



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE**



ANDERSON LEITE BASTOS

**AVALIAÇÃO DO COMPOSTO RPJ-12 COMO MODULADOR DA AGREGAÇÃO
DA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA**

DUQUE DE CAXIAS

2023

ANDERSON LEITE BASTOS

**AVALIAÇÃO DO COMPOSTO RPJ-12 COMO MODULADOR DA AGREGAÇÃO
DA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio de Janeiro –
Campus Duque de Caxias – Professor Geraldo
Cidade, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Biofísica

Orientadora: Prof.^a Carolina Alvares da Cunha de
Azeredo Braga

Co-orientador : Marcos Eduardo Braga Pacheco

DUQUE DE CAXIAS

2023

CIP - Catalogação na Publicação

L327a Leite, Anderson
 AVALIAÇÃO DO COMPOSTO RPJ-12 COMO MODULADOR DA
AGREGAÇÃO DA PROTEÍNA ALFA-SINUCLLEÍNA / Anderson
Leite. -- Rio de Janeiro, 2023.
 43 f.

 Orientadora: Carolina Braga.
 Coorientador: Marcos Pacheco.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel
em Ciências Biológicas: Biofísica, 2023.

 1. Doença de Parkinson. 2. Amiloidoses. 3. Alfa
sinucleína. 4. RPJ-12. I. Braga, Carolina, orient.
II. Pacheco, Marcos , coorient. III. Título.

ANDERSON LEITE BASTOS

**AVALIAÇÃO DO COMPOSTO RPJ-12 COMO MODULADOR DA AGREGAÇÃO
DA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Rio de Janeiro –
Campus Duque de Caxias – Professor Geraldo
Cidade, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Biofísica

Orientadora: Prof.^a Carolina Alvares da Cunha de
Azeredo Braga

Co-orientador : Marcos Eduardo Braga Pacheco

Aprovado em: 13 / 07 / 2023, por:

Profa. Dr.^a Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga / Universidade Federal do Rio de
Janeiro (Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

Profa. Dr.^a Ana Paula Santos Da Silva de Oliveira / Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

Prof.^a Dr.^a Marisa Carvalho Suarez / Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a toda minha família, pelo apoio em todas as minhas escolhas, paciência com todos os meus surtos, por acreditarem sempre em mim e pelo amor incondicional e recíproco que sempre tivemos e teremos uns pelos outros. As amigadas que a UFRJ me presenteou: Layla, Denilson, Samara e Isabella, que caminharam sempre ao meu lado e me apoiaram e me confortaram nos dias turbulentos, assim como as risadas e todo amor compartilhado, que essa amizade perdure para além dos muros do campus. Aos amigos que fiz também durante a graduação que me proporcionaram momentos incríveis e descontraídos: Bia Bocatto, Werner e Daniel, que sempre me levavam para os rolês mais aleatórios, e sempre estavam dispostos a tomar uma cervejinha no final do dia pra descontrair. A minha orientadora Carolina Braga que me guiou nessa jornada científica, sempre me incentivando a dar o meu melhor, me ensinando e “puxando minha orelha” quando necessário. Ao meu co-orientador Marcos Braga, que além de meu veterano, me apresentou o grupo e os projetos ao qual tenho a honra de participar, e se tornou um grande amigo. A todo o meu grupo de pesquisa: Gabriella Ferraz, Fátima, Lucas, Mayara e Bruna, que sempre me ajudaram em tudo que precisei. Aos amigos que fiz no laboratório que sempre me ajudaram nos meus experimentos e me ensinaram técnicas novas: Ingrid, Desirée, Isabella, Anne, Jéssica, Beatriz e Matheus. A toda equipe técnica do NUMPEX-BIO, pela assistência, auxílio e suporte, sem o qual meus experimentos não seriam possíveis. A professora Ana Paula, que além de eu ter a honra de estar presente na minha banca, sempre teve bons conselhos e foi uma boa ouvinte em assuntos pessoais e acadêmicos. A professora Marisa Carvalho, que também tenho a honra de compor a minha banca, sempre me ajudou em tudo desde o momento em que pisei no Campus, a “nossa mamãe” como eu e meus amigos a chamávamos carinhosamente entre a gente. Ao professor Leonardo Palmieri, por ter aceitado ser meu revisor, e que me mostrou durante suas aulas como a área da biologia estrutural é incrível, ao qual eu tinha pouco conhecimento. A professora Beatriz Siffert, que além de me fazer gostar de física, me deu a honra de participar de um projeto de extensão tão incrível quanto ela (Concórdia online). A professora Janaina Fernandes que, conseguia transmitir o seu amor pela Biologia molecular através das suas aulas, e sempre me atraía indiretamente para seus experimentos na bancada. A toda a banca examinadora, que participou da minha trajetória e hoje eu tenho a honra de ser avaliado por ela. E a PIBIC-UFRJ, pela bolsa de iniciação científica que tornou grande parte dessa trajetória possível.

“A maioria das pessoas está tão absorta na contemplação do mundo exterior que está totalmente alheia ao que está acontecendo em si.”

NIKOLA TESLA

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum nos Estados Unidos, afetando pessoas acima dos 60 anos de idade. Tem como principais características patológicas a morte dos neurônios dopaminérgicos na substância nigra, assim como, a presença de inclusões proteicas denominadas corpos de Lewy, tendo como sua principal constituinte a proteína alfa sinucleína (aS). A busca por novas terapias é de vital relevância, tendo em vista que as atuais alternativas terapêuticas visam à redução dos sintomas associados à DP, não interferindo de maneira significativa em sua progressão. Estudos recentes *in vitro* têm elucidado os mecanismos de agregação da proteína aS e nos permitem avaliar moléculas que sejam eficazes na modulação da agregação, agindo como inibidores ou neuroprotetores da toxicidade destas espécies, assim, impedindo a morte dos neurônios dopaminérgicos. Alguns compostos orgânicos estão sendo identificados com atividade anti-prion, por apresentarem baixa toxicidade e elevada eficácia, tendo em vista que já foi demonstrado que a DP apresenta mecanismo prion-*like* (JAN, A. et al., 2021), ou seja, que a proteína aS agregada pode ser transmitida de célula a célula, ampliando o processo degenerativo. O presente estudo tem como objetivo avaliar o composto RPJ-12, generosamente cedido pelo grupo coordenado pela Prof^a Dr^a Yraima Cordeiro (UFRJ), e desenvolvido baseado em substâncias identificadas como eficazes na inibição da agregação da proteína prion, que está envolvida nas encefalopatias espongiformes transmissíveis, assim como a estrutura quinolina, presente no composto que já foi descrito na literatura suas atividades antibacteriana, antifúngica, anticonvulsivante, anti-inflamatória (Akranth Marella et al., 2013), neuroprotetora e antioxidante (FERNÁNDEZ-BACHILLER et al., 2010). Para isso, foi realizada a expressão e a purificação da proteína aS selvagem (WT). A proteína aS liofilizada foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) até concentração final no experimento de 70 μ M e incubada em condições de agregação (37°C, agitação constante e pH 7,4) (Braga et al., 2011) onde acompanhamos a formação de agregados através da ligação a tioflavina T (corante específico para identificar e quantificar agregados amilóides) e da sonda ANS (corante amplamente utilizado para estudar os processos de enovelamento de proteínas, ao se ligar às superfícies hidrofóbicas expostas das proteínas) e microscopia eletrônica de varredura no modo STEM. Os resultados demonstraram através da cinética de agregação da aS WT, avaliada pela sonda Tioflavina-T, que o composto RPJ-12 inibiu em aproximadamente 80% a formação final de espécies amilóides. Na cinética de agregação da aS WT, avaliada pela sonda ANS, a proteína na presença e na ausência do composto RPJ-12 não apresentou diferenças significativas. No MEV, foi possível observar, através da morfologia dos agregados, que a proteína na ausência do composto apresentou estruturas mais evidentes após 24 horas de agregação, e na presença do composto houve um aumento na velocidade de agregação, sendo possível observar estruturas mais amorfas e desorganizadas. Com base nos resultados obtidos, podemos sugerir um papel modulador da agregação da proteína alfa-sinucleína pelo composto RPJ-12, porém elucidar os mecanismos desta modulação se faz necessário.

ABSTRACT

Parkinson's disease (DP) is the second most common neurodegenerative disorder in the United States, affecting people over 60 years of age. Its main pathological characteristics are the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra, as well as the presence of protein inclusions called Lewy bodies, having alpha synuclein (aS) as its main constituent. The search for new therapies is of vital importance, considering that the current therapeutic alternatives aim at reducing the symptoms associated with DP, without significantly interfering in its progression. Recent *in vitro* studies have elucidated the mechanisms of aS protein aggregation and allow us to evaluate molecules that are effective in modulating aggregation, acting as inhibitors or neuroprotectors of the toxicity of these species, thus preventing the death of dopaminergic neurons. Some organic compounds are being identified with anti-prion activity, due to their low toxicity and high efficacy, considering that it has already been demonstrated that DP has a prion-like mechanism (JAN, A. et al., 2021), that is, that the aggregated aS protein can be transmitted from cell to cell, amplifying the degenerative process. The present study aims to evaluate the compound RPJ-12, generously donated by the group coordinated by Prof. identified as effective in inhibiting the aggregation of the prion protein, which is involved in transmissible spongiform encephalopathies, as well as the quinoline structure, present in the compound that has already been described in the literature for its antibacterial, antifungal, anticonvulsant, anti-inflammatory activities (Akranth Marella et al. , 2013), neuroprotective and antioxidant (FERNÁNDEZ-BACHILLER et al., 2010). For this, the expression and purification of the wild-type aS protein (WT) was carried out. The lyophilized aS protein was diluted in phosphate buffered saline (PBS) to a final concentration of 70 μ M in the experiment and incubated under aggregation conditions (37°C, constant agitation and pH 7.4) (Braga et al., 2011) where we monitored the formation of aggregates through binding to thioflavin T (specific dye to identify and quantify amyloid aggregates) and the ANS probe (dye widely used to study protein folding processes by binding to exposed hydrophobic surfaces of proteins) and scanning electron microscopy in STEM mode. The results demonstrated through the kinetics of aS WT aggregation, evaluated by the Thioflavin-T probe, that the compound RPJ-12 inhibited the final formation of amyloid species by approximately 80%. In the aS WT aggregation kinetics, evaluated by the ANS probe, the protein in the presence and absence of the RPJ-12 compound did not show significant differences. In the SEM, it was possible to observe, through the morphology of the aggregates, that the protein in the absence of the compound presented more evident structures after 24 hours of aggregation, and in the presence of the compound there was an increase in the speed of aggregation, being possible to observe more amorphous structures and disorganized. Based on the results obtained, we can suggest a modulating role of alpha-synuclein protein aggregation by the compound RPJ-12, however it is necessary to elucidate the mechanisms of this modulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANS: corante de ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfonato
aS:: Alfa-sinucleína
CL: Corpos de Lewy
DA: doença de Alzheimer
DH: doença de Huntington
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DN: Doenças neurodegenerativas
DO: densidade óptica
DP: Doença de Parkinson
Dp: doença do príon
EDS: espectroscopia por dispersão de energia de raios X
EETs: encefalopatias espongiformes transmissíveis
IPTG: Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
LB: Meio Luria Bertani
LNs: neurites de Lewy
NAC: componente hidrofóbico não amilóide
PBS: tampão fosfato salino
PrP: proteína príon
REM: movimento rápido dos olhos
SNC: sistema nervoso central
SNpc: substantia nigra pars compacta
Tio-T: Tioflavina-T
WT: proteína alfa-sinucleína do tipo selvagem
 β -syn: β -sinucleína
 γ -syn: γ -sinucleína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores associados à doenças neurodegenerativas.

Figura 2: Representação da cinética de agregação de uma proteína amilóide, caracterizada como uma reação de polimerização dependente de nucleação.

Figura 3: Fatores patológicos da DP: Degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc.

Figura 4: Fatores patológicos da DP.

Figura 5: Representação dos três domínios da proteína aS e suas mutações.

Figura 6: Estrutura molecular do composto RPJ-12.

Figura 7: Estrutura molecular da Tioflavina – T.

Figura 8: Estrutura da sonda ANS.

Figura 9: Confirmação da purificação da proteína aS através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Figura 10: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorada pela ligação a Tioflavina – T.

Figura 11: Porcentagem de agregação amilóide na ausência ou presença do RPJ-12, após 48 horas de cinética acompanhada por ligação de Tio – T.

Figura 12: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorada pela sonda ANS.

Figura 13: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorada pela sonda ANS.

Figura 14: Microscopia eletrônica de Varredura – modo STEM da proteína aS WT na ausência e presença do RPJ-12.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças neurodegenerativas	1
1.2. Amiloidoses	2
1.3. Doença de Parkinson	7
1.4. Alfa-Sinucleína	9
1.5. RPJ-12	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Clonagem, expressão e purificação da proteína aS WT	15
3.2. RPJ-12	16
3.3. Cinética de agregação da aS in vitro	16
3.4. Ensaio de fluorescência -- Tioflavina – T (Tio-T)	17
3.5. Ensaio de fluorescência - sonda ANS	17
3.6. Microscopia eletrônica de Varredura – Modo STEM	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Expressão e purificação da proteína aS	19
4.2. Efeito do RPJ12 na agregação in vitro da proteína aS WT	20
4.3. Interação de superfícies hidrofóbicas expostas de aS com o composto	21
4.4. Morfologia dos agregados formados na ausência e presença do RPJ-12	23
5. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (DN) são um grupo de doenças clinicamente variadas identificadas pela perda progressiva ou disfunção de neurônios no sistema nervoso central (SNC) ou no sistema nervoso periférico (Lião et al., 2022) e são caracterizadas por distúrbios multifatoriais do sistema nervoso, que acometem cerca de 30 milhões de indivíduos em todo o mundo. As condições multifatoriais que sugerem a causa desses distúrbios incluem o enovelamento incorreto e o tráfego disfuncional de proteínas, assim como, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e formação de radicais livres, exposição à toxicidade de metais e pesticidas e fatores correlacionados à idade (Figura 1) (Sheikh et al., 2013), que levam ao surgimento de alterações neuropatológicas como, placas amilóides, inclusões de alfa-sinucleína, emaranhados neurofibrilares de TAU, inclusões de TDP-43 e perda neural (Logroscino et al., 2022). As DN mais conhecidas incluem a doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (DH), doença do príon (Dp) e outras, que ocorrem por consequência desses processos neurodegenerativos (Khanam et al., 2016).

Essas doenças são debilitantes e ainda não há tratamento efetivo e estão aumentando rapidamente em prevalência. São diversificadas em sua fisiopatologia, podendo causar prejuízos cognitivos e de memória e outras afetando a capacidade motora, capacidade de fala e respiração. Por isso há necessidade imediata de tratamentos eficazes que só serão viáveis após a elucidação mais aprofundada dos mecanismos de cada uma dessas doenças (Gitler et al., 2017).

Um dos mecanismos mais evidentes e comuns à maioria destas doenças é o acúmulo de agregados protéicos, provocado pelo distúrbio de enovelamento de proteínas, onde este acúmulo pode originar oligômeros, protofibrilas e fibrilas amilóides insolúveis, principalmente quando se trata do enovelamento incorreto de proteínas solúveis, formando agregados (Alraawi et al., 2022). Muitos desses intermediários fibrilares podem ser tóxicos para células, tecidos e/ou órgãos. Diversos estudos experimentais utilizando modelos celulares dessas doenças, sustentam a ideia de que as espécies oligoméricas solúveis dessas proteínas são mais tóxicas do que a forma fibrilar (Casella et al., 2022).

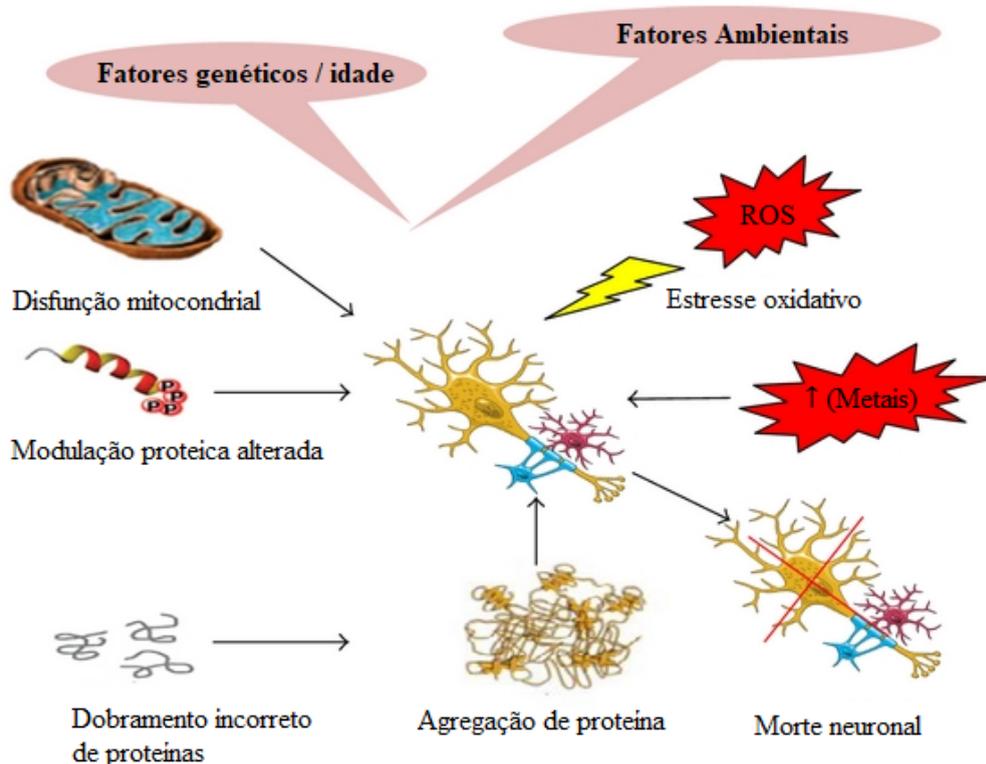


Figura 1: Fatores associados às doenças neurodegenerativas. (imagem adaptada de Sheikh et al., 2013).

As fibrilas amilóides insolúveis são agregados de proteínas compreendendo monômeros que se ligam através de folhas beta. Há diversos tipos de proteínas e peptídeos, variando em tamanho, estrutura e função, que formam fibrilas amilóides específicas. As fibrilas amilóides, em humanos, estão associadas a muitas DNs com problemas de enovelamento de proteínas, sendo, estas doenças classificadas como doenças amilóides ou amiloidoses (Sedov et al., 2022).

1.2. Amiloidoses

As amiloidoses são doenças causadas pelo depósito de fibrilas amilóides ou no decorrer do processo de formação destas fibrilas amilóides insolúveis que se originam de diversificados tipos de proteínas (Tabela 1) (Merrill et al., 2020)(Ke et al., 2020).

Tabela 1: Doenças relacionadas com amilóide. (Adaptada de Alraawi et al., 2022)

Doença	Proteína/Peptídeo	Estrutura
DA (doença de Alzheimer)	A β (peptídeo β -amilóide)	desenovelada nativamente
HCHWA (Dutch Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis)	A β (peptídeo β -amilóide)	desenovelada nativamente
(CAA) Angiopatia Amilóide Cerebral	A β (peptídeo β -amilóide)	desenovelada nativamente
Demência britânica familiar	Bri amilóide reticulado com cistina	desenovelada nativamente
(DH) Doença de Huntington	Huntingtin	Éxon 1 desenovelada que forma fibrilas
SBMA (Atrofia Muscular de Ligação do DNA Espinhal e Bulbar)	Proteína do receptor de andrógeno	Ligação de ligando e domínios α -helicoidal; N-terminal - desenovelada nativamente
NIID (Doença de Inclusão Neuronal Intranuclear)	Ataxina-1	desenovelada nativamente
SCA (Ataxia Espinocerebelar)	Ataxina-1	desenovelada nativamente
DRPLA (Atrofia Dentatorrubral Palidoluisiana Hereditária)	Atrofina-1	Provavelmente desenovelada nativamente
Diabetes Mellitus Tipo II	amilina	desenovelada nativamente
MCT (carcinoma medular da tireóide)	calcitonina	desenovelada nativamente
DP (doença de Parkinson)	α -sinucleína	desenovelada nativamente
DLBD (doença difusa de corpos de Lewy)	α -sinucleína	desenovelada nativamente
LBVAD (variante de corpos de Lewy da doença de Alzheimer)	α -sinucleína	desenovelada nativamente
DCL (demência com corpos de Lewy)	α -sinucleína	desenovelada nativamente
MSA (Atrofia de Múltiplos Sistemas)	α -sinucleína	desenovelada nativamente
Doença de Pick	proteína tau	desenovelada nativamente
PSP (Paralisia Supranuclear Progressiva)	proteína tau	desenovelada nativamente
DCJ (doença de Creutzfeldt-Jakob)	Proteína príon	fragmento N-terminal—nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal

GSS (Síndrome de Gerstmann-Straussler Schneiker)	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
FII (Insônia Familiar Fatal)	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
Kuru	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
BSE (Espongiforme Bovino)	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
Scrapie	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
Encefalopatia Espongiforme	Proteína príon	fragmento N-terminal— nativamente desenovelada; Domínio C-terminal: α -helicoidal
Esclerose Lateral Amiotrófica	Superóxido dismutase 1	Folha β e semelhante a Ig
Polineuropatia Amiloidótica Familiar	Mutantes de transtirretina	folha β
Amiloidose de cadeia leve amilóide (AL)	Cadeias leves de imunoglobulina (Ig)	Folha β e semelhante a Ig
Amiloidose sistêmica senil	Transtirretina de tipo selvagem	folha β
Amiloidose relacionada à hemodiálise	β 2-microglobulina	Folha β e semelhante a Ig
Amiloidose lisozima	Mutantes de lisozima	α -helicoidal e β -folha
Amiloidose por apolipoproteína A1	Fragmentos de Apo A-1	Intrinsecamente desordenado
Amiloidose localizada por injeção	Insulina	α -helicoidal e semelhante à insulina
Paralisia supranuclear progressiva	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Doença dos grãos argirofílicos	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Demência predominante em emaranhado	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Encefalopatia traumática crônica	proteína tau	Intrinsecamente desordenado

Ganglioglioma	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Meningioangiomasose	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Panencefalite esclerosante subaguda	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
encefalopatia por chumbo	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
esclerose tuberosa	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Doença de Hallervorden-Spatz	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
lipofuscinosose	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Demência dinamarquesa familiar	proteína tau	Intrinsecamente desordenado
Amiloidose de cadeia pesada	Fragmentos de cadeia pesada de imunoglobulina	All- β , semelhante a Ig
amiloidose AA	Fragmentos completos ou N-terminais da proteína amiloide A sérica (SAA)	Feixe de quatro hélices All- α , tipo SA
Amiloidose visceral hereditária	β_2 -microglobulina	All- β , semelhante a Ig
Amiloidose ApoAII (principalmente renal)	apolipoproteína A-II estendida C-term	Desconhecido
Amiloidose ApoAIV (muitos órgãos)	Fragmentos N-term de apolipoproteína A-IV (ApoAIV)	Desconhecido
Amiloidose ApoCII	Apolipoproteína C-II	All- α , dobra desconhecida
Amiloidose de fibrinogênio	Fragmentos da cadeia de fibrinogênio	Desconhecido
Amiloidose atrial	Fator natriurético atrial (ANF)	Intrinsecamente desordenado

Alguns fatores vêm sendo apontados como possíveis causas das doenças amilóides, tais como, envelhecimento, variantes genéticas, inflamação e distúrbios neoplásicos, causando depósitos amilóides através de superprodução, enovelamento incorreto e depuração reduzida de proteínas amiloidogênicas específicas (Mitsuharu, 2022). No entanto, os mecanismos patológicos dessas doenças ainda não foram completamente elucidados, tendo como possível estratégia de tratamento, a inibição da formação desses depósitos amilóides, sendo de vital importância o entendimento da formação dessas fibrilas (Sedov et al., 2022).

As fibrilas amilóides possuem estrutura secundária majoritariamente constituída de folhas β cruzadas. Diferentemente das proteínas fibrosas normais, que tem uma função estrutural nas células, as fibras amilóides estão relacionadas a aproximadamente 50 distúrbios patológicos ligados a mais de 30 tipos de amilóides (Tabela 1) (Bajic et al., 2022).

De acordo com Alraawi et al., 2022, o início da formação dessas fibras amilóides ocorre com a agregação de proteínas que se unem a partir da formação de um centro nucleador, que impulsiona a polimerização de proteínas. Essa formação de agregados leva a alguns modelos sugeridos de vias que conduzem a formação destas estruturas agregadas. Este mecanismo de nucleação, que converte as proteínas de suas formas solúveis funcionais para o estado amilóide, depende de características tanto intrínsecas quanto ambientais (Cremades & Dobson, 2017).

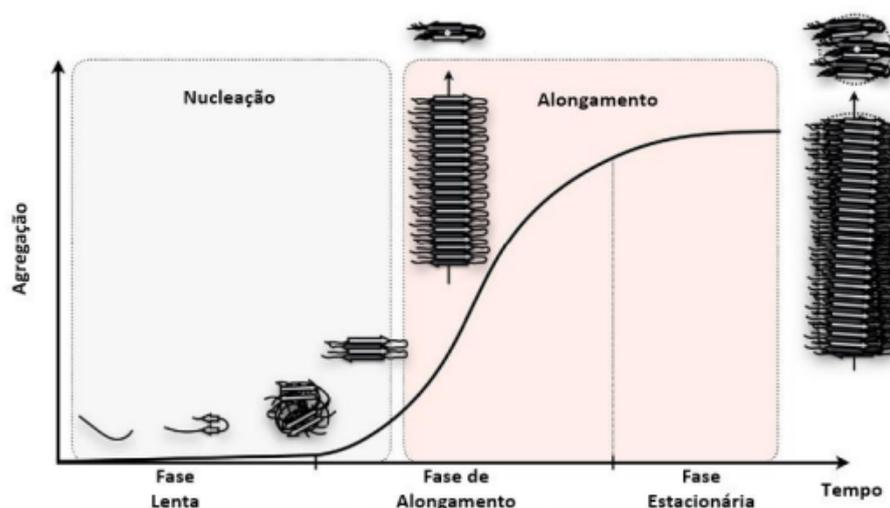


Figura 2: Representação da cinética de agregação de uma proteína amilóide, caracterizada como uma reação de polimerização dependente de nucleação, onde na fase lenta (lag) ocorre o início da nucleação, formando os primeiros oligômeros. Com a associação de novos monômeros se inicia a fase de alongamento (log), que ocorre de forma rápida, atingindo, então a fase estacionária (platô), onde há formação de fibras amilóides (predominantemente), com a presença de monômeros praticamente inexistentes. (Imagem adaptada de Wouter & Outeiro, 2017).

O modelo sugerido para o mecanismo de nucleação-polimerização, na formação de fibras amilóides, é demonstrado pela curva sigmoideal da cinética de agregação de uma proteína amilóide (Figura 2), onde podemos ver as espécies solúveis de uma proteína amilóide experimentando diferentes conformações até a formação da fibra (Cremades & Dobson, 2017). A agregação começa por uma fase lenta (lag), onde os monômeros se organizam,

formando núcleos de agregação. Nesta fase, ocorrem grandes mudanças estruturais, assim como o surgimento dos primeiros oligômeros e representa a etapa limitante da velocidade da reação. Com a associação de novos monômeros a estas estruturas, a velocidade da reação aumenta, iniciando a fase de alongamento (log) onde há um crescimento exponencial. Posteriormente, a ausência de monômeros livres leva a diminuição na taxa de polimerização, atingindo a fase estacionária (platô), onde há presença majoritariamente de fibras (Caldeira, 2020).

1.3. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que causa deficiência motora progressiva e acomete indivíduos com mais de 55-60 anos de idade, afetando ambos os sexos, com uma predominância no sexo masculino (Asad Jan et al., 2021). A primeira descrição clínica da DP data de 1817 quando James Parkinson relatou seis casos em seu ensaio “An essay on the shaking palsy”, do que na época era conhecida como “paralysis agitans” e só mais tarde recebeu o crédito pela descoberta, assim, sendo denominada “maladie de Parkinson” ou doença de Parkinson (Jankovic, 2017).

Os principais sintomas motores da DP são: tremor em repouso, rigidez, acinesia/bradicinesia e instabilidade postural, porém, nem sempre todos esses sintomas são vistos em todos os pacientes, pelo menos em um determinado período de tempo. Embora a DP seja considerada como um distúrbio motor, também possui sintomas não motores, tais como: hiposmia, movimento rápido dos olhos (REM), transtorno de comportamento, constipação e depressão, assim como, demência e alucinações que ocorrem tardiamente na trajetória da doença, distúrbios neuropsiquiátricos, do sono, autonômicos e sensoriais (Massano & Bhatia, 2012) (Saba et al., 2022).

O diagnóstico da DP é embasado nos sintomas clínicos, pela identificação do grupo de sintomas motores citados acima, sendo a bradicinesia uma das principais características, juntamente com a análise de histórico clínico do paciente, a fim de excluir outras doenças que possuem sintomas semelhantes. Não existe atualmente um diagnóstico da doença *in vivo*, com exceção de testes genéticos específicos, que só são pertinentes a uma minoria de casos (Cabreira & Massano, 2019).

As primeiras características patogênicas da DP incluem a degradação constante de apenas um subconjunto de neurônios dopaminérgicos em áreas específicas do cérebro, como

no mesencéfalo, mais especificamente na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Figura 3), (Dong-Chen et al., 2023), onde estes neurônios possuem como característica uma pigmentação de cor escura devido a produção de neuromelanina (Zecca et al., 2001), ficando evidente a perda desses neurônios pelo clareamento desta região.

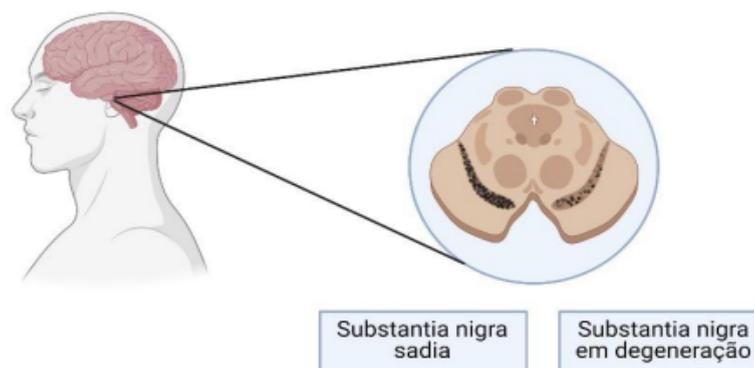


Figura 3: Fatores patológicos da DP. Degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc; a ampliação do mesencéfalo mostra a representação da SNpc em um indivíduo sadio e em um indivíduo com DP: do lado esquerdo a SNpc preservada, do lado direito a SNpc em neurodegeneração (imagem adaptada Amaral, 2021).

Outra característica patogênica da DP é o aumento anormal da proteína alfa-sinucleína (aS) acumulada no citoplasma, em alguns neurônios de várias áreas diferentes do cérebro, onde, por se tratar de uma proteína amilóide, forma agregados, como, por exemplo, as fibras amilóides, e as estruturas intracitoplasmáticas conhecidas como corpos de Lewy (CL), constituídos majoritariamente pela aS, levando à morte desses neurônios (neurodegeneração) (Figura 4) (AMARAL, 2021). Os corpos de Lewy se propagam com o avanço da DP, afetando os neurônios não dopaminérgicos em diversas outras regiões do cérebro, como as regiões límbicas e neocorticais, atingindo os neurônios fora do sistema nervoso central (SNC), como os do bulbo olfatório ou do sistema mesentérico, causando a neurodegeneração (Dong-Chen et al., 2023).

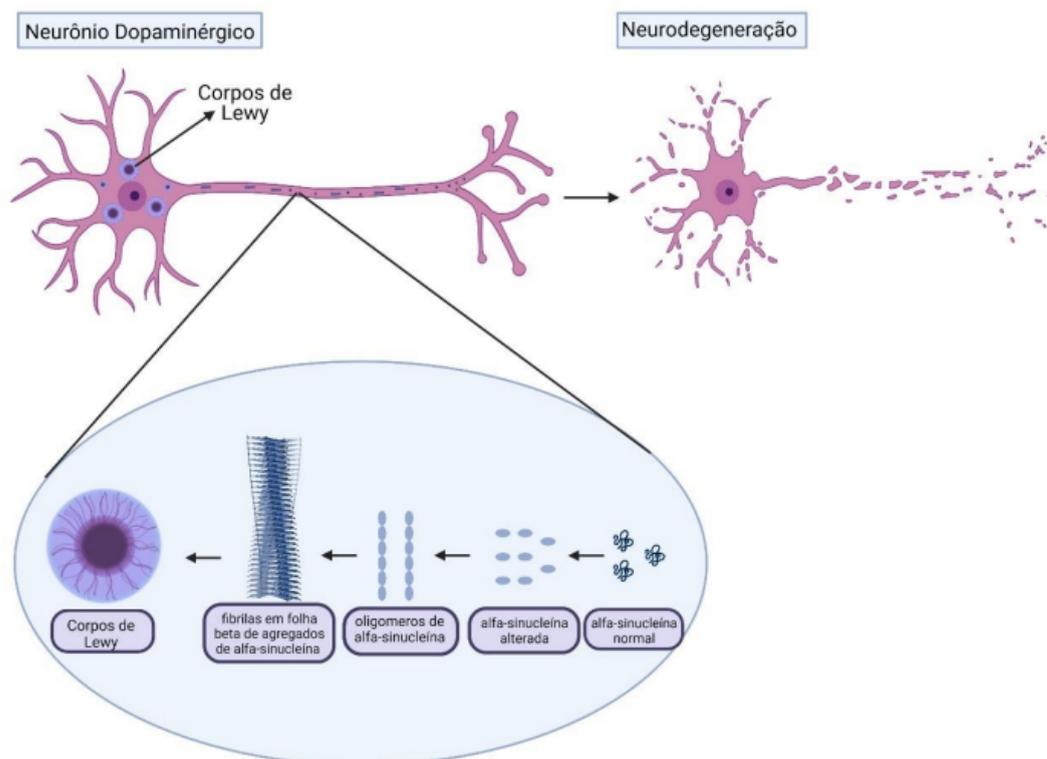


Figura 4: Fatores patológicos da DP. Processo de neurodegeneração causado pelo acúmulo da aS alterada; a ampliação demonstra como o processo de agregação da alfa-sinucleína ocorre, tendo início nos monômeros alterados, formando oligômeros, fibrilas amilóides e, por fim, os corpos de Lewy (imagem adaptada de Amaral, 2021).

O enfoque atual para o tratamento da DP é voltado para terapias sintomáticas envolvendo estratégias de reposição de dopamina usando precursores da dopamina (L-dopa). Porém estes tratamentos sintomáticos não podem prevenir e nem interromper a progressão da DP. Além das terapias sintomáticas, nos últimos anos, houve uma quantidade abundante de estudos voltados para o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras para DP com foco e potencial para retardar, parar ou reverter a progressão da doença, assim como, prevenir o comprometimento cognitivo (Liu et al., 2014).

1.4. Alfa-Sinucleína

A proteína Sinucleína foi isolada originalmente do peixe “Torpedo Ray” e de tecidos cerebrais de ratos. Descrita em 1988, a α -sinucleína (aS) é uma proteína pré-sináptica de 14 kDa, assim como a β -sinucleína (β -syn) e a γ -sinucleína (γ -syn), pertencem à família das proteínas sinucleínas. Seus genes estão localizados em diferentes cromossomos e codificam

peptídeos que contêm terminal amino altamente conservado, porém terminal carboxílico diferentes (Ling Ling et al., 2022). É uma proteína micromolecular solúvel amplamente expressa nas áreas pré-sinápticas e nucleares do sistema nervoso central, onde representa cerca de 1% da proteína citoplasmática total nos neurônios, sua função exata ainda não foi completamente elucidada, porém é conhecida sua atuação na regulação da liberação de neurotransmissores, função sináptica e plasticidade sináptica (Rong Chen et al., 2022).

A aS está no centro de pesquisas em diversos laboratórios e atraiu um interesse significativo em 1997, depois que uma mutação em seu gene foi associada a casos familiares de doença de Parkinson de início precoce e foi constatado que seus agregados são os principais componentes dos corpos de Lewy, que são estruturas intracitoplasmáticas e marcas registradas da DP, sendo assim estabelecido o envolvimento da aS na patogênese da DP. (Leonid et al., 2012). A aS é uma proteína de 140 aminoácidos, que é codificada por um único gene composto por sete exons localizados no cromossomo 4 (Leonid et al., 2012). É encontrada tanto no citosol quanto no líquido intersticial extracelular. Sendo observadas as espécies oligoméricas no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP, promovendo a agregação monomérica (Casella et al., 2022).

A aS é codificada pelo gene SNCA e é considerada como um monômero solúvel desenovelado (Rong Chen et al., 2022), e existem pelo menos quatro isoformas conhecidas de aS codificadas por este mesmo gene em humanos e produzidas por meio de splicing alternativo, caracterizadas pelo número único de aminoácidos e potenciais de agregação, sendo, as isoformas com alto peso molecular, formadas por cerca de 140 aminoácidos, contendo todos os sítios responsáveis pelas modificações pós-traducionais (Nwabufo et al., 2022).

O gene SNCA (Figura 5) é formado por três domínios: um domínio de ligação lipídica N-terminal anfipático rico em lisina (N-terminal), um componente hidrofóbico não amilóide β (NAC) e um domínio de ligação C-terminal ácido (C-terminal)(Rong Chen et al., 2022).

A região N-terminal varia de 1 a 60 resíduos de aminoácidos contendo sequências repetitivas incompletas (XKTKEGVXXXX) que permitem a formação de α -hélice. Alguns motivos helicoidais de ligação de apolipoproteínas anfipáticas são encarregados pela ligação de lipídios, como fosfolipídios. A conformação helicoidal da aS é induzida por essa ligação aos fosfolipídios que possui um papel crítico em relação a neurotransmissão, comprometendo a ligação a membranas. Neste domínio se encontram as mutações relacionadas à DP (A30P,

E46K, A53T). A forma fisiológica de aS é N-terminal-acetilada após a tradução. (Ling Ling et al., 2022)(Nwabufu et al., 2022).

O componente hidrofóbico não-amilóide- β (NAC), contém de 61 a 95 resíduos de aminoácidos e é responsável por interações proteína-proteína. Essa interação proteína-proteína induz a aS a adotar uma conformação de folha beta, uma ocorrência crítica nos fenômenos de agregação semelhantes a príons (príon-like) associados à DP. Uma característica única desse fenômeno de agregação príon-like é o modelo no qual a aS mal enovelada pode interagir com um aS normal, modificando-a em uma forma amiloidogênica. Essa agregação da aS dobrada de forma incorreta resulta na formação de fibrilas insolúveis e pode originar os corpos de Lewy.

A região C-terminal varia de 96 a 140 resíduos de aminoácidos é enriquecida com resíduos de carga negativa e prolina, proporcionando flexibilidade ao polipeptídeo tem sido sugerido que esta região está envolvida na mediação de interações de aS com outras proteínas citosólicas ou ligadas à membrana (Nwabufu et al., 2022) (Villar-Piqué et al., 2015).

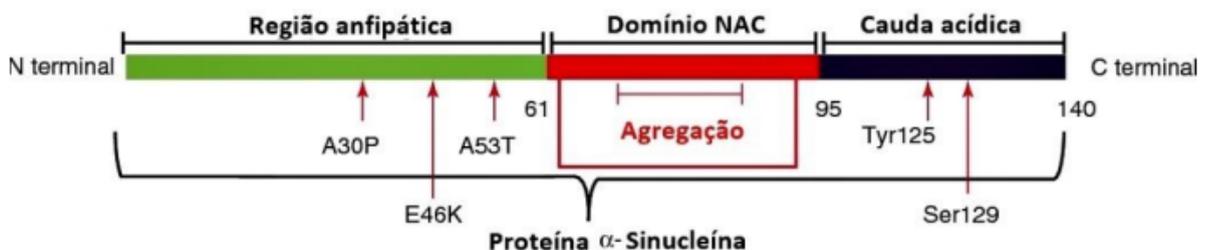


Figura 5: Representação dos três domínios da proteína aS e suas mutações. O domínio N-terminal (verde), o domínio NAC - componente β não-amilóide (vermelho) e o domínio C-terminal (preto); (imagem adaptada de Parihar et al., 2019).

Várias observações foram estabelecidas envolvendo a aS na patogênese da DP e dentre todas as evidências as que mais se destacam são (Leonid et al., 2012):

- A produção de aS do tipo selvagem (WT) em camundongos transgênicos ou a expressão de WT, A30P ou A53T em moscas transgênicas leva a déficits motores e inclusões neuronais semelhantes a DP (Feany et al., 2000);

- A DP autossômica dominante de início precoce é induzida como resultado de três diferentes mutações missense no gene da aS, constituindo as substituições A30P, E46K e A53T (Figura 5) na aS, ou como um resultado da superexpressão da proteína aS do tipo selvagem (WT) devido à triplicação do gene (Leonid et al., 2012).;
- A detecção sistemática, através de anticorpos para aS, em corpos de Lewy (CLs) e neurites de Lewy (LNs), características da DP, onde essas inclusões são compostas significativamente de aS (Spillantini et al., 1997);
- Foi demonstrado que depósitos positivos para aS se acumulam em vários modelos animais nos quais o parkinsonismo foi induzido pela exposição a diferentes neurotóxicos (Leonid et al., 2012).

Mediante as evidências supracitadas, estabelecendo o envolvimento da aS com a DP, e apresentando as complicações relacionadas ao desenovelamento incorreto da aS formando oligômeros e fibras amilóides, assim como, a sua presença significativa da proteína na composição dos CL, foi sugerido que o aumento da atividade das vias de depuração para a proteína mal enovelada pode fornecer terapias aprimoradas. Tendo em vista que o desenovelamento incorreto e a agregação prion-like da aS é um evento crucial na fisiopatologia da DP, um alvo terapêutico emergente pode ser a prevenção da via de desenovelamento incorreto (Nwabufo et al., 2022) focando a neuroproteção das espécies tóxicas formadas pela aS, com o intuito de inibir, impedir ou reduzir a formação amilóide e, com isso, a neurodegeneração.

1.5. RPJ-12

O grupo coordenado pela Profa . Yraima Cordeiro (Faculdade de Farmácia, UFRJ) vem estudando inibidores de agregação da proteína prion (PrP), que está envolvida nas encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs). E na busca por compostos orgânicos identificados com atividade anti-prion, que apresentam baixa toxicidade e elevada eficácia, foram encontrados diversos compostos que apresentam mecanismos de inibição e elevada eficácia anti-prion (Ferreira et al., 2014). Dentre estes compostos, a Profa . Yraima Cordeiro (UFRJ), gentilmente, nos cedeu o composto RPJ-12

(7-chloro-4-(2-(4-chlorobenzylidene)hydrazineyl)quinoline) (Figura 6), que apresentou, em um teste inicial, realizado por ela, uma maior eficácia na inibição da agregação da proteína aS e não apresentou efeito na inibição da agregação da proteína do príon.

O RPJ-12 é um composto de fórmula molecular $C_{16}H_{11}Cl_2N_3$ e peso molecular 316,18 g/mol, que foi desenvolvido baseado em substâncias identificadas como eficazes na inibição da agregação da proteína príon, contendo em sua estrutura uma quinolina, que é um composto aromático heterocíclico contendo nitrogênio e de fórmula molecular de C_9H_7N e seu peso molecular é 129,16g/mol, e ocorre em diversos compostos naturais como os alcalóides. Já foi descrito na literatura que a quinolina possui atividades antimalárica, antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, cardiotônica, anticonvulsivante, anti-inflamatória e analgésica (Akranth Marella et al., 2013).

Alguns derivados da quinolina como a tacrina–8-hidroxiquinolina possuem atividade contra a doença de Alzheimer possuindo ação inibidora da colinesterase, assim como, os derivados da 8-hidroxiquinolina têm propriedades quelantes de metais, neuroprotetoras e antioxidantes (Fernández-Bachiller et al., 2010). Outros compostos derivados da quinolina são as oximas de 1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2,2,4-triona que agem como antagonistas de NDMA em receptores de glicina e podem ser usados como agentes contra doenças neurodegenerativas (Cai et al., 1996).

Tendo em vista as características citadas sobre o RPJ-12, este composto parece ter um papel promissor em diversas atividades biológicas que estão diretamente relacionadas com a neurodegeneração, característica da DP. Porém, ainda não existem estudos relacionando o composto RPJ-12 com a patologia, ou com um possível papel na modulação da agregação da proteína aS (WT) ou de qualquer outra proteína amilóide.

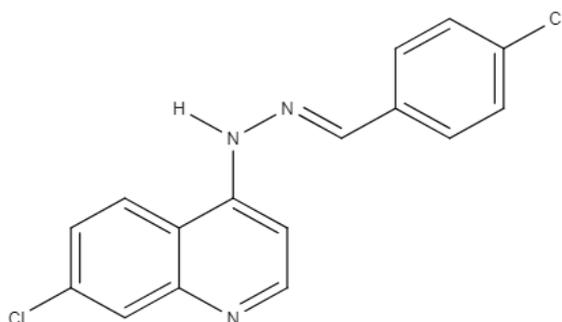


Figura 6: Estrutura molecular do composto RPJ-12.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do composto RPJ-12 na modulação da agregação *in vitro* da proteína alfa sinucleína e a formação das espécies agregadas na presença do composto RPJ-12.

2.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar a proteína alfa-sinucleína selvagem (WT);
- Acompanhar a agregação da aS WT na presença e na ausência do composto RPJ-12, através de sondas específicas como, tioflavina T (corante específico para formação de agregados amilóides), e ANS, sonda que interage com as regiões hidrofóbicas de proteínas;
- Caracterizar a morfologia das espécies formadas na presença e ausência do RPJ-12 através da Microscopia Eletrônica de Varredura – modo STEM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem, expressão e purificação da proteína aS WT

Para a obtenção da proteína aS WT purificada, foi utilizado o plasmídeo pT7-7-wt, cedido pela professora Débora Foguel (IBqM-UFRJ), que codifica o gene da proteína aS humana com resistência à ampicilina. O plasmídeo foi inserido na bactéria *Escherichia coli* (cepa BL21- pLysS), com resistência a cloranfenicol, através da técnica de transformação por choque térmico. Para isso, as células BL21- pLysS competentes para transformação foram misturadas ao plasmídeo e submetidas ao gelo por 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi colocada em banho maria a 42°C por 1 minuto e, posteriormente, no gelo por 30 segundos. Após esse processo, a mistura foi adicionada a 1 mL de meio Luria Bertani (LB) e inserida na estufa por 1h a 37°C, para permitir o crescimento bacteriano. Passado esse tempo, as bactérias foram cultivadas em placa de Petri com meio LB-ágar bacteriológico na presença de 100 µg/mL do antibiótico ampicilina e 30 µg/mL de cloranfenicol, sendo mantida na estufa a 37°C por 24h para que pudesse ocorrer o crescimento bacteriano. Após ser constatado o crescimento das bactérias transformadas, estas foram pré-inoculadas em 100 mL de meio LB, onde foram cultivadas por aproximadamente 20 horas a rotação constante de 200 rpm e temperatura de 37 °C. Deste pré-inóculo, foi transferido volume suficiente para que 1 litro de meio atingisse densidade óptica (DO) inicial de 0,1, ao realizar leitura no espectrofotômetro em 600 nm. A DO foi acompanhada, sendo a cultura mantida nas condições de agitação e temperatura mencionadas acima, até atingir 0,5. Quando então induziu-se a expressão com 0,5mM de isopropil-beta-Dtiogalactopiranosídeo (IPTG) pelo período de 15 a 18 horas, mantendo-se a rotação de 200 rpm, mas reduzindo a temperatura de cultivo para 20 °C. Aguardado este período, realizou-se uma centrifugação por 30 minutos a 8000 x g (rotor R20A2- 20.000 rpm na centrífuga HITACHI CR22N) em uma temperatura de 4°C.

Para a purificação, foi utilizado o protocolo descrito por Follmer et al., 2013. O pellet obtido na última centrifugação foi ressuspenso em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e submetido a ultrassonicação por 1 hora. O pH do extrato foi ajustado para 3,5 com uma solução de HCl 9% e centrifugado a 16.000 x g por 20 min a 4°C. O pH do sobrenadante obtido foi então ajustado para o pH 7,5 e foi adicionado a ele sulfato de amônio 50% antes de nova centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 15 mL de tampão Tris 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,0 e dialisado por aproximadamente 16 horas em 2 L do mesmo tampão e, depois, submetido a uma segunda

diálise contra 2 L de água por 24 h, aproximadamente. A amostra dialisada foi liofilizada e guardada em freezer a -20°C .

A fim de confirmar a expressão e purificação, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) com objetivo de verificar se a proteína foi purificada nas condições ideais, ou seja, obtendo peso equivalente a 14 kDa. Para isto, foi utilizado o equipamento de eletroforese da Bio-Rad, com voltagem de 200 volts e amperagem de 0,03 amperes. As amostras liofilizadas foram diluídas em tampão fosfato salino 1x (PBS), a fim de ficarem a uma concentração de $140\ \mu\text{M}$, e aplicadas em gel de poliacrilamida 15%. Utilizamos o padrão de peso molecular Plus Protein Standards – All Blue da BioRad. Confirmada a purificação, a amostra foi liofilizada e armazenada a -20°C .

3.2. RPJ-12

O composto RPJ-12 foi cedido pelo grupo coordenado pela Prof^a Dr^a Yraima Cordeiro (UFRJ). A preparação do RPJ-12 para os ensaios *in vitro* foi realizada através da diluição do composto em Dimethyl sulfoxide (DMSO) 0,5 %. O composto, de peso molecular $316,18\ \text{g/mol}$, foi selecionado dentre uma gama de outros compostos, desenvolvidos baseados em substâncias identificadas como eficazes na inibição da agregação da proteína príon, e foi o que teve um melhor desempenho em relação à inibição da agregação da proteína aS.

3.3. Cinética de agregação da aS *in vitro*

No intuito de avaliar o papel do composto RPJ-12 na modulação da agregação da proteína aS e na toxicidade dos agregados formados, foi realizado o protocolo de fibrilização: em leitor de microplacas SpectraMax Paradigm acoplado ao leitor de fluorescência;

Neste protocolo de fibrilização, a aS foi incubada nas condições de agregação ($70\ \mu\text{M}$) na ausência ou na presença do composto RPJ-12 ($1600\ \mu\text{M}$), nas concentrações finais de $7\ \mu\text{M}$, $35\ \mu\text{M}$, $70\ \mu\text{M}$ e $140\ \mu\text{M}$. A diluição, tanto da solução estoque de proteína quanto do estoque referente ao composto, a fim de se obter as concentrações finais para agregação, foi realizada com PBS pH 7,4. A incubação foi realizada no leitor de microplacas a 37°C , por 48 horas, com agitação por 30 segundos a cada 5 minutos, antes de cada leitura.

3.4. Ensaio de fluorescência -- Tioflavina – T (Tio-T)

A Tio – T é um sal benzotiazólico (Figura 7), que possui alta afinidade à estrutura de folha – β , e que, ao ser excitado com um comprimento de onda próximo a 450 nm, emite fluorescência entre 470 nm e 540 nm (LeVine, 1999). Já é conhecido que a formação de agregados amiloidogênicos está acompanhada do aumento da conformação de folha- β , em que as fibras são as espécies amilóides com maior quantidade dessas estruturas, enquanto os monômeros são as que possuem menor quantidade (Cremades et al, 2017). Desta forma, ao incubar a proteína aS, e induzi-la a agregar na presença de Tioflavina-T, torna-se possível acompanhar a formação amilóide através da fluorescência desta sonda. A fim de avaliar a formação de agregados amilóides, foi realizada a cinética de agregação da proteína aS WT na ausência e presença do composto RPJ-12, através do protocolo de fibrilização I citado acima, agora na presença de Tioflavina - T (10 μ M). Os comprimentos de onda de excitação e emissão da tioflavina – T foram de 450 nm e 477 nm, respectivamente.

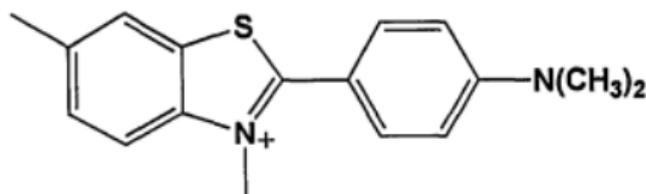


Figura 7: Estrutura molecular da Tioflavina – T (LeVine, 1999).

3.5. Ensaio de fluorescência - sonda ANS

As interações hidrofóbicas das proteínas possuem um papel importante na caracterização da conformação e nas interações entre as proteínas, assim como, a quantidade e o tamanho relativo dos sítios hidrofóbicos na superfície da proteína podem estabelecer a solubilidade e a capacidade de formar agregados (CARDAMONE; PURIT, 1992). A figura 8 representa a estrutura da sonda ANS (corante de ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfonato) que tem como mecanismo o aumento da intensidade de fluorescência ao ligar-se a porções hidrofóbicas da proteína. A caracterização dos sítios hidrofóbicos possibilita uma visão estrutural modulada da proteína a partir da formação do complexo supramolecular, assim é possível analisar, comparativamente, as regiões hidrofóbicas antes e depois da presença do ligante e a formação do complexo (RANJBAR et al., 2013).

O ensaio de fluorescência utilizando a sonda ANS foi realizado em leitor de microplacas SpectraMax Paradigm acoplado ao leitor de fluorescência no modo Spectrum. O estoque de ANS foi preparado em tampão fosfato (30 μM , pH7,4). O estoque da proteína aS (70 μM) foi incubada na presença da proporção molar de proteína/composto (RPJ-12) (1:1) nas condições de indução de agregação do protocolo de fibrilização I, citado na seção 3.3. Nos intervalos de tempo (0h, 4h, 7h e 24 horas), as alíquotas das amostras de aS foram retiradas e diluídas para uma concentração final da proteína de 5 μM e foi acrescentado a sonda ANS na concentração de 30 μM , para as medições da intensidade de fluorescência do ANS. As moléculas de ANS foram excitadas a 360 nm e os espectros de emissão foram registrados na faixa de comprimento de onda de 400 nm a 600 nm usando uma cubeta de quartzo de 1 ml (Ankita et. al, 2021).

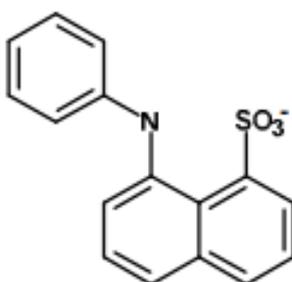


Figura 8: Estrutura da sonda ANS (SILVA, 2017).

3.6. Microscopia eletrônica de Varredura – Modo STEM

Para avaliação da morfologia dos agregados formados, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura no modo STEM. Para estas medidas, as amostras são depositadas em grades de cobre próprias para esta técnica, já recobertas por uma película de FormVar, e revestidas posteriormente por uma camada de carbono. Para a produção desta camada, um fio de carbono foi aquecido ao ponto de pedaços finos serem liberados, como um filme, e estes se depositarem em cima das grades.

Após o devido preparo das grades, foram coletadas alíquotas de 10 μL das amostras que agregaram de acordo com o protocolo 1 de fibrilização, após 4h, 7h e 24h de agregação, e estas foram depositadas nas grades. Após 90 segundos, o excesso foi retirado com um papel de filtro e foram adicionados 10 μL de acetato de uranila 2% sobre a grade, para o contraste

negativo. O excesso foi retirado após 30 segundos com papel de filtro e as amostras foram visualizadas em um Microscópio Vega3 LMU operando a 25 kV. As amostras para microscopia conduzidas no equipamento de DENTONVACCUM no Vega3 LMU, acoplado com EDS (espectroscopia de energia dispersiva) foram preparadas em suportes stubs, previamente limpos com acetona e secos onde é adicionada uma fita de carbono que é depositada para suportar a amostra sólida, que é posteriormente armazenada para análise no microscópio.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão e purificação da proteína aS

Para a produção da proteína, realizamos a expressão heteróloga em *E.coli* e a purificação da aS de acordo com os protocolos descritos em materiais e métodos na seção 3.1. A fim de confirmar a eficácia de tais etapas, foi coletada uma amostra após o término da purificação e a amostra foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. É possível visualizar no gel da Figura 9 a presença de uma banda entre 15 e 25 kDa. Apesar do peso da aS ser 14 kDa, é relatado que esta proteína pode migrar em uma eletroforese com peso maior devido a sua característica desenovelada, o que ocasiona maior raio hidrodinâmico (O'connell et al., 2005)(Figura 9).

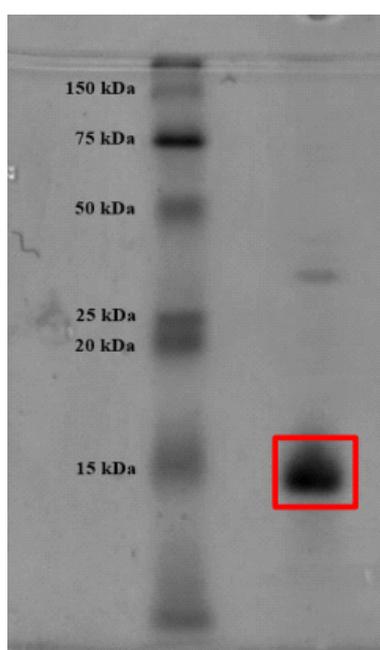


Figura 9: Confirmação da purificação da proteína aS através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, com a amostra da proteína aS WT purificada, assinalada em vermelho.

4.2. Efeito do RPJ12 na agregação *in vitro* da proteína aS WT

A fim de esclarecer melhor os princípios que regem a agregação protéica envolvida em amiloidoses, diversos grupos têm como estratégia estudar a agregação *in vitro* das proteínas purificadas e, dessa forma, encontrar as condições que levam estas a deixarem a sua forma solúvel, nativa e funcional para formar fibras amilóides (Chiti & Dobson, 2017; Cremades & Dobson, 2017). Na figura 10, vemos o resultado da incubação da aS WT na presença ou na ausência do composto RPJ-12. Como podemos observar na cinética de agregação mensurando a fluorescência emitida pela Tio-T, a proteína na ausência do composto (linha vermelha) apresenta um perfil característico de formação amilóide, atingindo o platô de ligação da sonda após aproximadamente 24 horas de cinética nestas condições. Já na presença do RPJ-12 (linha azul) na razão molar 1:1, a aS apresentou o máximo de formação amilóide em torno de 7 horas após o início da agregação, com uma fase lag menor. A partir dos valores de intensidade de fluorescência da Tioflavina T devido à ligação às espécies amilóides, calculamos a porcentagem de agregação na ausência ou na presença do RPJ-12 (Figura 11), e pudemos observar que este composto reduziu a formação de espécies amilóides em 80% em relação à proteína na ausência do composto.

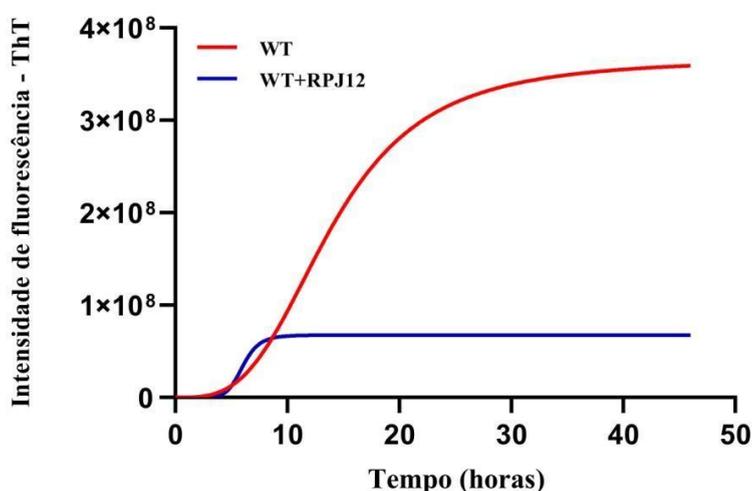


Figura 10: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorada pela ligação a Tioflavina – T: A ligação a Tio-T na cinética de agregação da aS WT (70 μ M) foi acompanhada através de fluorescência extrínseca da Tioflavina T. As amostras foram incubadas na ausência (linha vermelha) e na presença do RPJ-12 (70 μ M) (linha azul) a 37°C, por 48 horas, com agitação por 30 segundos antes de cada leitura. As leituras da fluorescência de Tioflavina-T foram realizadas excitando as amostras em 450 nm e medindo a emissão em

477 nm a cada 5 minutos. Análise estatística realizada através do teste T de Student com a média da triplicata, $n=4$; $p < 0,0001$.

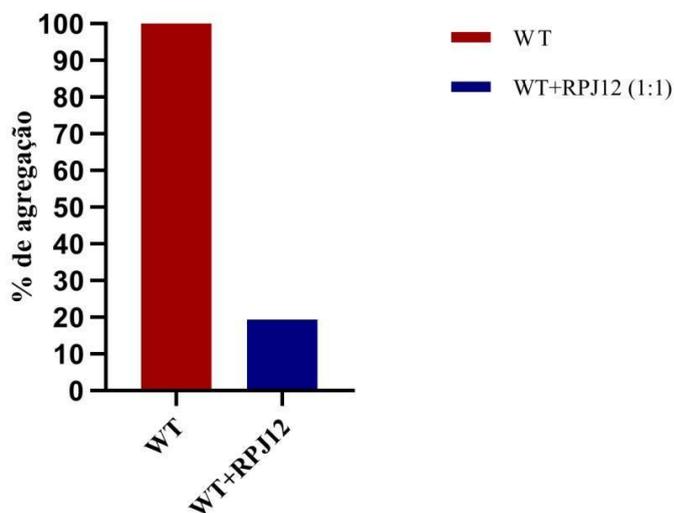


Figura 11: Porcentagem de agregação amilóide na ausência ou presença do RPJ-12, após 48 horas de cinética acompanhada por ligação de Tio - T. Os valores referentes a 48 horas de agregação foram utilizados para cálculo da porcentagem da inibição da agregação, tendo sido considerado o valor referente à proteína na ausência do RPJ-12 como 100% de agregação amilóide, e os outros valores, referentes à presença do composto. A barra em vermelho simboliza a geração de espécies amilóides referente à proteína WT na ausência do RPJ-12, em azul é a formação na presença do RPJ-12, na proporção de 1:1 (proteína:composto).

4.3. Interação de superfícies hidrofóbicas expostas de aS com o composto

A agregação de proteínas ocorre por meio de grandes mudanças estruturais na proteína, onde, primeiro a proteína se torna parcialmente desenovelada, o que resulta na exposição de sítios ou regiões hidrofóbicas em sua superfície. Esta exposição dos grupos hidrofóbicos na superfície da proteína as torna propensa à agregação, pois acelera a associação de tipos semelhantes de estruturas monoméricas que levam à formação de agregados de proteínas.

Mudanças conformacionais podem ser avaliadas monitorando-se a exposição de superfícies hidrofóbicas em proteínas através da ligação e emissão de fluorescência da sonda ANS (1-anilinaftaleno-8-sulfonato). Recorremos a esta sonda para avaliar a ocorrência de exposição de superfícies hidrofóbicas durante a agregação da aS WT. É possível observar na Figura 12 que a sonda ANS ligada a proteína aS na presença (espectro azul) ou na ausência do

composto RPJ-12 (espectro vermelho) tem um leve desvio para menores comprimentos de onda e a variação na intensidade de fluorescência não é significativa.

Embora haja um leve aumento da fluorescência da sonda ANS na presença da aS WT a fluorescência não varia ao longo do tempo de agregação (Figuras 12 e 13). Estes dados evidenciam que a aS não apresenta variação na superfície hidrofóbica exposta, o que pode se explicar pelo fato de ser uma proteína naturalmente desordenada. Tanto na presença quanto na ausência do composto RPJ-12, esta variação é discreta sugerindo que a modulação observada na agregação não parece estar relacionada à exposição de superfícies hidrofóbicas.

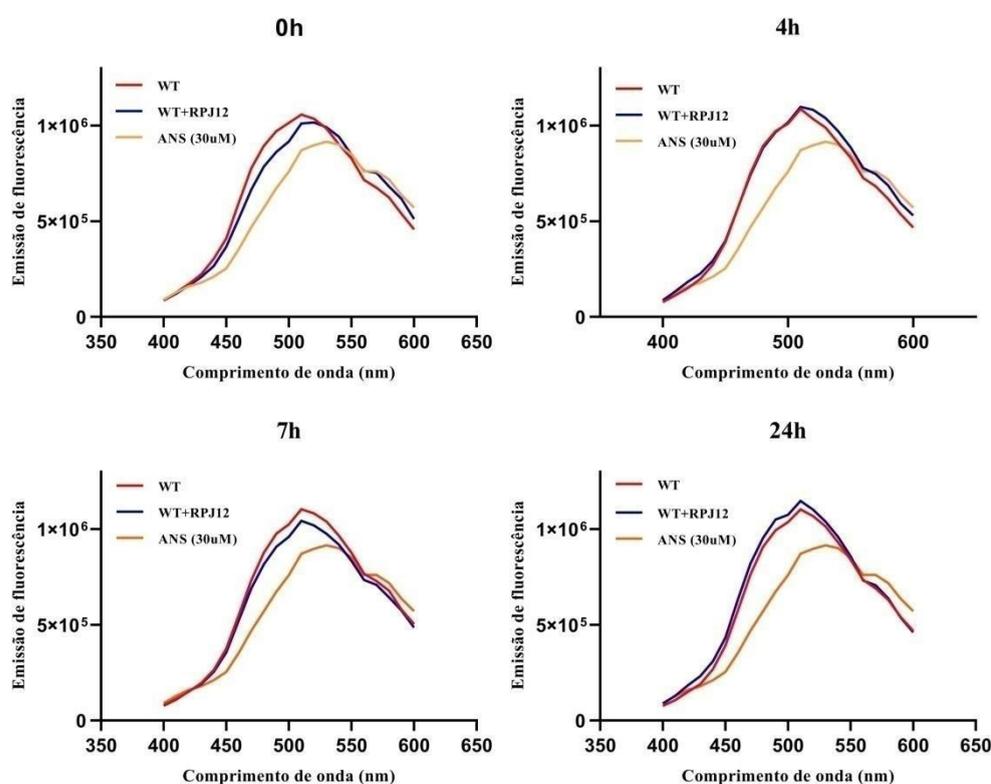


Figura 12: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorado pela sonda ANS. A ligação a sonda ANS na presença (linha azul) e na ausência (linha vermelha) do composto RPJ-12 mostraram que não apresenta variação na área hidrofóbica acessível ao solvente. Intensidade de fluorescência do ANS na presença de proporções molares (1:1) de RPJ-12 em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 7 e 24 horas) da reação de agregação. A sonda ANS foi excitada a 360 nm e os espectros de emissão foram registrados na faixa de comprimento de onda de 400 nm a 600 nm.

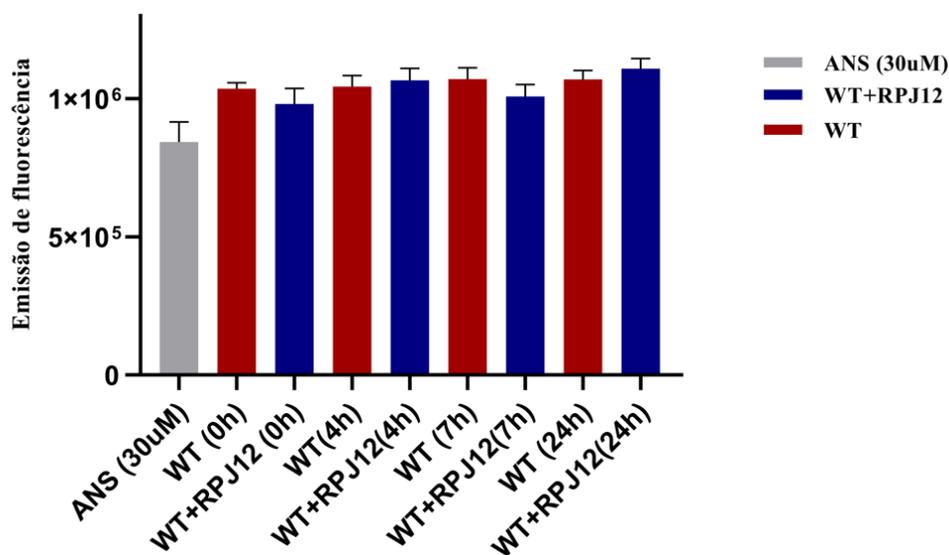


Figura 13: Efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorada pela sonda ANS. A ligação à sonda ANS (barra cinza) na presença (barra azul) e na ausência (barra vermelha) do composto RPJ-12 mostra que não há uma variação de área hidrofóbica acessível ao solvente. Intensidade de fluorescência do ANS na presença de proporções molares (1:1) de RPJ-12 em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 7 e 24 horas) da reação de agregação. A sonda ANS foi excitada a 360 nm e os espectros de emissão foram registrados na faixa de comprimento de onda de 520 nm.

O isômero ANS (1-anilinaftaleno-8-sulfonato) apresenta uma intensidade de fluorescência com o máximo centrado em 520 nm (Jan Slavík, 1982), na Figura 13, observamos o efeito do RPJ-12 na agregação da proteína aS WT monitorado pela sonda ANS, por meio da análise de todas as condições da Figura 12 no mesmo comprimento de onda (520 nm) em todos os intervalos de tempo (0, 4, 7 e 24 horas) da reação de agregação, onde pode ser observado uma pequena diferença na intensidade da sonda ANS na ausência da aS WT e do composto RPJ-12.

4.4. Morfologia dos agregados formados na ausência e presença do RPJ-12

A avaliação da morfologia dos agregados formados em diferentes condições tem se mostrado como uma boa ferramenta para revelar detalhes na modulação da formação amilóide, que muitas vezes não podem ser observados pelas técnicas biofísicas utilizadas para acompanhar agregação *in vitro* (Goldsbury et al., 2011). Para visualização da morfologia dos agregados formados na ausência e presença do composto, foi realizada microscopia eletrônica de Varredura- modo STEM das amostras aS WT incubada em condições de agregação durante 4h, 7h e 24h na ausência e na presença do RPJ-12 na concentração de 70

μM . Esses tempos foram escolhidos para representar as etapas de fase lag, log e de platô, respectivamente.

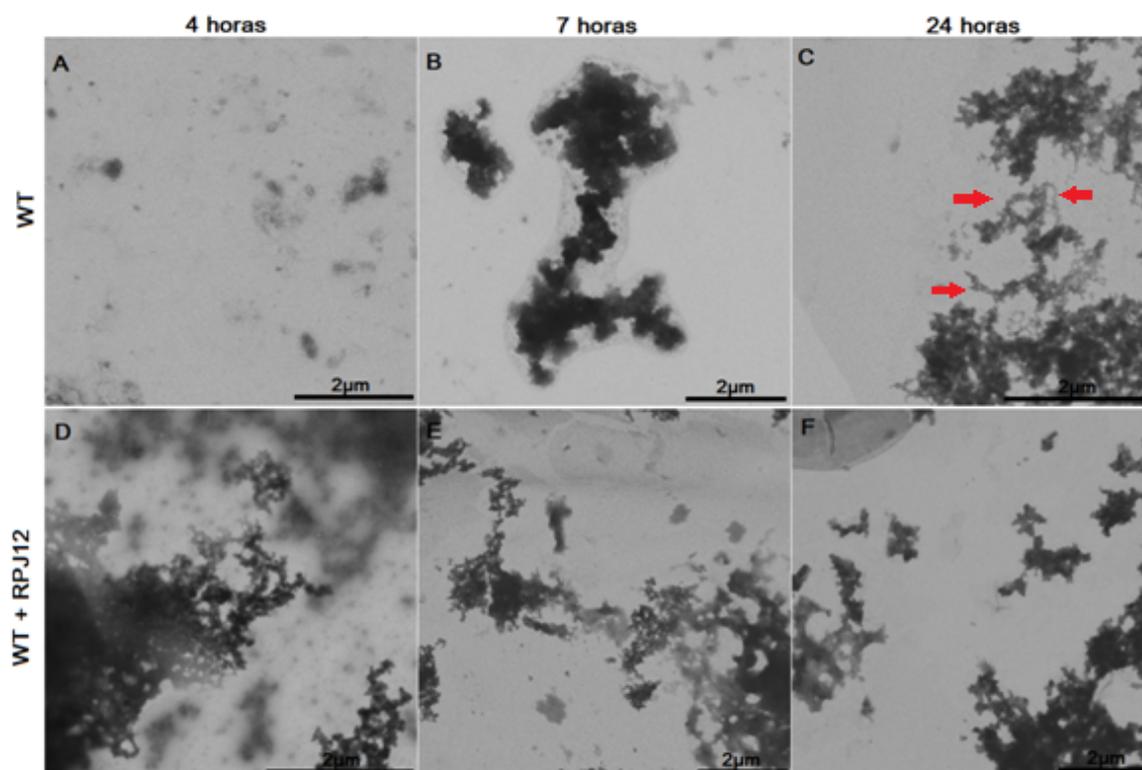


Figura 14: Microscopia eletrônica de Varredura – modo STEM da proteína aS WT na ausência e presença do RPJ-12: MEV-modo STEM da proteína aS após 24 horas de agregação pelo protocolo I de fibrilização. **(A)** WT 70 μM , 4 horas na ausência do composto. **(B)** WT 70 μM , 7 horas na ausência de composto. **(C)** WT 70 μM , 24 horas na ausência de composto, as setas vermelhas mostram uma morfologia mais fibrilar. **(D)** WT na presença do RPJ-12 (1:1), 4 horas. **(E)** WT na presença do RPJ-12 (1:1), 7 horas. **(F)** WT na presença do RPJ-12 (1:1), 24 horas. Barra de escala: 2 μm .

Na figura 14, podemos visualizar a aS WT incubada nas condições de agregação na presença (D, E e F) e na ausência (A, B e C) do composto RPJ-12. Na condição A, B e C (na ausência do composto), a aS apresentou a formação de agregados protéicos bem evidenciados, dentro de 24 horas. Na condição D, E e F (na presença do composto RPJ-12), a aS parece já apresentar agregados a partir de 4h de agregação, até mais rápido do que na ausência do composto RPJ-12. Porém, os agregados observados na presença do composto parecem ser mais amorfos e menos organizados (painéis D, E e F) do que aqueles formados na ausência do composto (painéis A, B e C). Após 24h de agregação da aS WT é possível observar uma morfologia mais fibrilar (setas vermelhas no painel C), que não é evidente quando a aS é incubada pelo mesmo tempo de agregação na presença de RPJ-12 (painel F).

5. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

As doenças neurodegenerativas que estão associadas ao desenovelamento incorreto e agregação de α -sinucleína (aS), incluem a doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy e atrofia de múltiplos sistemas (Khanam et al., 2016). Nestas sinucleinopatias, foi proposto que agregados de aS representam diferentes conformações de aS, levando à autopropagação e transmissão de célula para célula (Okuzumi et. al, 2021). Embora o desenovelamento incorreto e a agregação da aS possam induzir diferentes doenças, a progressão da agregação protéica segue o mesmo modelo cinético de semeadura ou nucleação a partir da formação de uma espécie intermediária solúvel até a formação de protofibrilas e o acúmulo de agregados fibrilares insolúveis. Independente das diferentes conformações, os agregados da proteína aS apresentam várias características físico-químicas em comum, tais como, uma estrutura rica em folhas β , insolubilidade em solventes e detergentes fortes, resistência a proteases e a capacidade de se ligar a corantes específicos de conformação amilóide (como por exemplo a Tioflavina-T) (Nelson et al., 2005) (Dhouafli *et al.*, 2018). Com a finalidade de impedir o desenvolvimento da patogênese em função do acúmulo de agregados tóxicos mal dobrados, uma estratégia promissora e eficaz para a prevenção ou tratamento dos distúrbios de dobramento incorreto de proteínas, é o uso de inibidores da agregação amilóide, com a finalidade de reduzir a toxicidade dos agregados, evitando a formação de novos agregados, ou até mesmo induzindo a eliminação dessas espécies resgatando sua função original. Foi descrito que alguns compostos inibidores da agregação amilóides interagem com agregados amiloidogênicos em diferentes estágios, inibindo, bloqueando ou prejudicando a automontagem ou a agregação amilóide, ou mesmo eliminando agregados já formados (Dhouafli *et al.*, 2018).

Muitos estudos apontam que a maioria das proteínas e peptídeos têm a capacidade de formar agregados com conformações amilóides em condições instáveis adequadas, deste modo, a agregação de proteínas é considerada atualmente, como uma via alternativa ao enovelamento de proteínas, onde as interações intermoleculares são mais beneficiadas do que as intramoleculares (Massimo, 2004). Conseqüentemente é promissora a utilização de pequenas moléculas que alterem a via de nucleação, interrompendo, assim, os contatos intermoleculares específicos com a finalidade de prevenir a formação de agregados tóxicos (LADIWALA; DORDICK; TESSIER, 2011).

Devido à necessidade imediata do desenvolvimento de novos fármacos para tratar, esta doença e os mecanismos de agregação protéica, de forma eficaz, muitos estudos apontam uma promissora classe de compostos heterocíclicos, denominada quinolina, já presente em diversos produtos naturais e sintéticos, conhecida por desempenhar uma gama de funções farmacológicas (Candéa et al., 2009)(Akranth Marella et al., 2013). Os derivados da quinolina possuem diversas atividades farmacológicas já conhecidas, tais como, antiviral, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiobesidade e anti-inflamatória (Robert Musiol et al., 2006), como também atividades contra a Doença de Alzheimer, tendo como mecanismo a inibição da enzima colinesterase, propriedades quelantes de metais, neuroproteção e ação antioxidante (FERNÁNDEZ-BACHILLER et al., 2010).

Conforme os dados obtidos neste estudo, é possível observar que o composto RPJ-12 apresenta um papel na modulação da agregação da proteína aS WT, tendo em vista que promoveu uma alteração no perfil da cinética de agregação amilóide da proteína, modificando o tempo de duração das fases exponencial e estacionária. Porém, não impediu que agregados amorfos fossem formados. Este estudo permitiu observar que:

- O composto reduziu a formação final de espécies amilóides em aproximadamente 80%;
- O composto RPJ12 parece ter modificado a fase lag (fase em que as espécies oligiméricas que dirigem a agregação amilóide são formadas);
- A avaliação da exposição de regiões hidrofóbicas da proteína na presença e na ausência do composto, utilizando a sonda ANS, não apresentou diferenças significativas;
- Os agregados protéicos formados, visualizados através da microscopia eletrônica de Varredura – modo STEM, apresentaram diferenças morfológicas na presença e na ausência do composto RPJ-12, podendo ser observada na ausência do composto estruturas mais fibrilares e bem organizadas e na presença do composto estruturas mais amorfas e desorganizadas;
- Nas estruturas morfológicas visualizadas na presença do composto, foi eliminada a hipótese de serem agregados amiloidogênicos, através da cinética de agregação utilizando a sonda Tioflavina-T, onde há diferença na formação de agregados;

O composto RPJ-12 apresentado neste estudo, parece ser um eficiente candidato na modulação da agregação e na formação de espécies menos tóxicas da proteína aS, e na área de amiloidoses, tendo em vista que mostrou ter um papel promissor. Faz-se necessário o aprofundamento de seus estudos *in vitro e ex vivo*, avaliando a viabilidade celular, a toxicidade relacionada às espécies agregadas na presença deste, a interação do composto com a proteína, e seus mecanismos de ação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akranth Marella, Om Prakash Tanwar, Rikta Saha, Mohammad Rahmat Ali, Sandeep Srivastava, Mymoona Akhter, Mohammad Shaquiquzzaman, Mohammad Mumtaz Alam, Quinoline: A versatile heterocyclic, Saudi Pharmaceutical Journal, Volume 21, Issue 1, 2013.

Alraawi Z, Banerjee N, Mohanty S, Kumar TKS. Amyloidogenesis: What Do We Know So Far? *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 12;23(22):13970. doi: 10.3390/ijms232213970. PMID: 36430450; PMCID: PMC9695042.

AMARAL, H. DE O. Avaliação do efeito neuroprotetor da Occidentalina-1202 sobre o modelo de indução parkinsoniana em camundongos por 6-OHDA. repositorio.unb.br, 15 jul. 2021.

André L.P. Candéa, Marcelle de L. Ferreira, Karla C. Pais, Laura N.de F. Cardoso, Carlos R. Kaiser, Maria das Graças M.de O. Henriques, Maria C.S. Lourenço, Flávio A.F.M. Bezerra, Marcus V.N. de Souza, Synthesis and antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinyldrazones derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 19, Issue 22, 2009.

Ankita R. Rane, Harshad Paithankar, Ramakrishna V. Hosur, Sinjan Choudhary, Modulation of α -synuclein fibrillation by plant metabolites, daidzein, fisetin and scopoletin under physiological conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 182, 2021, Pages 1278-1291, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.071>.

Bajic VP, Salhi A, Lakota K, et al. DES-Amyloidoses "Amyloidoses through the looking-glass": A knowledgebase developed for exploring and linking information related to human amyloid-related diseases. *PLoS One.* 2022;17(7):e0271737. Published 2022 Jul 25. doi:10.1371/journal.pone.0271737

Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G. *et al.* Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4, 2575 (2013).

Braak, Heiko, and Kelly Del Tredici. *Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Parkinson's Disease (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology; 201)*. Springer Berlin Heidelberg, 2009.

Braga et al. (2010). The Anti-Parkinsonian Drug Selegiline Delays the Nucleation Phase of α -Synuclein Aggregation Leading to the Formation of Nontoxic Species. *Journal of Molecular Biology*, 254-273.

Cabreira V, Massano J. Parkinson's Disease: Clinical Review and Update. *Acta Med Port* [Internet]. 1º de outubro de 2019 [citado em 22 de fevereiro de 2023];32(10):661-70. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/11978>

CAI, S. X. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 1,2,3,4-Tetrahydroquinoline-2,3,4-trione 3-Oximes: Novel and Highly Potent Antagonists for NMDA Receptor Glycine Site. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 17, p. 3248–3255, 1 jan. 1996.

CALDEIRA, M. A. B. Proteína α -sinucleína como alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson. *sapientia.ualg.pt*, 13 nov. 2020.

Cardamone M, Puri NK. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem J*. 1992 Mar 1;282 (Pt 2)(Pt 2):589-93. doi: 10.1042/bj2820589. PMID: 1546973; PMCID: PMC1130822.

Casella R, Bigi A, Cremades N, Cecchi C. Effects of oligomer toxicity, fibril toxicity and fibril spreading in synucleinopathies. *Cell Mol Life Sci*. 2022.

Cremades & Dobson. (2017). The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiology of Disease*, 178-190

Cremades et al. (2017). Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 79-143.

Dhouafli, Z., Cuanalo-Contreras, K., Hayouni, EA *et al.* Inibição do dobramento incorreto e agregação de proteínas por compostos fenólicos naturais. *Célula. Mol. Ciência da Vida*. 75 , 3521–3538 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2872-2>.

Dong-Chen, X., Yong, C., Yang, X. *et al.* Vias de sinalização na doença de Parkinson: mecanismos moleculares e intervenções terapêuticas. *Sig Transduct Target Ther* 8 , 73 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01353-3>

Feany, M., Bender, W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398 (2000). <https://doi.org/10.1038/35006074>

Fernández-Bachillerm et al. Novel Tacrine–8-Hydroxyquinoline Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease, with Neuroprotective, Cholinergic, Antioxidant, and Copper-Complexing Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 13, p. 4927–4937, 8 jul. 2010.

FERREIRA, N. C. et al. Anti-Prion Activity of a Panel of Aromatic Chemical Compounds: In Vitro and In Silico Approaches. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e84531, 6 jan. 2014.

Follmer et al. (2013). α -Synuclein as an intrinsically disorderED monomer – fact or artefact? *FEBS Journal*, 4915-4927.

Franssens, V., Boelen, E., Anandhakumar, J. *et al.* Yeast unfolds the road map toward α -synuclein-induced cell death. *Cell Death Differ* 17, 746–753 (2010). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.203>

Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*. 2017;10(5):499-502. doi:10.1242/dmm.030205

Hena Khanam, Abad Ali, Mohd Asif, Shamsuzzaman, Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 124, 2016.

Jan, A. et al. The Prion-Like Spreading of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: Update on Models and Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 15, p. 8338, 3 ago. 2021.

Ke, Pu Chun et. al, Half a century of amyloids: past, present and future, *Chemical Society Reviews*, The Royal Society of Chemistry, Volume 49, 2022; doi: 10.1039/C9CS00199A.

Kelvin C. Luk et al., Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science* 338,949-953(2012).DOI:10.1126/science.1227157

Kordower, J., Chu, Y., Hauser, R. *et al.* Lewy body–like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14, 504–506 (2008). <https://doi.org/10.1038/nm1747>

LADIWALA, A. R. A.; DORDICK, J. S.; TESSIER, P. M. Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 5, p. 3209–3218, fev. 2011.

Leonid Breydo, Jessica W. Wu, Vladimir N. Uversky, α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1822, Issue 2, 2012.

LeVine. (1999). Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods in enzymology*, 274-284.

Li, JY., Englund, E., Holton, J. *et al.* Corpos de Lewy em neurônios enxertados em indivíduos com doença de Parkinson sugerem propagação da doença do hospedeiro para o enxerto. *Nat Med* 14 , 501–503 (2008). <https://doi.org/10.1038/nm1746>

Lião, YZ., Ma, J. & Dou, JZ. O papel do TDP-43 na doença neurodegenerativa. *Mol Neurobiol* 59 , 4223-4241 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02847-x>.

Ling Ling, Fangfang Wang & Duonan Yu. Beyond neurodegenerative diseases: α -synuclein in erythropoiesis, *Hematology*. 2022.

Liu, X., Shao, R., Li, M. *et al.* Edaravone Protects Neurons in the Rat Substantia Nigra Against 6-Hydroxydopamine-Induced Oxidative Stress Damage. *Cell Biochem Biophys* 70, 1247–1254 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0048-8>.

Logroscino G, Urso D, Savica R. Descriptive Epidemiology of Neurodegenerative Diseases: What Are the Critical Questions? *Neuroepidemiology*. 2022; doi: 10.1159/000525639.

Massano J, Bhatia KP. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012.

Massimo Stefani, Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1739, Issue 1, 2004, Pages 5-25, ISSN 0925-4439, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.004>.

Merrill D. Benson, Joel N. Buxbaum, David S. Eisenberg, Giampaolo Merlini, Maria J. M. Saraiva, Yoshiki Sekijima, Jean D. Sipe & Per Westermark (2020) Amyloid nomenclature

2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee, *Amyloid*, 27:4, 217-222, DOI: 10.1080/13506129.2020.1835263

Mitsuharu Ueda, Transthyretin: Its function and amyloid formation, *Neurochemistry International*, Volume 155, 2022, 105313, ISSN 0197-0186, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105313>.

Nelson, R., Sawaya, M., Balbirnie, M. *et al.* Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773–778 (2005). <https://doi.org/10.1038/nature03680>

Nwabufo CK, Aigbogun OP. Diagnostic and therapeutic agents that target alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2022 Nov;269(11):5762-5786. doi: 10.1007/s00415-022-11267-9. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35831620; PMCID: PMC9281355.

Parihar, A., Parihar, P., Solanki, I., Parihar, M.S. (2019). Alpha Synuclein and Parkinson's Disease. In: Singh, S., Joshi, N. (eds) *Pathology, Prevention and Therapeutics of Neurodegenerative Disease*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0944-1_1

RANJBAR, S. *et al.* Studies of the Interaction between Isoimperatorin and Human Serum Albumin by Multispectroscopic Method: Identification of Possible Binding Site of the Compound Using Esterase Activity of the Protein. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-13, Sept. 2013.

Robert Musiol, Josef Jampilek, Vladimir Buchta, Luis Silva, Halina Niedbala, Barbara Podeszwa, Anna Palka, Katarzyna Majerz-Maniecka, Barbara Oleksyn, Jaroslaw Polanski, Antifungal properties of new series of quinoline derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 14, Issue 10, 2006.

Rong Chen, Xuan Gu, Xiaoying Wang, α -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection, *Clinica Chimica Acta*, Volume 529, 2022.

Sandoval-Pistorius, S.S., Gerson, J.E., Liggans, N. *et al.* Ubiquilin-2 regulates pathological alpha-synuclein. *Sci Rep* 13, 293 (2023)

Sedov I, Khaibrakhmanova D. Molecular Mechanisms of Inhibition of Protein Amyloid Fibril Formation: Evidence and Perspectives Based on Kinetic Models. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13428. Published 2022 Nov 3. doi:10.3390/ijms232113428

Sheikh, Saba, Safia, Haque, Ejazul, Mir, Snober S. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions: Journal of Neurodegenerative Diseases - Hindawi Publishing Corporation. 2013; doi: 10.1155/2013/563481.

SILVA, Isabella Miranda da. Interação In vitro entre compostos orgânicos de Arsênio(V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

Spillantini, M., Schmidt, M., Lee, VY. *et al.* α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840 (1997). <https://doi.org/10.1038/42166>

Tomoki Kuwahara, Akihiko Koyama, Keiko Gengyo-Ando, Mayumi Masuda, Hisatomo Kowa, Makoto Tsunoda, Shohei Mitani, Takeshi Iwatsubo, Familial Parkinson Mutant α -Synuclein Causes Dopamine Neuron Dysfunction in Transgenic *Caenorhabditis elegans**, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 281, Issue 1, 2006.

VILLAR-PIQUÉ, A.; LOPES DA FONSECA, T.; OUTEIRO, T. F. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, p. 240–255, 11 set. 2015.

Wouter Peelaerts, Tiago F. Outeiro, Chapter 2 - Synuclein misfolding as a therapeutic target, Editor(s): Veerle Baekelandt, Evy Lobbstaël, *Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders*, Academic Press, 2017, Pages 21-47, ISBN 9780128051207, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805120-7.00002-6>.

Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol*. 2001;54(6):414-418.

Zhang, S., Zhu, R., Pan, B. *et al.* Post-translational modifications of soluble α -synuclein regulate the amplification of pathological α -synuclein. *Nat Neurosci* 26, 213–225 (2023).