WORKSHOP DE BIOLOGIA CELULAR, realizado entre os dias 16 a 18 de agosto de 2021 pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 24 de setembro de 2021.

Prof. Dr. Daniele Lisboa Ribeiro

Coordenadora Geral

Patrocinadores: grupo a⁺ bioenergetics

Realização:



CERTIFICADO

Certificamos que Paula Vieira Rodrigues participou da Comissão Organizadora do II Curso de Verão em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas, realizado virtualmente entre os dias 31 de janeiro e 12 de fevereiro de 2021.

Prof. Dra. Elaine Minatel

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural

Prof. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

Representante docente da Comissão Organizadora

Realização:





Certificado

Certificamos que

Paula Vieira Rodrigues

atuou como Avaliador(a) do(a) Comissão Avaliadora do(a) XXV Ciência Viva, promovido(a) pelo(a) Instituto de Física (INFIS) da Universidade Federal de Uberlândia, vinculado ao programa "Diversão com Ciência e Arte - Museu Dica UFU", realizado(a) no período de 01/02/2020 a 31/12/2020, sob a coordenação de Adevalton Bernardo dos Santos, com carga horária de 8 horas.



Prof. Dr. Hélder Elemo da Silveira
 Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Uberlândia (MG), 11 de Fevereiro de 2021.

Autenticação Eletrônica de Certificados de Extensão: 22ab.83ac.f146.2513.d071.92fd.9477.3dca - em 19/02/2021.
 Para verificar a autenticidade desse certificado, acesse: www.slex.proex.ufu.br/certificado/validar



Universidade Estadual de Campinas
 Diretoria Acadêmica



Certificado

Nome		Registro Acadêmico	
Paula Vieira Rodrigues		263078	
Documento de Identidade	CPF	Nascimento	Sexo
17031593 - PC	10525054650	04/08/1994	Feminino
Naturalidade	Nacionalidade		
Uberlândia	Brasileira		

Dados Ingresso	Nível	
Curso 10 - Biologia Celular e Estrutural	Doutorado	
Área de Concentração		
AA - Biologia Celular		
Reconhecido pela Portaria MEC nº 609 de 18/03/2019		
Forma de Ingresso	Período de Ingresso	
Exame Seleção da Pós Graduação	2S/2019	
Escola Anterior	Mês/Ano da Conclusão	
Universidade Federal de Uberlândia - UFU	10/2018	
Situação no Curso	Ano de Catálogo	Ano da Turma
Curso em andamento	2019	2019

Certificado

A Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Resolução GR nº 48/2018 de 19-12-2018, certifica que a interessada participou do Programa de Estágio Docente - Pós-Graduação-PED, no Grupo C - Atividades de Apoio a Docência Parcial, no 1º período de 2021, com carga horária de 08 horas semanais, sob supervisão da Profª Luciana Bolsoni Lourenço Morandini, do IB - Instituto de Biologia, desta Universidade, na(s) disciplina(s) e turma(s) especificada(s) abaixo.

Disciplinas		
Código	Turma	Nome
BC183	A	Biologia Celular I

Verifique o código de autenticidade 5057258.5671235.7.3.209100546035905 em <https://www.event3.com.br/documentos>



18ª SEMANA
NACIONAL DE
CIÊNCIA E
TECNOLOGIA

A TRANSVERSALIDADE DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES PARA O PLANETA

A TRANSVERSALIDADE DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES PARA O PLANETA

Certificamos que **Paula Vieira Rodrigues**, participou com êxito do evento 18ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT 2021) realizado em 06/10/2021 a 08/10/2021, na cidade de , contabilizando carga horária total de 40 horas.

, informe a data aqui.

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES



Verifique o código de autenticidade 6870285.5671235.7.3.34503824905846 em <https://www.event3.com.br/documentos>

CONGRESSO NACIONAL MULTIDISCIPLINAR DE

COVID-19

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

A FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DAS ASSOCIAÇÕES DOS ESTUDANTES DE MEDICINA DO BRASIL - IFMSA BRAZIL UNICEPLAC - NO USO DE SUAS ATRIBUIÇÕES CERTIFICA QUE

PORTADOR (A) DO CPF: **Paula Vieira Rodrigues** PARTICIPOU COMO "OUVINTE" DO I
CONGRESSO NACIONAL MULTIDISCIPLINAR DE COVID-19, REALIZADO ON-LINE
DURANTE OS DIAS 6, 7 E 8 DE MAIO COM UMA **CARGA HORÁRIA DE 30 HORAS.**

SARAH PINHEIRO TAUFFER

PRESIDENTE DA IFMSA BRAZIL
UNICEPLAC

ANA LUIZA ALVES G. FONSECA

PRESIDENTE DA AEMED-DF

JULIA DOURADO S. DOS SANTOS

PRESIDENTE DO
ICNMCovid19







CERTIFICADO DE CONCLUSÃO

Certificamos que

Paula Vieira Rodrigues, CPF: 10525054650,

concluiu o **Curso de Ambientação para Educação a Distância: Conhecendo o Moodle**,
oferecido pela Diretoria de Educação a Distância da Pró-Reitoria de Ensino do IFG,
com carga-horária de **20 horas e aproveitamento de 78,00 %**.

Goiânia, 13 de abril de 2021

Helen Betane S. Pereira
Helen Betane Ferreira Pereira
Diretora de Educação a Distância
Portaria nº 2.725, de 20 de novembro de 2018

Oneida Cristina Barcelos Gomes Irigon
Oneida Cristina Barcelos Gomes Irigon
Pró-Reitora de Ensino
Portaria nº. 1.758, de 12 de setembro de 2017

Código de autenticidade: 607c893b-919c-4d69-940a-044fc81138d2
Validação: <https://virtual.ifg.edu.br/mod/impliecertificate/verify.php>



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

CERTIFICADO DE CONCLUSÃO

A Fundação Oswaldo Cruz, por meio da Unidade Vice-presidência de Educação, Informação e Comunicação,
certifica que o(a) aluno(a)

Paula Vieira Rodrigues

documento: 10525054650, concluiu o curso livre **Introdução à Divulgação Científica (MOOC)** (1ª Oferta) com
duração de 30 horas, obtendo desempenho de 100% no período de 05 a 08 de Abril de 2020.

Rio de Janeiro, 08/04/2020



MINISTÉRIO DA
SAÚDE





**Estudando estratégias e recursos para
o ensino superior**



CERTIFICADO

O Espaço de Apoio ao Ensino e Aprendizagem (EA)² certifica que

Paula Vieira Rodrigues

participou do Curso para PEDs – Estudando Estratégias e Recursos para o Ensino Superior – 2ª Ed. – 1o Sem 2021 com o professor Gildo Giroto Júnior do Instituto de Química (IQ), nos dias 15, 22 e 29 de Abril de 2021, das 14h às 17h - com carga horária total de 9 horas.

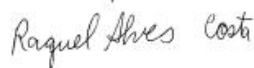

Profa. Dra. Soely Polydoro
Coordenadora
Espaço de Apoio ao Ensino e Aprendizagem
UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que **Paula Vieira Rodrigues** participou do minicurso on line intitulado: “Análise de imagens no Image J”, no “IV Encontro de Morfofisiologia: Inovações tecnológicas e aspectos terapêuticos”, realizado em 24 de maio de 2021, com carga horária total de 4 horas.

São João del Rei, 28 de maio de 2021.



Raquel Alves Costa
Presidente da Comissão Organizadora

Realização:



CERTIFICADO DE CONCLUSÃO

Certificamos que

Paulla Vieira Rodrigues, CPF: 10525054650,
concluiu o **Curso de Formação para Docência no Moodle**,
oferecido pela Diretoria de Educação a Distância da Pró-Reitoria de Ensino do IFG,
com carga-horária de **40 horas e aproveitamento de 81,90 %**.

Goiânia, 18 de abril de 2021


Helen Betane Ferreira Pereira
Diretora de Educação a Distância
Portaria nº 2.725, de 20 de novembro de 2018


Oneida Cristina Barcelos Gomes Irigon
Pró-Reitora de Ensino
Portaria nº. 1.758, de 12 de setembro de 2017

Código de autenticidade: 607c99e7-d338-4568-9953-04a3c81138d2
Validação: <https://virtual.ifg.edu.br/mod/simplecertificate/verify.php>



Acadêmica Club
O seu orientador

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

CERTIFICAMOS QUE O(A) ALUNO(A)

Paulla Vieira Rodrigues

participou do curso gratuito
Mendeley: Do básico ao avançado

ministrado por Felipe Lando

com duração de 01:19 em 13/04/2021


Acadêmica Assessoria em Pesquisa

Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais
Escola de Formação e Desenvolvimento Profissional de Educadores

CERTIFICADO

Certificamos para os devidos fins, que o(a) servidor(a),

PAULLA VIEIRA RODRIGUES

CPF: 10525054650

Concluiu o curso **Google for Education: recursos e possibilidades**, promovido pela Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais, com carga horária de 60 horas, e comprovou o conhecimento e as competências básicas necessárias para utilização das ferramentas da plataforma **Google for Education**.

Belo Horizonte, 13 de maio de 2021

Weynner Lopes Rodrigues

Diretor da Escola de Formação e
Desenvolvimento Profissional de Educadores

Geniana Guimarães Faria

Subsecretária de Desenvolvimento da Educação
Básica - SEEMG



Núcleos de Tecnologia Educacional
de Minas Gerais

EDUCAÇÃO



**MINAS
GERAIS**

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Caso seja necessário validar o certificado, clique no link: https://sed.educacao.mg.gov.br/modulos/tccet/verify_certificate.php - Código de validação: JX0eTchTP



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpharmtox

Alloxan as a better option than streptozotocin for studies involving painful diabetic neuropathy

Paula Vieira Rodrigues, Bruna Moreira Silva Lemos, Maria Vitoria da Silva, Taís de Campos Lima, Débora de Oliveira Santos, Júlia Borges Paes Lemes, Celina Monteiro da Cruz Lotufo^{*}

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Uberlândia Zip Code 38405-320, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Alloxan
Animal model
Diabetes
Method
Pain
Painful diabetic neuropathy
Streptozotocin

ABSTRACT

Previous data indicate that the diabetogenic substance streptozotocin might act in nociceptive neurons changing the sensory signal, regardless of hyperglycemia. In the present article the effects of streptozotocin were compared with another diabetogenic drug, alloxan, for diabetes induction in rats. A possible direct effect of these drugs was tested by means of *in vivo* experiments and *in vitro* assays using cultured primary nociceptive neurons. Streptozotocin (17.5 and 35 mg/kg), alloxan (15 and 30 mg/kg) or vehicle were injected in adult male rats and the animal groups were separated according to glycemic levels. Body mass, glycemia and paw mechanical sensitivity were evaluated for 5 weeks. Streptozotocin caused an increase in mechanical sensitivity in both hyperglycemic and normoglycemic rats, while alloxan induced mechanical sensitization only in hyperglycemic animals. Injection of both substances induced local inflammation at rat paws; however, only streptozotocin caused significant mechanical sensitization when injected near to sensory neurons at the dorsal root ganglia. Also, streptozotocin treatment induced a reduction in intracellular calcium levels and inhibited capsaicin induced calcium transients and membrane depolarization. Alloxan did not affect calcium levels or membrane potential in primary nociceptive neurons. These findings suggest that alloxan might be a better option for animal studies regarding painful diabetic neuropathy as streptozotocin directly affects nociceptive neurons, probably by

frontiers
in Neuroscience

REVIEW

published: 17 March 2021
doi: 10.3389/jpharmtox.2021.627994



Illuminating the Brain With X-Rays: Contributions and Future Perspectives of High-Resolution Microtomography to Neuroscience

Paula Vieira Rodrigues^{1,2}, Katiane Tostes¹, Beatriz Pelegrini Bosque^{1,2}, João Vitor Pereira de Godoy^{1,2}, Dionisio Pedro Amorim Neto^{1,2}, Carlos Sato Baraldi Dias³ and Matheus de Castro Fonseca^{1*}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil, ² Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas, Campinas, Brazil,

³ Brazilian Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

The assessment of three-dimensional (3D) brain cytoarchitecture at a cellular resolution remains a great challenge in the field of neuroscience and constant development of imaging techniques has become crucial, particularly when it comes to offering direct

Article

Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X

Matheus de Castro Fonseca,^{1,6,7,*} Juliana Ferreira de Oliveira,^{1,6} Bruno Henrique Silva Araujo,¹ Camila Canateli,¹ Paula Favoretti Vital do Prado,¹ Dionísio Pedro Amorim Neto,^{1,2} Beatriz Pelegrini Bosque,^{1,2} Paulla Vieira Rodrigues,^{1,2} João Vitor Pereira de Godoy,^{1,2} Katiane Tostes,¹ Helder Veras Ribeiro Filho,¹ Andrey Fabricio Ziem Nascimento,³ Angela Saito,¹ Celisa Caldana Costa Tonoli,¹ Fernanda Aparecida Heleno Batista,¹ Paulo Sergio Lopes de Oliveira,¹ Ana Carolina Figueira,¹ Silvia Souza da Costa,⁴ Ana Cristina Victorino Krepschi,⁴ Carla Rosenberg,⁴ Harry Westfahl, Jr.,³ Antônio José Roque da Silva,³ and Kleber Gomes Franchini^{1,5,*}

Pesquisas Agrárias e Ambientais - volume III

Capítulo II: Composition of the essential oil of leaves *Qualea grandiflora* and *Qualea multiflora* Mart. and antileishmanial activities

Capítulo II

Composition of the essential oil of leaves *Qualea grandiflora* and *Qualea multiflora* Mart. and antileishmanial activities

Recebido em: 13/12/2020

Aceito em: 19/12/2020

 10.46420/9786588319482cap2Roberto Chang^{1*} Rodrigo Ribeiro Rocha^{1,2} Alberto de Oliveira¹ Evandro Afonso do Nascimento¹ Sérgio Antônio Lemos de Moraes¹ Francisco José Torres de Aquino¹ Mário Machado Martins¹ Cláudio Vieira da Silva³ Paulla Vieira Rodrigues³ 

manuscripttrackingssystem		npj parkinson's disease
tracking system home	author instructions	reviewer instructions
help	logout	journal home
Manuscript #	NPJPARKD-00970	
Current Revision #	1	
Other Version	NPJPARKD-00970P1	
Submission Date	30th Sep 21 07:14:16	
Current Stage	Manuscript Under Consideration	
Title	Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent	
Running Head	Spreading of α -synuclein fibrils from EECs to neuronal cells	
Manuscript Type	Article	
Collections	N/A	
Word Count	Introduction, Methods, Results and Discussion - 6,773 words Total words of the Manuscript Word File - 10,260	
Corresponding Author	Dr Matheus Fonseca (matheus.fonseca@inbio.cnpem.br) (CNPem)	
Contributing Authors	Ms Paula Rodrigues, Mr Joao Vitor de Godoy, Ms Beatriz Bosque, Mr Dionísio Pedro Neto, Ms Katiane Tostes, Dr Soledad Palameta, Dr Sheila Garcia-Rosa, Ms Celisa Tonoli	
Authorship	Yes	
Abstract	Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition featured by motor dysfunction, death of midbrain dopaminergic neurons and accumulation of α-synuclein (αSyn) aggregates. Growing evidence suggests that PD diagnosis happens late in the disease progression and that the pathology may originate much earlier in the enteric nervous system (ENS) before advancing to the brain, via autonomic fibers. It was recently described that a specific cell type from the gut epithelium named enteroendocrine cells (EECs) possess many neuron-like properties including αSyn expression. By facing the gut lumen and being directly connected with αSyn-containing enteric neurons in a synaptic manner, EECs form a neural circuit between the gastrointestinal (GI) tract and the ENS, thereby being a possible key player in the outcome of PD in the gut. We have characterized the progression and the cellular mechanisms involved in αSyn pre-formed fibrils (PFFs) transfer from EECs to neuronal cells. We show that αSyn PFFs administered into the duodenal lumen of mice are promptly absorbed by the organ. In addition, in the enteroendocrine cell line STC-1 and in the neuronal cell line SH-SY5Y, αSyn PFFs induced intracellular calcium (Ca^{2+}) oscillations on an extracellular Ca^{2+} source-dependent manner and triggered αSyn fibrils internalization by endocytosis. We characterized the spread of αSyn PFFs from enteroendocrine to neuronal cells and showed that this process is dependent on physical cell-to-cell contact and on Rab35 GTPase. Lastly, inhibition of Rab35 increases the clearance of αSyn fibrils by redirecting them to the lysosomal compartment. Therefore, our results reveal mechanisms that contribute to the understanding of how seeded αSyn fibrils promote the progression of αSyn pathology from EECs to neuronal cells shifting the focus of PD etiology to the ENS.	
Subject Terms	Biological sciences/Cell biology Biological sciences/Neuroscience/Cellular neuroscience	
Research Square author dashboard	I understand that my manuscript and associated personal data will be shared with Research Square for the delivery of the author dashboard.	
Competing interests policy	There is no conflict of interest	
Clinical Trial	No	
Applicable Funding Source	CAPES, CNPq, FAPESP (2018/20014-0, 2019/24511-0). (Fonseca)	

Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(196KB\)](#)
2. Merged File containing manuscript text and 7 Figure files. [PDF \(21962KB\)](#)

iScience

Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium *Akkermansia muciniphila* secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ISCIENCE-D-21-02957
Full Title:	Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium <i>Akkermansia muciniphila</i> secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells
Article Type:	Research Article
Corresponding Author:	Matheus de Castro Fonseca, Ph.D. Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio); Brazilian Center for Research in Energy and Materials Campinas, São Paulo BRAZIL
First Author:	Dionisio Pedro Amorim Neto
Order of Authors:	Dionisio Pedro Amorim Neto Beatriz Pelegrini Bosque João Vitor Pereira de Godoy Paula Vieira Rodrigues Dario Donoso Meneses Katiane Tostes Celisa Caldana Costa Tonoli Christian González-Billault Matheus de Castro Fonseca, Ph.D.
Abstract:	The notion that the gut microbiota plays a role in neurodevelopment, behavior and outcome of neurodegenerative disorders is recently taking place. A number of studies have consistently reported a greater abundance of <i>Akkermansia muciniphila</i> in Parkinson's disease (PD) fecal samples. Nevertheless, a functional link between <i>A. muciniphila</i> and sporadic PD remained unexplored. Here, we investigated whether <i>A. muciniphila</i> conditioned medium could initiate the misfolding process of α -synuclein (α Syn) in enteroendocrine cells (EECs), which are part of the gut epithelium and possess many neuron-like properties. We found that <i>A. muciniphila</i> conditioned medium is directly modulated by mucin, induces intracellular calcium (Ca^{2+}) release, and causes increased mitochondrial Ca^{2+} uptake in EECs, which in turn leads to production of reactive oxygen species (ROS) and α Syn aggregation. Indeed, oral administration of <i>A. muciniphila</i> cultivated in the absence of mucin to aged mice also led to α Syn aggregation in cholecystokinin (CCK)-positive enteroendocrine cells. Noteworthy, buffering mitochondrial Ca^{2+} reverted all the damaging effects observed. Thereby, these molecular insights provided here offer evidence that bacterial proteins are capable of inducing α Syn aggregation in enteroendocrine cells.
Additional Information:	
Question	Response
Standardized datasets A list of datatypes considered standardized under Cell Press policy is available here . Does this manuscript report new standardized datasets?	No
Original code	No