

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

LOUISE OLIVEIRA FIAMETTI

Síntese, caracterização e avaliação de peptídeos intracelulares no sistema nervoso central de zebrafish (*Danio rerio*) em um modelo de Doença de Parkinson

Araraquara
2025

LOUISE OLIVEIRA FIAMETTI

Síntese, caracterização e avaliação de peptídeos intracelulares no sistema nervoso central de zebrafish (*Danio rerio*) em um modelo de Doença de Parkinson

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Coorientador(a): Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Araraquara

2025

-
- F439s** Fiametti, Louise Oliveira.
Síntese, caracterização e avaliação de peptídeos intracelulares no sistema nervoso central de zebrafish (Danio rerio) em um modelo de Doença de Parkinson / Louise Oliveira Fiametti. – Araraquara, 2025. 68 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Biotecnologia.
- Orientador: Norival Alves Santos Filho.
Coorientador: Leandro Mantovani de Castro.
1. Doença de Parkinson. 2. Peptídeos. 3. Síntese de peptídeos. 4. Zebrafish. 5. Desenvolvimento de novos medicamentos. I. Santos Filho, Norival Alves, orient. II. Castro, Leandro Mantovani de, coorient. III. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, contudo sua etiologia permanece desconhecida. Os principais sintomas incluem tremores, dificuldade de fala e deglutição, dificuldade de locomoção, depressão, ansiedade, dentre outros que afetam diretamente a qualidade de vida do paciente. Os tratamentos disponíveis buscam desacelerar o avanço dos sintomas, não existindo cura. Neste contexto, esta dissertação busca compreender o papel de cinco peptídeos que, em uma pesquisa anterior, demonstraram ter papel biológico na doença de Parkinson, complementando o conhecimento já existente a respeito desta doença e possivelmente desenvolvendo um tratamento mais eficaz.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in the world, but its etiology remains unknown. The main symptoms include tremors, difficulty speaking and swallowing, difficulty moving, depression, anxiety, among others that directly affect the patient's quality of life. Available treatments aim to slow the progression of symptoms, but there is no cure. In this context, this dissertation seeks to understand the role of five peptides that, in previous research, have been shown to have a biological role in Parkinson's disease, complementing the existing knowledge about this disease and possibly developing a more effective treatment.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Síntese, caracterização e avaliação de peptídeos intracelulares no sistema nervoso central de zebrafish (*Danio rerio*) em um modelo de Doença de Parkinson

AUTORA: LOUISE OLIVEIRA FIAMETTI

ORIENTADOR: NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

COORIENTADOR: LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. FLAVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Anatomia / Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Profa. Dra. VALERIA VALENTE (Participação Virtual)
Departamento de Análise Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 20 de março de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, aos Orixás e à espiritualidade de luz que me guia e me ampara em cada passo que dou.

Ao Nero, que hoje me acompanha em outro plano, mas que foi quem me trouxe de volta ao mundo acadêmico.

À minha mãe que não só me trouxe a esse mundo, como também me apoiou de todas as formas ao longo da minha caminhada acadêmica.

Ao meu marido Pedro, por não me deixar desistir nem esquecer do valor do meu trabalho. Por me acalmar nos momentos de ansiedade, me consolar nos momentos de tristeza e me lembrar de que, no fim, tudo acaba bem.

Ao Professor Leandro Mantovani de Castro, que me coorientou durante o mestrado e com quem dei meus primeiros passos no mundo da pesquisa. Sem o senhor, este trabalho não existiria.

Ao Professor Norival Alves Santos Filho, que abriu as portas para mim e para este trabalho. Obrigada pela orientação, pelas conversas e pelos mais diversos aprendizados vividos nesses dois anos de mestrado.

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

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio dos Processos #2023/05219-2 e #2023/12077-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ora ieieô! Ogum iê!

RESUMO

A doença de Parkinson é a segunda enfermidade neurodegenerativa mais comum no mundo, mas apesar do destaque em pesquisas recentes sua causa permanece desconhecida, não existe cura e os tratamentos disponíveis visam apenas o controle dos sintomas. Poucos estudos se concentram no papel de peptídeos na doença de Parkinson, que comprovadamente possuem função biológica em outras doenças neurodegenerativas. Um estudo prévio demonstrou que 9 de 118 peptídeos de cérebro de zebrafish apresentaram alteração em um modelo de 6-hidroxidopamina, neurotoxina mais comumente utilizada em estudos da doença. Neste contexto, este projeto de Mestrado visa compreender melhor o papel de 5 destes 9 peptídeos. A escolha dos peptídeos foi feita com base em suas proteínas precursoras, sendo elas: 1) Proteína de ácido graxo 7 (FABP7), que tem relação com a expressão de enzimas antioxidantes e proteção contra sinalização de apoptose; 2) Proteína ribossomal mitocondrial S36, que na literatura está relacionada à geração de NADH na respiração aeróbica, cuja redução tem correlação com doenças neurodegenerativas; 3) Proteína 1-B relacionada à MARCKS, que controla o movimento celular por meio da regulação do citoesqueleto de actina, entre outras funções; 4) Transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT2 - *Excitatory Amino Acido Transporter 2*), proteína com papel essencial na reciclagem de glutamato, o neurotransmissor mais abundante no cérebro de mamíferos; e 5) Timosina beta-4 (Tbeta4), peptídeo de 43 aminoácidos cuja principal função é regular a polimerização de actina, que é necessária para a organogênese e motilidade celular. Os peptídeos foram sintetizados quimicamente em fase sólida e caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. Foi realizada a espectroscopia de dicroísmo circular. Ensaio de viabilidade celular por MTT foram feitos em linhagens neuronais de camundongo (Neuro 2A) e humano (SHSY5Y). Ensaio de embriotoxicidade e comportamentais foram realizados com larvas de zebrafish wildtype, tal qual a quantificação de fluorescência de neurônios dopaminérgicos por meio de imunofluorescência. A linhagem transgênica de zebrafish Tg(*Huc:gfp/NeuroD:rfp*) foi usada para avaliar a integridade neuronal total. Os resultados indicam que o modelo transgênico e a imunofluorescência não foram os ideais para avaliar os danos causados pela 6-hidroxidopamina, nem os possíveis danos ou reparos dos peptídeos. Apesar disso, os resultados do ensaio de viabilidade celular mostram que nenhum dos cinco peptídeos apresentam citotoxicidade até a concentração de 512 μ M. O ensaio comportamental indica que todos os peptídeos avaliados auxiliam na recuperação de movimento, e três peptídeos apresentaram resultados estatisticamente iguais aos do grupo controle, o que aponta para uma recuperação total do movimento. Mais estudos são necessários para compreender melhor o mecanismo de ação destes peptídeos e se eles são realmente um potencial aliado contra a doença de Parkinson.

Palavras-chave: doença de Parkinson; peptídeos; síntese de peptídeos; zebrafish; desenvolvimento de novos medicamentos.

ABSTRACT

Even though Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease worldwide, its cause remains unknown, there is no cure and all different treatment strategies available are able to only control the symptoms. Few studies focus on the role of peptides in Parkinson's disease, which have been shown to have biological function in other neurodegenerative diseases. A previous study demonstrated that 9 out of 118 zebrafish brain peptides presented alterations in a 6-hydroxydopamine model, the most commonly used neurotoxin in studies of this disease. In this context, this Master's project aims to better understand the role of 5 of these 9 peptides. The choice of peptides was made based on their precursor proteins, which are: 1) Fatty acid binding protein 7 (FABP7), which is related to the expression of antioxidant enzymes and protection against apoptosis signaling; 2) Mitochondrial ribosomal protein S36, which literature shows that is related to the generation of NADH in aerobic respiration, whose reduction is correlated with neurodegenerative diseases; 3) MARCKS-related protein 1-B, which controls cell movement through the regulation of actin cytoskeleton, among other functions; 4) Excitatory amino acid transporter 2 (EEAT2), a protein with an essential role in the recycling of glutamine, the most abundant neurotransmitter in the mammalian brain; and 5), Thymosin beta-4 (Tbeta4), a 43-amino acid peptide whose main function is to regulate actin polymerization, which is necessary for organogenesis and cell motility. The peptides were chemically synthesized in solid phase and characterized by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. Circular dichroism was performed in order to define the secondary structure of each peptide. MTT cell viability assays were performed in mouse (Neuro 2A) and human (SHSY5Y) neuronal lines. Embryotoxicity and behavioral assays were performed with wildtype zebrafish larvae. The quantification of dopaminergic neuron fluorescence by immunofluorescence was made using ImageJ. The transgenic zebrafish line TG(*Huc:gfp/NeuroD:rfp*) was used to evaluate total neuronal integrity. The results indicate that the transgenic model and immunofluorescence were not ideal to evaluate the damage caused by 6-hydroxydopamine, nor the possible damage or repair caused by treatment with the peptides. Despite this, the results of the cell viability assay show that none of the five peptides present cytotoxicity up to the concentration of 512 μ M. The behavioral assay indicates that all the peptides have a role in the recovery of movement. Three peptides presented results statistically equal to those of the control group, which points to a full recovery of movement. Further studies are needed to better understand the mechanism of action of these peptides and whether they are truly a potential ally against Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease; peptides; peptide synthesis; zebrafish; new drugs development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatogramas das frações brutas e puras, respectivamente, dos peptídeos	33
Figura 2 - Cromatogramas das frações brutas e puras dos peptídeos acoplados à Rodamina-B	35
Figura 3 - Espectros de massas dos peptídeos sintetizados	37
Figura 4 - Espectros de massas referente aos peptídeos acoplados à Rodamina-B	38
Figura 5 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos sintetizados	39
Figura 6 - Viabilidade celular (%) de células Neuro 2A tratadas em diferentes concentrações	40
Figura 7 - Viabilidade celular (%) de células SHSY5Y tratadas em diferentes concentrações de dos peptídeos	41
Figura 8 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μ M e 100 μ M a 24 hp	46
Figura 9 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μ M e 100 μ M a 48 hpf	46
Figura 10 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μ M e 100 μ M a 72 hpf	47
Figura 11 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μ M e 100 μ M a 96 hpf	47
Figura 12 - Imagens demonstrativas de embriões transgênicos Tg(<i>HuC:gfp/NeuroD:rfp</i>)	48
Figura 13 - Fluorescência média de NeuroD em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos	49

Figura 14 - Fluorescência média de HuC em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos	49
Figura 15 - Imagens demonstrativas de imunofluorescência de embriões <i>wildtype</i>	50
Figura 16 - Imunofluorescência de anti-tirosina hidroxilase em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos acoplados à Rodamina-B	51
Figura 17 - Fluorescência de Rodamina-B em embriões tratados com os peptídeos acoplados à Rodamina-B	52
Figura 18 - Imagens demonstrativas da região do telencéfalo de <i>D. rerio</i> tratadas com imunofluorescência anti-tirosina hidroxilase	52
Figura 19 - Velocidade média de zebrafish selvagem tratado com 6-OHDA 750 μ M, seguido por cada peptídeo em diferentes concentrações	53
Figura 20 - Distância total nadada por zebrafish selvagem tratado com 6-OHDA 750 μ M, seguido por cada peptídeo em diferentes concentrações	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos e respectivas proteínas precursoras	22
Tabela 2 - Resinas, graus de substituição, escalas e excesso utilizados para cada sequência	25
Tabela 3 - Método de clivagem de acordo com catálogo Novabiochem (2014)	25
Tabela 4 - Protocolo de purificação de cada peptídeo	26
Tabela 5 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos sintetizados	32
Tabela 6 - Características de toxicidade e letalidade de cada concentração de peptídeo observada no ensaio de embriotoxicidade	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DC	Dicroísmo circular
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DMEM	meio de cultura celular Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	meio de cultura celular em proporção 1:1 de Dulbecco's Modified Eagle Medium e meio Ham's F12
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	doença de Parkinson
dpf	dias após fertilização (<i>days post fertilization</i>)
EDODT	2,2'-(Etilenedioxi)dietanetriol
EDTA	Ácido etilnodiamino tetra-acético
EEAT2	Transportador de aminoácido excitatório 2 (<i>Excitatory Amino ACid Transporter 2</i>)
FABP3	Proteína de ligação de ácido graxo 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i>)
FABP7	Proteína de ligação de ácido graxo 7 (<i>Fatty Acid Binding Protein 7</i>)
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
hpf	horas após fertilização (<i>hours post fertilization</i>)
LC ₅₀	Concentração letal 50%

MARCKS1B	Proteína 1-B do substrato C quinase rico em alanina miristoilada (<i>Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate protein 1B</i>)
MRPS36	Proteína ribossomal mitocondrial S36 (<i>Mitochondrial Ribosomal Protein S36</i>)
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-,5-difeniltetrazólio
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
p-EEAT2	peptídeo derivado do Transportador de aminoácido excitatório 2, correspondente à sequência HESHLEPIE
p-EEAT2-R	sequência HESHLEPIE acoplada à Rodamina-B em seu N-terminal
p-FABP7	peptídeo derivado da Proteína de ligação de ácido graxo 7, correspondente à sequência GVGFATRQV
p-FABP7-R	sequência GVGFATRQV acoplada à Rodamina-B em seu N-terminal
p-MARCKS1B	peptídeo derivado da Proteína 1-B do substrato C quinase rico em alanina miristoilada, correspondente à sequência TKQTEETNSTPAPSEQKE
p-MARCKS1B-R	sequência TKQTEETNSTPAPSEQKE acoplada à Rodamina-B em seu N-terminal

p-MRPS36	peptídeo derivado da proteína ribossomal mitocondrial S36, correspondente à sequência TLDLNEMDYIQRGGPE
p-MRPS36-R	sequência TLDLNEMDYIQRGGPE acoplada à Rodamina-B em seu N-terminal
p-Tbeta4	peptídeo derivado da Timosina beta-4, correspondente à sequência TIEQEKQAGSS
p-Tbeta4-R	sequência TIEQEKQAGSS acoplada à Rodamina-B em seu N-terminal
SFB	Soro fetabl bovino
Tbeta4	Timosina beta 4
TIS	Triisopropilsilano
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	Trifluoretanol

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alanina
D	Aspartato
E	Glutamato
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
Y	Tirosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	23
3	MÉTODOS	24
3.1.	Síntese química dos peptídeos	24
3.2.	Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)	26
3.3.	Espectrometria de Massas	27
3.4.	Dicroísmo circular	27
3.5.	Ensaio de viabilidade celular por MTT	28
3.6.	Condicionamento de Danio rerio	28
3.7.	Ensaio de Embriotoxicidade em Zebrafish (FET Test)	29
3.8.	Tratamento com 6-OHDA e peptídeos nas larvas de Danio rerio	30
3.9.	Análise de integridade neuronal total	30
3.10.	Análise de integridade de neurônios dopaminérgicos	31
3.11.	Imagens de microscopia confocal	31
3.12.	Análise comportamental	31
4	RESULTADOS	32
4.1.	Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados	32
4.2.	Espectrometria de massas	36
4.3.	Dicroísmo circular	38
4.4.	Ensaio de viabilidade celular por MTT	39
4.5.	Ensaio de Embriotoxicidade em Zebrafish (FET Test)	41
4.6.	Análise de integridade neuronal total	47
4.7.	Análise de integridade de neurônios dopaminérgicos	49
4.8.	Ensaio comportamental de Danio rerio	51
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda enfermidade neurodegenerativa mais comum mundialmente, ficando atrás apenas para a doença de Alzheimer. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mortes devido à DP estão aumentando mais rapidamente do que para qualquer outro distúrbio neurológico. Ainda de acordo com dados da OMS, nos últimos 25 anos o número de portadores da DP dobrou, chegando a 8,5 milhões de pessoas em 2019, sendo a causa de 329.000 mortes (WHO, 2022).

Patologicamente, a doença se caracteriza pela disfunção ou morte de neurônios dopaminérgicos, pelo acúmulo de α -sinucleína em agregados intracitoplasmáticos chamados corpos de Lewy, e por neuritos de Lewy, que são neurônios anormais com filamentos e material granular também positivos para α -sinucleína. Essas inclusões neuronais levam a outras anormalidades como organelas dismórficas, em especial as mitocôndrias (Shahmoradian *et al.*, 2019). Os primeiros indicativos, que muitas vezes se iniciam até 10 anos antes do diagnóstico, incluem constipação, distúrbios de sono e dor assimétrica nos ombros (Armstrong; Okun, 2020). Os sintomas motores, que incluem tremores, dificuldade de fala e locomoção, dificuldade de deglutição, entre outros, são os mais facilmente notados e essenciais para o diagnóstico. Contudo, o espectro clínico engloba também sintomas não-motores como depressão, ansiedade e declínio cognitivo, que se somam às dificuldades do paciente (García *et al.*, 2019). Assim como em outras doenças neurodegenerativas, o declínio do quadro do paciente tende a se prolongar ao longo de décadas. Ainda não existem exames ou testes diagnósticos, que geralmente acontece pela presença de lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia), rigidez das articulações e pelo menos mais dois critérios de suporte positivos, como boa resposta a levodopa e tremor de repouso (Bloem *et al.*, 2021).

A etiologia da DP ainda é desconhecida, mas na literatura atual vemos um consenso de que o desenvolvimento da doença depende da combinação de fatores genéticos com fatores ambientais. Formas genéticas da DP costumam se desenvolver precocemente, em pacientes próximos aos 40 anos, e estão relacionadas a mutações nos genes *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1* e/ou *GBA* (Bloem *et al.*, 2021). Já os fatores ambientais são mais desafiadores de traçar e envolvem

não só a exposição a determinado componente, mas também o estilo de vida do paciente. A exposição a herbicidas e pesticidas tem se mostrado importante no desenvolvimento da doença (Macchi *et al.*, 2020). Alguns estudos indicam que lesões cerebrais traumáticas podem também ser um fator de risco (Camacho-Soto *et al.*, 2017; Mackay *et al.*, 2019). Fatores que a princípio dificultam o desenvolvimento da doença são ingestão regular de café, uso de medicamentos anti-inflamatórios e prática de atividade física, mas todos requerem estudos mais aprofundados para compreender se realmente existe esta relação negativa (Bloem *et al.*, 2021).

Em relação ao tratamento, atualmente existem estratégias que visam controlar e desacelerar a progressão dos sintomas, não existindo cura para a DP. O tratamento completo envolve mudanças de estilo de vida e acompanhamento com uma equipe multidisciplinar contendo médico e enfermeiro especialistas, fisioterapeuta, fonoaudiólogo, terapeuta ocupacional, dentre vários outros profissionais. O apoio e auxílio de familiares também é bastante importante para o paciente (Bloem *et al.*, 2021). Algumas intervenções não medicamentosas com relatos positivos consistentes na literatura são fisioterapia (Okada *et al.*, 2021) e prática regular de atividade física aeróbica (Rodríguez *et al.*, 2020). O estilo de vida mais saudável, que inclua uma rotina de exercício físico e dieta balanceada, será um complemento à intervenção medicamentosa escolhida. Medicamentos disponíveis hoje agem em um de quatro sítios ativos, sendo eles de dopamina, serotonina e norepinefrina, acetilcolina ou glutamato e adenosina (Bloem *et al.*, 2021). Todavia, a adesão por pacientes costuma ser baixa por conta dos diversos efeitos colaterais que incluem náusea, ortostatismo e narcolepsia (Armstrong; Okun, 2020).

A levodopa, medicamento inserido no mercado em 1960, ainda é o que apresenta melhora mais significativa dos sintomas motores, contudo é um medicamento com alguns desafios. A dificuldade de absorção e biodisponibilidade foi contornada após o desenvolvimento de diferentes formas de administração, mas é uma droga dose-dependente, ou seja, conforme o quadro do paciente avança, é necessário aumentar a dose administrada. Isso é importante já que seu uso a longo prazo em altas doses pode piorar os movimentos musculares involuntários e descontrolados (discinesia) (Jost *et al.*, 2023). Logo, é essencial compreender melhor a doença e desenvolver tratamentos mais eficazes.

Buscando ampliar as informações acerca da DP e uma possível cura, diversos estudos têm sido realizados pela indução da DP em modelos animais, seja por drogas, neurotoxinas naturais ou sintéticas ou com mutações *in vivo*. Cada modelo conta com vantagens e desvantagens que devem ser consideradas. Existe uma grande variedade de modelos transgênicos, em especial em camundongos, mas todos alteram o desenvolvimento do animal ou levam anos para iniciar o processo neurodegenerativo. Já a indução por drogas, como pela reserpina, por exemplo, causa um fenótipo com poucos sintomas motores, o que dificulta seu uso para observação comportamental. O mesmo acontece com a rotenona, herbicida e pesticida natural que pode ser usada em *C. elegans*, *Drosophila* e roedores. A neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) também pode ser administrada em uma variedade de animais, contudo em animais não primatas a administração deve ser em doses altas e frequentes (Dovonou *et al.*, 2023).

Um modelo bastante utilizado é o da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), neurotoxina que, apesar de semelhante à dopamina, tem uma hidroxila adicional em sua estrutura que a torna tóxica aos neurônios dopaminérgicos (Ungerstedt, 1968; Hernandez-Baltazar *et al.*, 2017). A 6-OHDA é transferida através do transportador de dopamina e do transportador de recaptção de noradrenalina, exercendo efeitos citotóxicos tanto por produção de radicais livres quanto por inibição direta do Complexo Mitocondrial I na cadeia respiratória (Dovonou *et al.*, 2023). Contudo, esta neurotoxina não atravessa a barreira hematoencefálica, o que torna necessária a aplicação de uma injeção intracerebral, podendo ser intracisternal, intraventricular ou diretamente no parênquima cerebral (Hernandez-Baltazar, 2017). É possível aplicar esta injeção em pequenos peixes vertebrados como, por exemplo, o zebrafish (*Danio rerio*).

Este pequeno peixe teleósteo tem ganhado espaço como modelo alternativo em pesquisas em diversas áreas, inclusive em estudos sobre doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Doyle; Croll, 2022). Diferentes partes do cérebro de zebrafish são comparáveis ao humano e, de forma geral, se organizam de forma similar. Também é possível relacionar comportamentos e fenótipos entre as espécies. Por exemplo, modelos de DP induzidos por neurotoxina geram mudanças comportamentais como menor velocidade de nado e nado anormal, o que pode ser comparado com sintomas de bradicinesia em pacientes de DP (Hughes *et al.*, 2020). Em relação a fatores genéticos, 70% do seu genoma é similar ao do humano,

podendo chegar a 85% quando considerados apenas os genes envolvidos em doenças (Razali *et al.*, 2021).

Para a neurociência em especial, o uso do zebrafish como modelo tem permitido correlacionar processos fisiológicos e respostas comportamentais com vias moleculares ou cascatas de sinalização subjacentes, permitindo maior compreensão a respeito dos mecanismos de homeostase do sistema nervoso central, assim como processos patológicos, como no caso de doenças neurodegenerativas (Chia *et al.*, 2022). Além do mais, o uso do zebrafish se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos graças ao aperfeiçoamento e padronização do modelo em estudos envolvendo variados repertórios comportamentais na área da neuropsiquiatria (Fontana *et al.*, 2018).

Embora existam diversos estudos que utilizam o zebrafish como modelo, poucas pesquisas têm se atentado aos peptídeos gerados durante o metabolismo proteico, que é essencial na manutenção do funcionamento ótimo celular. Quando ocorre uma falha na rede de chaperonas, por exemplo, que é responsável por reconhecer e auxiliar no enovelamento adequado de proteínas mal dobradas ou danificadas, as proteínas mal formadas podem ser degradadas pelo Sistema Ubiquitina-Proteassomo (Behl *et al.*, 2022) ou através do sistema de autofagia lisossomal (Nixon; Rubinsztein, 2024). O mal funcionamento desta função do proteassomo pode ser a causa ou a consequência da agregação de proteínas, processo chave para a maioria das doenças neurodegenerativas (Tsoi *et al.*, 2023). A inibição da proteína chaperona, proteassomo ou da função autofágica, por exemplo, causa o acúmulo de α -sinucleína, molécula encontrada nos corpos de Lewy (Sahoo *et al.*, 2022).

Devido ao avanço de técnicas de análise molecular como a espectrometria de massas, é possível sequenciar um grande número de peptídeos provenientes de misturas complexas sem a necessidade de isolar e analisar individualmente os peptídeos (Shrader; Fricker, 2024). Neste contexto, Fiametti *et al.* (2021) compararam o perfil peptídico do cérebro de zebrafish de dois grupos: o grupo controle, que recebeu injeção intracerebral de solução salina, e o grupo modelo de DP, que recebeu injeção intracerebral de 6-OHDA. Três dias após a injeção os animais foram eutanasiados, levados ao microondas para inibir a ação de protease pós-morte, e os cérebros foram dissecados. Para a peptidômica, foram feitos pools de cérebros onde os referentes ao grupo controle foram marcados com marcador

isotópico leve ($\text{CH}_2\text{O} + \text{NaBH}_3\text{CN}$), e os do grupo 6-OHDA foram marcados com marcador isotópico pesado ($\text{CD}_2\text{O} + \text{NaBD}_3\text{CN}$). Dessa forma, é possível visualizar os dois grupos em uma única corrida de espectrometria de massas, facilitando a comparação entre os grupos. Fiametti e colaboradores (2021) identificaram que 9 de 118 peptídeos identificados no cérebro de zebrafish sofrem alteração significativa neste modelo de neurodegeneração com 6-OHDA, sugerindo que os peptídeos intracelulares têm significado biológico na DP. Contudo, o papel destes peptídeos na DP ainda não é compreendido.

Desta forma, esta dissertação teve como objetivo investigar como 5 dos 9 peptídeos alterados no estudo de Fiametti *et al.* (2021) atuam na doença de Parkinson, analisando a possível ação neuroprotetora ou citotóxica dessas moléculas utilizando larvas de zebrafish e 6-OHDA como modelo. A neurotoxina 6-OHDA foi escolhida por ser um modelo bem estabelecido em zebrafish (Fiametti *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2023; Romero *et al.*, 2024). O zebrafish adulto apresenta algumas vantagens de utilização, como a facilidade de manuseio, baixo custo de manutenção, alta taxa de reprodução e ovos fecundados, entre outras. No entanto, as larvas de zebrafish apresentam além dessas vantagens, o diferencial de ser translúcida. Isso possibilita uma série de técnicas e análises *in vivo*, como a visualização da absorção de peptídeos conjugados com fluoróforos, por exemplo, que consta na presente proposta. Outra vantagem da larva de *D. rerio* em relação ao adulto é que sua barreira hematoencefálica se desenvolve apenas no 5º dpf (*days post fertilization* - dias após fertilização), o que dispensa a necessidade da injeção intracerebral com a 6-OHDA (Vaz *et al.*, 2019). A escolha dos peptídeos foi baseada em suas proteínas precursoras, sendo todas envolvidas em funções neuronais ou em processos neurodegenerativos.

Uma das alterações observadas por Fiametti *et al.* (2021), o peptídeo GVGFATRQV (p-FABP7), derivado da proteína de ligação de ácido graxo 7 (FABP7), apresentou um aumento (razão média 6-OHDA/Salina igual a 4,07) no grupo tratado com 6-hidroxidopamina. Islam *et al.* (2019) demonstraram que a FABP7 aumentada eleva a expressão de enzimas antioxidantes e protege contra a sinalização de apoptose. Gerstner *et al.* (2023) demonstraram que a deficiência de FABP7 causa anormalidades na morfologia neuronal dendrítica, afetando também funções sinápticas excitatórias. Islam *et al.* (2019) também demonstrou que outra proteína

desta família, a proteína de ligação de ácido graxo 3 (FABP3), é crítica para a absorção de α -sinucleína em neurônios dopaminérgicos e aumento da propagação de α -sinucleína, molécula encontrada nos corpos de Lewy (Bloem *et al.*, 2021).

Outra alteração interessante demonstrada por Fiametti *et al.* (2021) foi a diminuição do peptídeo TLNEMDYIQRGGPE (p-MRPS36) (razão média 6-OHDA/Salina igual a 0,53), derivado da proteína ribossomal mitocondrial S36 (MRPS36). Proteínas desta família estão envolvidas em mecanismos de translação, transcrição, apoptose e manutenção celular (Bacon *et al.*, 2024). Hevler *et al.* (2023) sugerem que a MRPS36 teria um papel na geração de NADH na respiração aeróbica. Compagnoni *et al.* (2020) afirma que existe uma correlação entre doenças neurodegenerativas e atividade mitocondrial reduzida, o que por extensão pode significar que a MRPS36 tenha algum envolvimento na DP.

A terceira sequência peptídica alterada em Fiametti *et al.* (2021) escolhida para investigação no presente estudo foi TKQTEETNSTPAPSEQKE (p-MARCKS1B), derivada da região C-terminal da proteína 1-B do substrato C quinase rico em alanina miristoilada (proteína 1-B relacionada à MARCKS), que se apresentou diminuída no grupo tratado com 6-OHDA (proporção média 6-OHDA/Salina igual a 0,28). As proteínas desta família controlam o movimento celular por meio da regulação do citoesqueleto de actina, envolvido na formação de filopódio e lamelipódio, sendo altamente conservado entre os vertebrados, desempenhando vários papéis relacionados ao crescimento do cérebro, migração neuronal, crescimento de neurito, liberação de neurotransmissor e plasticidade sináptica (Amri *et al.*, 2018).

A quarta sequência, HESHLEPIE (p-EEAT2), que se apresentou diminuída no grupo tratado com 6-OHDA (proporção média 6-OHDA/Salina igual a 0,46), é derivada do Transportador de Aminoácido Excitatório 2 (EAAT2 – *Excitatory Amino Acid Transporter 2*), proteína com papel essencial na reciclagem de glutamato, o neurotransmissor mais abundante no cérebro de mamíferos (Fontana *et al.*, 2023). Estudos imunohistoquímicos com cérebro humano pós-morte indicam que a diminuição de EEAT2 precedem perda neuronal em casos de doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer (Viejo *et al.*, 2021) e Esclerose Lateral Amiotrófica (Alijanpour *et al.*, 2023). A doença de Alzheimer apresenta

sintomas como perda de memória e habilidades de raciocínio, desorientação de espaço e tempo, mudanças de personalidade, entre outros, e comumente conta com a presença de agregados de α -sinucleína (Twhig; Nielsen, 2019), o que também ocorre na doença de Parkinson. Já a Esclerose Lateral Amiotrófica causa sintomas como rigidez muscular, câimbras, dificuldade de mastigar e deglutir, entre outros. Seus sintomas motores são consequência da degeneração dos neurônios associados a movimentos (Bonafede; Mariotti, 2017), similar ao que ocorre na DP.

Por fim, o peptídeo TIEQEKQAGSS (p-Tbeta4), que se apresentou diminuído no grupo tratado com 6-OHDA (proporção média 6-OHDA/Salina igual a 0,45) é derivado da Timosina beta-4 (Tbeta4), peptídeo de 43 aminoácidos cuja principal função é regular a polimerização de actina, que é necessária para a organogênese e motilidade celular (Olianas *et al.*, 2021). Além disso, estudos com o Tbeta4 indicam que seja um peptídeo que ajuda na recuperação miocárdica em casos pós-infarto por meio da migração celular, bem como na recuperação de córnea (Xing *et al.*, 2021) e fígado (Yang *et al.*, 2020). Também existem evidências de que o Tbeta4 ajude no tratamento de esclerose múltipla por meio da recuperação da funcionalidade neuronal, bem como na melhoria de lesões induzidas por privação de oxigênio-glucose (Zhang *et al.*, 2019) e reversão do comprometimento cognitivo em camundongos (Wang *et al.*, 2021). Ou seja, o Tbeta4 pode ser um aliado na recuperação neuronal, e possivelmente este peptídeo derivado também seja.

Desta forma, este projeto busca compreender o papel dos peptídeos escolhidos (Tabela 1) na doença de Parkinson. Entendendo a ação neuroprotetora ou citotóxica destes peptídeos, será possível compreender melhor a própria doença de Parkinson e, dessa forma, buscar um tratamento mais eficaz para a doença.

Tabela 1 - Peptídeos e respectivas proteínas precursoras

Peptídeo	Sequência	Proteína precursora	Função da proteína precursora
p-FABP7	GVGFATRQV	Proteína de Ligação de Ácido Graxo 7 (<i>Fatty Acid Binding Protein 7</i>)	- Elevação da expressão de enzimas oxidantes; - Proteção contra sinalização de apoptose; - Plasticidade neuronal.
p-MRPS36	TLDLNEMDYIQRGGPE	Proteína Ribossomal Mitocondrial S36 (<i>Mitochondrial Ribosomal Protein S36</i>)	- Translação, transcrição, apoptose e manutenção celular; - Geração de NADH na respiração aeróbica.
p-MARCKS1B	TKQTEETNSTPAPSEQKE	Proteína 1B do substrato C quinase Rico em Alanina Miristoilada (<i>Myristoylated Alanine-rich C-kinase Substrate Related Protein 1B</i>)	- Controle do movimento celular; - Formação de filopódio e lamelipódio; - Migração neuronal, crescimento do cérebro, plasticidade sináptica.
p-EEAT2	HESHLEPIE	Transportador de Aminoácido Excitatório 2 (<i>Excitatory Amino Acid Transporter 2</i>)	- Reciclagem de glutamato (o excesso de glutamato ocorre em doenças neurodegenerativas).
p-Tbeta4	TIEQEKQAGSS	Timosina beta-4 (<i>Thymosin beta-4</i>)	- Regulação da polimerização de actina; - Motilidade celular; - Recuperação de diversos tecidos após diferentes lesões.

Fonte: elaboração da autora (2025)

2 OBJETIVOS

Avaliar os peptídeos p-FABP7, p-MRPS36, p-MARCKS1B, p-EEAT2 e p-Tbeta4 quanto às suas ações neuroprotetoras ou citotóxicas na larva de zebrafish induzida à condições parkinsonianas com 6-OHDA, por meio de:

- Síntese química dos peptídeos em fase sólida utilizando o protocolo Fmoc;
- Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados;
- Análise da estrutura secundária de cada peptídeo por espectroscopia de dicroísmo circular;
- Ensaio de viabilidade celular por MTT para determinar possível citotoxicidade dos peptídeos;
- Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish (FET test) para determinar possível toxicidade dos peptídeos estudados *in vivo*;
- Obtenção de imagens por microscopia confocal com fluorescência para observar a integridade neuronal total no modelo transgênico de zebrafish TG(*HuC:gfp/NeuroD:rfp*);
- Quantificação de fluorescência de neurônios dopaminérgicos em zebrafish wildtype tratados por imunofluorescência para tirosina-hidroxilase;
- Ensaio comportamental com larva de zebrafish utilizando a 6-OHDA como neurotoxina para induzir uma condição semelhante à doença de Parkinson e observar a ação dos peptídeos no modelo.

3 MÉTODOS

3.1. Síntese química dos peptídeos

A síntese química dos peptídeos foi realizada em fase sólida, utilizando o protocolo da química Fluorenilmetiloxycarboxil (Fmoc), onde a proteção do grupo alfa-amino é feita pelo Fmoc e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos terc-butil, tritil e terc-butiloxycarbonil, entre outros. Por ser base lábil, a retirada do Fmoc do grupo amino (desproteção) acontece em meio básico: solução de 20% 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF), em agitação por 1 minuto, seguido de lavagem com DMF e nova incubação sob agitação em solução de 4-metilpiperidina por 20 minutos. A etapa de acoplamento foi realizada pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc aminoácido a ser inserido com N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt). Nesta reação foram utilizadas duas vezes de excesso em relação à quantidade de grupo amino existente na resina, durante duas horas de agitação. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com DMF para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada etapa, foi efetuado um teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970). Este reagente, em altas temperaturas ($\sim 120^{\circ}\text{C}$), reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (maioria dos aminoácidos) ou amarelo/amarronzado (prolina), permitindo saber se o acoplamento (ou desproteção) foi efetuado com eficiência.

Em todas as sínteses, foram utilizadas resinas Wang já acopladas ao primeiro aminoácido do C terminal de cada peptídeo (Tabela 2). Por isso, foram utilizadas diversas resinas Wang, cada uma com um diferente grau de substituição, conforme descrito na Tabela 2. Inicialmente, foi utilizada uma escala de 0.2 mmol e um excesso de duas vezes para cada aminoácido. Contudo, após as primeiras purificações, percebemos que a massa final de peptídeo puro era pouca, já que no final da síntese metade da massa da peptidil-resina foi separada para acoplar um marcador fluorescente, o que será descrito logo abaixo. Por isso, nas últimas sínteses realizadas utilizamos uma escala de 0,4 mmol e mantivemos o excesso de duas vezes.

Tabela 2 - Resinas, graus de substituição, escalas e excesso utilizadas para cada sequência

Código	Resina utilizada	Grau de substituição (mmol/g)	Escala (mmol)	Excesso
p-FABP7	Fmoc-Val-Wang	0,59	0,2	2 x
p-MRPS36	Fmoc-Glu(Otbu)-Wang	0,56	0,2	2 x
p-MARCKS1B	Fmoc-Glu(Otbu)-Wang	0,56	0,4	2 x
p-EEAT2	Fmoc-Glu(Otbu)-Wang	0,56	0,4	2 x
p-Tbeta4	Fmoc-Ser(tBu)-Wang	0,64	0,4	2 x

Fonte: elaboração da autora (2025)

Ao fim de cada sequência sintetizada, a peptidil-resina foi pesada e metade de sua massa foi separada para acoplar o marcador fluorescente Rodamina-B, realizando novamente as etapas de acoplamento com Hobt e Dic como descrito acima, obtendo-se assim os peptídeos marcados com a sonda fluorescente, os quais foram utilizados a fim de analisar se há penetração no cérebro do zebrafish.

A clivagem dos peptídeos, que é o rompimento da ligação do peptídeo com a resina, foi realizada em solução ácida (ácido trifluoracético - TFA) (Merck®), conforme catálogo Novabiochem (2014) (Tabela 3), em frasco de cintilação, sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois, foi feita a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado. Ao final, o peptídeo foi dissolvido com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e a mistura foi centrifugada para separar a resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

Tabela 3 - Método de clivagem de acordo com catálogo Novabiochem (2014)

Código	Sequência	Método de Clivagem
p-FABP7 p-FABP7-R p-MARCKS1B p-MARCKS1B-R	GVGFATRQV RodaminaB-GVGFATRQV TKQTEETNSTPAPSEQKE RodaminaB-TKQTEETNSTPAPSEQ KE	95% TFA 2,5% TIS 2,5% água deionizada

Código	Sequência	Método de Clivagem
p-EEAT2 p-EEAT2-R p-Tbeta4 p-Tbeta4-R	HESHLEPIE RodaminaB-HESHLEPIE TIEQEKQAGSS RodaminaB-TIEQEKQAGSS	
p-MRPS36 p-MRPS36-R	TLDLNEMDYIQRGGPE RodaminaB-TLDLNEMDYIQRGGPE	94% TFA 2,5% EDODT 2,5% água deionizada 1% TIS

Fonte: elaboração da autora (2025)

3.2. Purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)

Cada peptídeo foi primeiramente analisado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil), para traçar o perfil bruto de cada síntese. Essa primeira análise foi feita em gradiente de 5%-95% de Solução B em 30 minutos, com fluxo de 1 mL/min. Dessa forma, é possível analisar o tempo de retenção de cada peptídeo e, conseqüentemente, determinar com qual porcentagem de Solução B o peptídeo em questão tem mais afinidade. Essa informação foi utilizada para traçar o método de purificação, onde o início do método foi considerado aproximadamente 20% a menos de Solução B indicado pelo tempo de retenção, até aproximadamente 20% a mais de Solução B, em 90 ou 120 minutos. O protocolo de purificação utilizado para cada peptídeo está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Protocolo de purificação de cada peptídeo

Código	Tempo de Retenção (min)	% de Solução B	Método de Purificação
p-FABP7	9,9	29,7	5% a 45% de Solução B em 120 min
p-FABP7-R	15,8	47,4	20% a 70% de Solução B em 120 min
p-MRPS36	11,0	33,0	5% a 55% de Solução B em 120 min
p-MRPS36-R	15,2	45,6	20% a 70% de Solução B em 120 min

Código	Tempo de Retenção (min)	% de Solução B	Método de Purificação
			min
p-MARCKS1B	4,4	13,2	1% a 35% de Solução B em 90 min
p-MARCKS1B-R	11,5	34,5	20% a 70% de Solução B em 120 min
p-EEAT2	6,7	20,1	1% a 35% de Solução B em 90 min
p-EEAT2-R	12,4	37,2	10% a 55% de Solução B em 120 min
p-Tbeta4	4,0	12	1% a 25% de Solução B em 120 min
p-Tbeta4-R	17,7	53,3	20% a 70% de Solução B em 120 min

Fonte: elaboração da autora (2025)

As purificações dos peptídeos sintetizados foram realizadas em modo semipreparativo utilizando um CLAE Shimadzu, em coluna de fase reversa (2,1 x 25 cm) C18 (Phenomenex), conforme tabela 5 em fluxo de 5 mL/min. O grau de pureza das frações foi determinado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil), de acordo com protocolo previamente descrito para análise das frações brutas. As soluções utilizadas para a purificação e verificação do teor de pureza dos peptídeos foram 0,045 % de TFA em água ultrapura (Solução A) e 0,036 % de TFA em acetonitrila (Solução B).

3.3. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrofotômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com ionização por electrospray por injeção direta, em modo de detecção positiva.

3.4. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular, método por espectroscopia de absorção que se baseia na absorção diferencial da luz polarizada circular, foi utilizado para determinar o conteúdo de estrutura secundária dos peptídeos. Para tanto, foram realizadas

espectroscopias de dicroísmo circular (DC) em espectropolarímetro Jasco J-715. Os espectros de DC foram obtidos em solução aquosa nos pHs 5 (tampão acetato de sódio 0,1 mol/L), 7,4 (tampão fosfato salino 0,027 mol/L) e 10 (tampão borax 0,1 mol/L), e em trifluoretanol (TFE), solvente conhecidamente estruturante. Foi preparada uma solução estoque em PBS a 1 mg/mL de cada peptídeo, sendo a concentração final de peptídeo em cada solução de 120 μ M.

3.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT

Células Neuro 2A e SHSY5Y foram mantidas em uma estufa a 37° C (atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®, Grand Island, NY, USA) e DMEM/F12 (mistura 1:1 de DMEM e meio Ham's F12, Gibco®, Grand Island, NY, USA) respectivamente, acrescidos de 100.000 unidades/L de penicilina, 0.1 g/L de estreptomicina e 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA). Após atingir confluência de ~80%, células foram transferidas para uma placa de 96 poços a uma densidade celular de 0.01 x 10⁶. Quando ~80% de confluência/poço foi atingida, o meio foi trocado para DMEM ou DMEM/F12 sem antibióticos, com SFB e foram acrescentados cada peptídeo em uma diluição seriada de 512 μ M até 1 μ M. Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% foi usado como controle positivo. Após 24 h, o meio foi removido e cada poço foi cuidadosamente lavado com tampão fosfato salino (PBS).

Após a lavagem, 5 mg/mL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, Thermo Fisher Scientific) em DMEM ou DMEM/f12 foi adicionado a cada poço e as células foram incubadas a 37° C por 1 h. O meio foi removido novamente e substituído por DMSO. As placas foram agitadas por aproximadamente 15 minutos. Leitura de absorbância foi realizada a 570 nm em um espectrofotômetro VERSAMax (Molecular Devices, USA). A análise estatística foi feita por teste ANOVA (one-way analysis of variance) seguido por teste Dunnett para comparações múltiplas. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

3.6. Condicionamento de *Danio rerio*

Zebrafish adultos foram mantidos em sistema autônomo (Tecniplast, Buguggiate, Itália), com temperatura (28 °C), condutividade (500 μ S/cm²) e pH (7,5) controlados, sob dieta viva (*Artemia sp.*) e seca. A criação foi realizada em tanques

de criação fora do sistema, com seixos e plantas artificiais, na proporção de 1 macho para 1 fêmea. Os tanques de criação foram montados na noite anterior à reprodução e na manhã seguinte a água foi trocada. Os ovos foram coletados, ovos não fertilizados foram descartados e os peixes adultos foram devolvidos aos tanques do sistema o mais rápido possível. Os embriões foram criados em temperaturas variando de 28 a 32°C em meio embrionário (0,05% de azul de metileno adicionado à água do sistema), e estagiados em horas após a fertilização (hpf) de acordo com Kimmel e colaboradores (Kimmel *et al.*, 1995). As linhagens de peixe utilizadas foram do tipo selvagem (Tab5) e Tg(*HuC:gfp/NeuroD:rfp*). Todas as manipulações foram realizadas seguindo as regulamentações locais aprovadas: CEUA-Instituto Pasteur de Montevideu e CNEA, bem como do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovados pela CEUA do Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista (IB/CLP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) (Protocolo nº 06/2023).

3.7. Ensaio de Embriotoxicidade em Zebrafish (FET Test)

Estes ensaios foram realizados no Instituto Pasteur de Montevideu por meio de BEPE (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior - Processo FAPESP #2023/12077-0). Após a reprodução, os embriões do tipo selvagem foram coletados e criados a 32° C até 4 hpf. Às 4 hpf, os ovos foram transferidos para uma placa de Petri contendo uma fina camada de agarose 1% no fundo. Os ovos foram decorionados conforme descrito anteriormente (Mandrell *et al.*, 2011) com 0,1 mg/mL de pronase (P5147 - Sigma-Aldrich) em meio embrionário por 15 minutos sob agitação lenta e constante, depois enxaguados por cerca de 1 minuto 5 vezes, sob agitação lenta e constante. Após a decorionação, os embriões foram mantidos dentro de uma incubadora a 28° C por 30 minutos, para garantir que não tivessem sofrido nenhum dano. Os embriões foram então transferidos manualmente com uma pipeta de vidro, para poços individuais em uma placa de 96 poços, com fundo redondo, e foram colocados novamente em uma incubadora a 28°C por 30 minutos para garantir que nenhum dano tivesse sido causado. Às 6 hpf, a água de cada poço foi removida e foram adicionados 150 µL de cada peptídeo diluído em meio embrionário. Devido a limitações quanto à quantidade de peptídeo levada ao Uruguai, ao invés de testar 5 concentrações diferentes como recomenda a diretriz da OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development), foram utilizadas

duas concentrações diferentes: 50 μ M e 100 μ M. Essas concentrações foram respectivamente a concentração mais alta a ser estudada no ensaio comportamental (Prabha *et al.*, 2022) e o dobro desta concentração. Cafeína 2,4 mM foi utilizada como controle positivo (Álvarez, *et al.*, 2017). Cada poço teve sua solução renovada a cada 24 horas para evitar degradação e garantir a biodisponibilidade das moléculas. O desenvolvimento dos embriões foi observado às 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas e quaisquer anormalidades foram registradas. Embriões coagulados, falta de formação de somitos, não descolamento da cauda e falta de batimento cardíaco foram considerados letais, e coluna curvada, edema no coração ou saco vitelínico e malformação foram considerados traços de toxicidade (OECD, 2013).

3.8. Tratamento com 6-OHDA e peptídeos nas larvas de *Danio rerio*

O tratamento com 6-OHDA foi realizado como descrito anteriormente (Vaz *et al.*, 2019). Larvas 4 dpf foram transferidas para uma placa de 96 poços, com uma única larva por poço, e tratadas com 6-OHDA a 750 μ M. Após 24 horas, os peptídeos foram acrescentados a seus devidos grupos de estudo. Para a análise de integridade neuronal total (Tópico 3.9), foram usados peptídeos sem marcador fluorescente a 50 μ M. Para a análise de integridade de neurônios dopaminérgicos (Tópico 3.10), foram usados peptídeos acoplados à Rodamina-B a 50 μ M. Para o ensaio comportamental (Tópico 3.12), foram usados os peptídeos sem marcador fluorescente nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M e 50 μ M (Prabha *et al.*, 2022). Os animais foram incubados em suas respectivas soluções por 24 h.

3.9. Análise de integridade neuronal total

Peixes Tg (*Huc:gfp/NeuroD:rfp*) foram utilizados para analisar a integridade neuronal total. Esta cepa de peixe-zebra expressa fatores de transcrição HuC e NeuroD em neurônios ativos, o que permite quantificar e comparar condições neurológicas em diferentes tratamentos. Para isso, os embriões desta linhagem foram submetidos ao tratamento descrito no tópico 8, com peptídeos sem marcador fluorescente a 50 μ M. Terminadas as 24 h de incubação, os animais foram eutanasiados e fixados em PFA (paraformaldeído)/PBS 4%, a 4°C. Os olhos foram cuidadosamente removidos com pinça e agulha. Os embriões foram lavados cinco vezes com PBS-T e incubados *overnight* com verde de metila (1:8000) diluído em solução de bloqueio PBS-T-BSA a 4°C com agitação suave e constante. Após

incubação com coloração de DNA, todos os embriões foram lavados em PBS-T 3 vezes durante 30 minutos, depois duas vezes em PBS durante 10 minutos. Os embriões foram então montados em câmaras com glicerol 75%, Tris 50 mM, pH 8.

3.10. Análise de integridade de neurônios dopaminérgicos

Peixes *wildtype* foram submetidos ao tratamento descrito no tópico 8, com peptídeos acoplados à Rodamina-B a 50 μ M. Após 24 h de incubação, os animais foram eutanasiados e fixados em PFA (paraformaldeído)/PBS 4%, a 4°C. Os olhos foram cuidadosamente removidos com pinça e agulha. Os embriões foram então lavados em PBS-T (PBS + Triton X-100 a 1%) 3 vezes durante 5 minutos e depois 1 vez durante 10 minutos. Em seguida, foram permeabilizados com tripsina-EDTA (ácido etilnodiamino tetra-acético) 0,25% em gelo por 20 minutos e lavados em PBS-T, em gelo, por 10 minutos. O bloqueio foi realizado por lavagem em PBS-T-BSA (Triton X-100 a 1%, albumina sérica bovina (BSA) a 0,1%, PBS) durante 30 minutos. A incubação com anticorpo primário de coelho anti-tirosina hidroxilase Abcam ab112 diluído em solução de bloqueio PBS-T-BSA (1:200) foi feita *overnight* a 4°C com agitação suave e constante. Cinco lavagens com PBS-T em agitação suave foram feitas e o anticorpo secundário anti-coelho Alexa 488 (1:500) e verde de metila (1:8000) diluídos em solução de bloqueio PBS-T-BSA foram incubados *overnight*, a 4°C com agitação suave e constante. Após incubação com anticorpo secundário e coloração de DNA, todos os embriões foram lavados em PBS-T 3 vezes durante 30 minutos, depois duas vezes em PBS durante 10 minutos. Os embriões foram então montados em câmaras com glicerol 75%, Tris 50 mM, pH 8.

3.11. Imagens de microscopia confocal

Para imagens de microscopia confocal, foi utilizado um microscópio Zeiss LSM800 com uma objetiva de glicerol 25x. O software Image J foi usado para processar as imagens.

3.12. Análise comportamental

Após o tratamento descrito no tópico 3.8, no 6º dpf, ainda na placa de 96 poços e com um único peixe por poço, as larvas tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos. Após a filmagem de todos os animais, os vídeos foram processados por um sistema de rastreamento automatizado (ToxTrac Versão 2.96). Os

parâmetros de análise foram velocidade média do nado e distância total nadada no período observado.

4 RESULTADOS

4.1. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos sintetizados

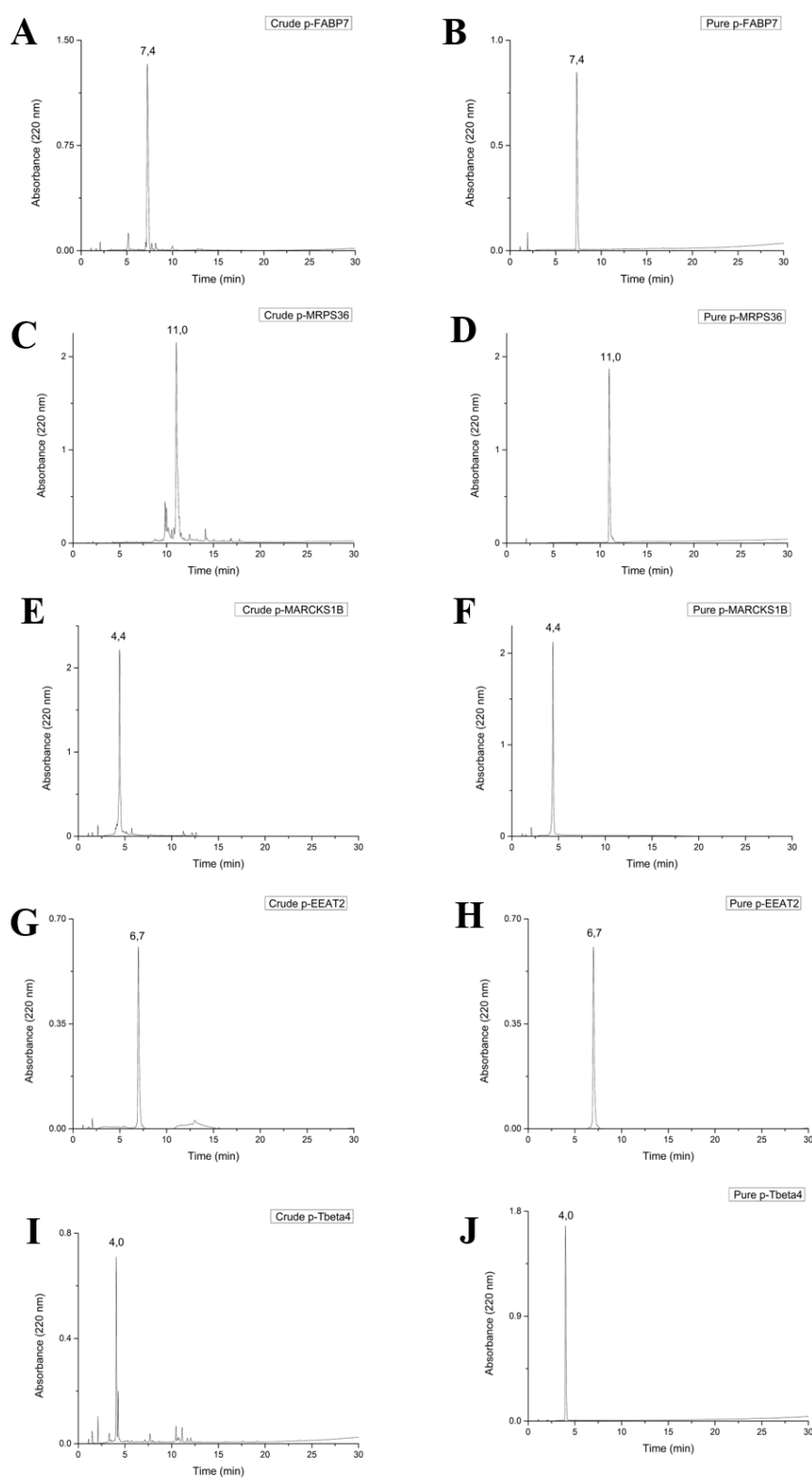
Todos os peptídeos foram sintetizados (Tabela 5) purificados, obtendo-se um grau de pureza >95%, e caracterizados com sucesso, conforme demonstrado nas Figuras 1 e 2.

Tabela 5 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos sintetizados

Código	Sequência	Massa Molar (g/mol)
p-FABP7	GVGFATRQV	934,05
p-FABP7-R	RodaminaB-GVGFATRQV	1360,06
p-MRPS36	TLDLNEMDYIQRGGPE	1851,01
p-MRPS36-R	RodaminaB-TLDLNEMDYIQRGGPE	2277,02
p-MARCKS1B	TKQTEETNSTPAPSEQKE	2005,06
p-MARCKS1B-R	RodaminaB-TKQTEETNSTPAPSEQ KE	2431,07
p-EEAT2	HESHLEPIE	1090,15
p-EEAT2-R	RodaminaB-HESHLEPIE	1516,16
p-Tbeta4	TIEQEKQAGSS	1177,22
p-Tbeta4-R	RodaminaB-TIEQEKQAGSS	1603,23

Fonte: elaboração da autora (2025)

Figura 1 - Cromatogramas das frações brutas e puras dos peptídeos sintetizados.

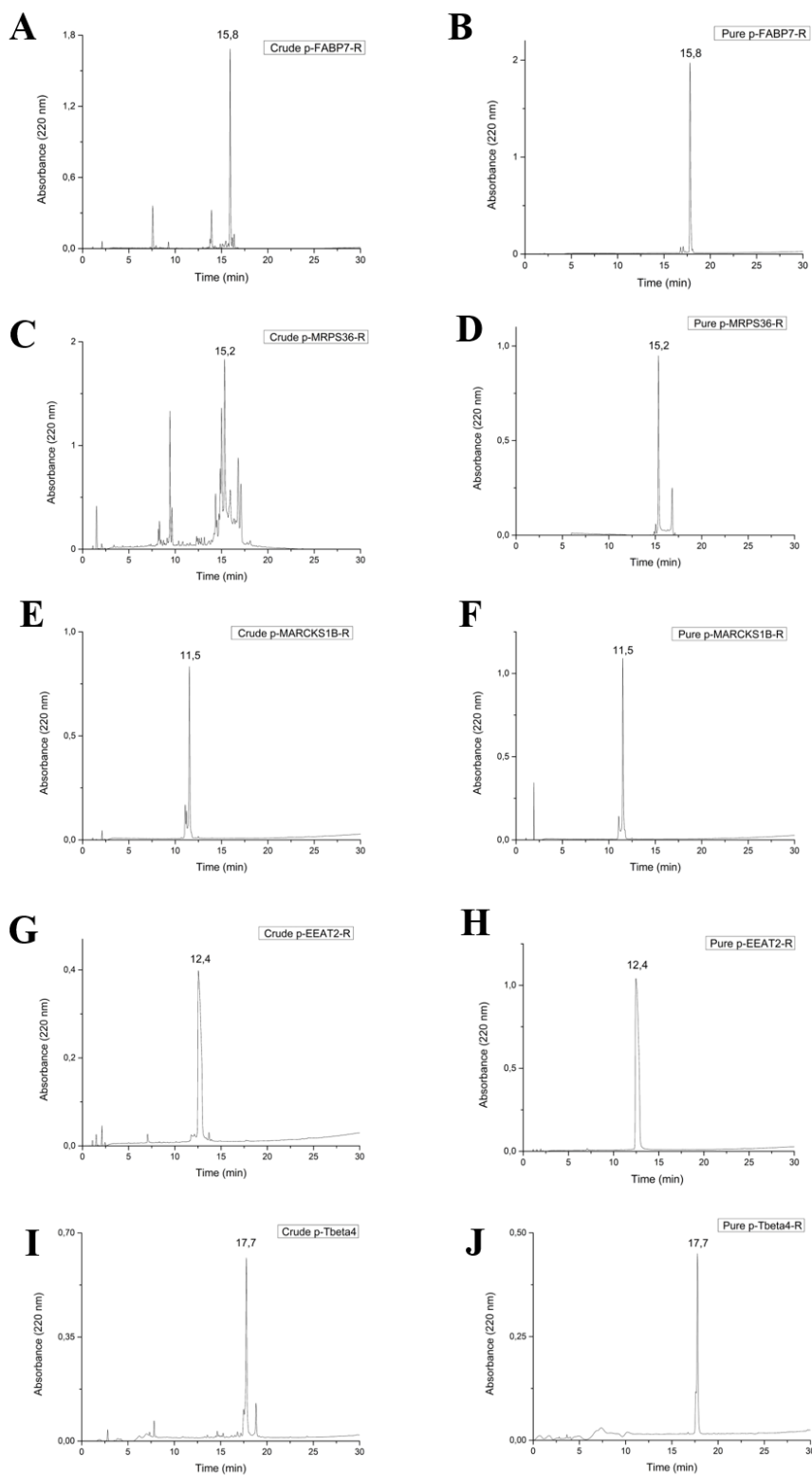


Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7 (A, B), p-MRPS36 (C, D), p-MARCKS1B (E, F), p-EEAT2 (G, H) e p-Tbeta4 (I, J). O grau de pureza das frações foi determinado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica

(0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil). As soluções utilizadas para a purificação e verificação do teor de pureza dos peptídeos foram 0,045% de TFA em água ultrapura (Solução A) e 0,036% de TFA em acetonitrila (Solução B), em uma corrida de 30 minutos em fluxo 1 mL/min, iniciando a 5% de Solução B e finalizando com 95% de Solução B

Figura 2 - Cromatogramas das frações brutas e puras dos peptídeos acoplados à Rodamina-B



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7-R (A, B), p-MRPS36-R (C, D), p-MARCKS1B-R (E, F), p-EEAT2-R (G, H) e p-Tbeta4-R (I, J). O grau de pureza das frações foi

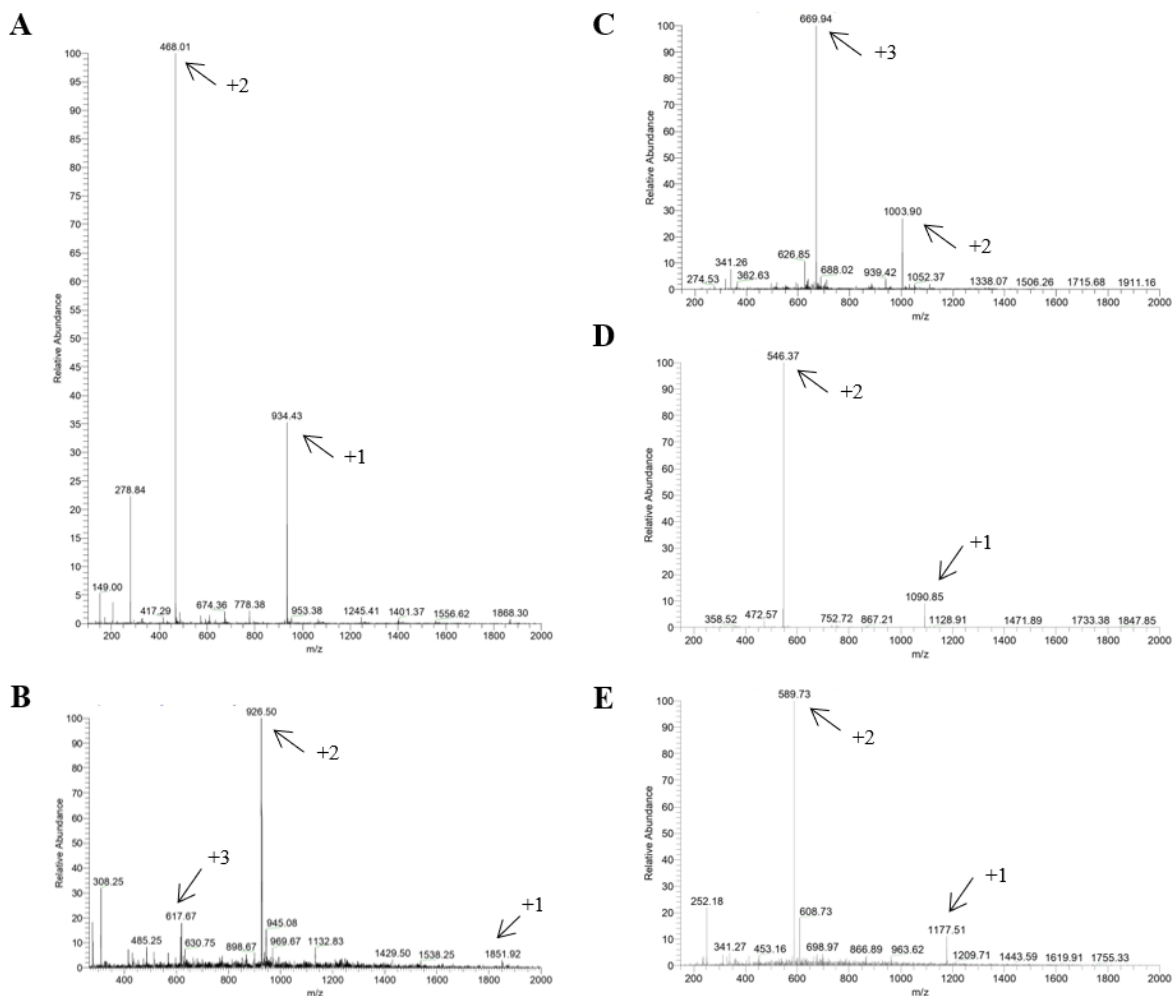
determinado em um cromatográfico Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 (Kromassil). As soluções utilizadas para a purificação e verificação do teor de pureza dos peptídeos foram 0,045% de TFA em água ultrapura (Solução A) e 0,036% de TFA em acetonitrila (Solução B), em uma corrida de 30 minutos em fluxo 1 mL/min, iniciando a 5% de Solução B e finalizando com 95% de Solução B.

A respeito da purificação do peptídeo p-MRPS36-R (Figura 2D), é importante comentar sobre o pico em aproximadamente 17 minutos. Apesar de diversas tentativas de purificar esta sequência, este pico continuou aparecendo. A amostra foi então analisada por LC/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) e foi observado que este segundo pico, aos ~17 minutos, tem a mesma massa molecular que nosso material de interesse. Desta forma, pode-se considerar este perfil como puro, visto que ao menos 95% do material apresentado é o peptídeo de interesse.

4.2. Espectrometria de massas

Utilizamos a espectrometria de massas para confirmar se o material sintetizado e purificado realmente é o material de interesse. Para isso, calculamos a razão massa/carga de cada peptídeo. Ou seja, somamos o massa molar (MM) do peptídeo de interesse com cada carga utilizada na espectrometria de massas, dividimos pela própria carga em questão $((MM+z)/z)$, e comparamos o resultado com o valor de cada pico do espectro obtido. Se os números da razão massa/carga e de pelo menos um pico do espectro forem iguais, isso indica que o peso molecular do material é igual ao do material de interesse, ou seja, a síntese foi feita corretamente, conforme demonstram as Figuras 3 e 4.

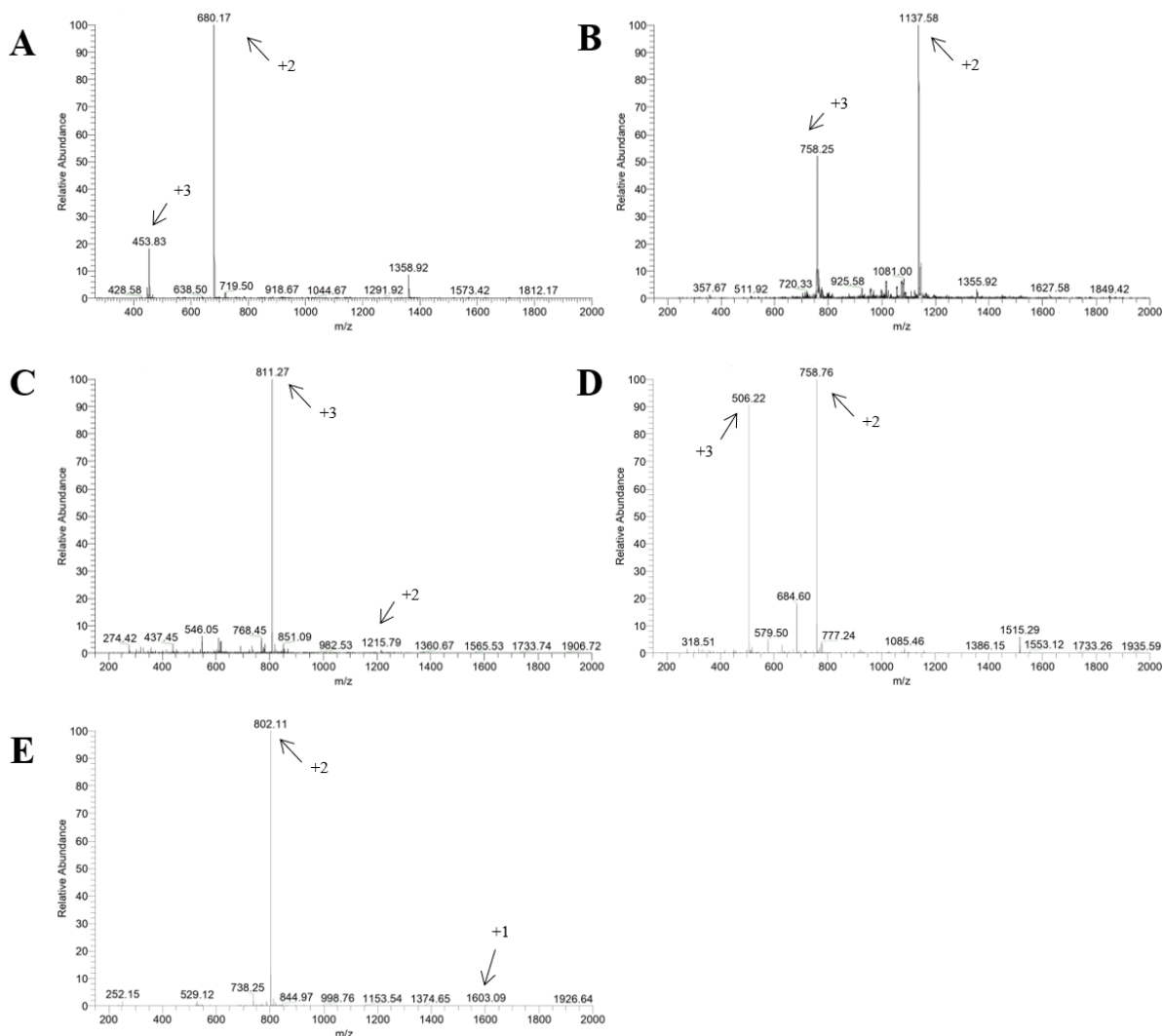
Figura 3 - Espectros de massas dos peptídeos sintetizados



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7 (A), p-MRPS36 (B), p-MARCKS1B (C), p-EEAT2 (D) e p-Tbeta4 (E). Setas indicam picos que confirmam a síntese correta de acordo com a razão massa/carga. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrofotômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com ionização por electrospray por injeção direta, em modo de detecção positiva.

Figura 4 - Espectros de massas dos peptídeos acoplados à Rodamina-B



Fonte: elaboração da autora (2025).

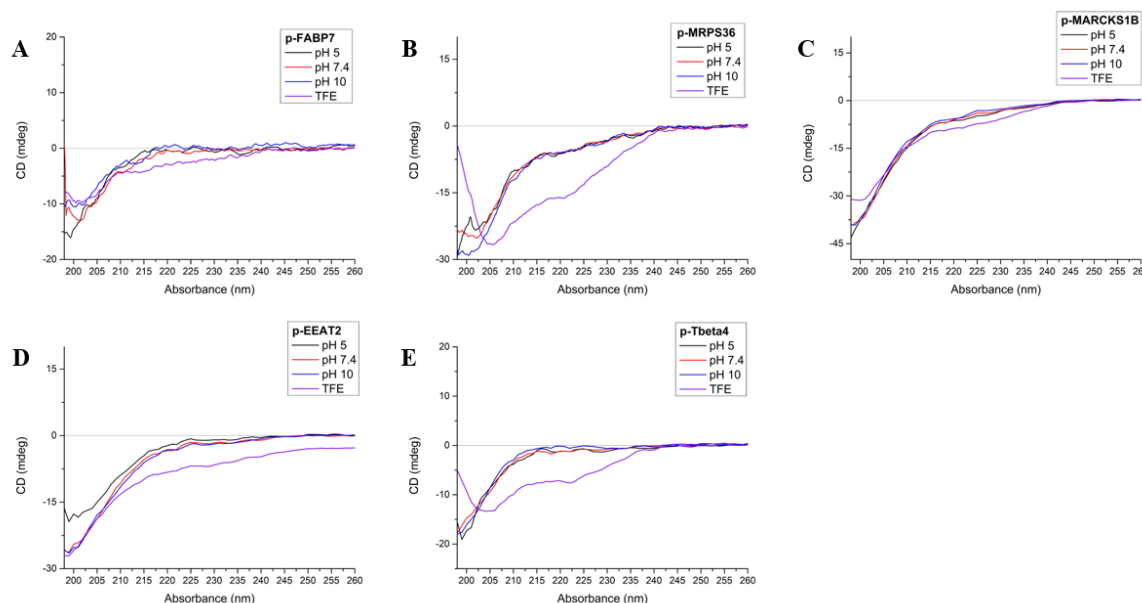
Legenda: p-FABP7-R (A), p-MRPS36-R (B), p-MARCKS1B-R (C), p-EEAT2-R (D) e p-Tbeta4-R (E). Setas indicam picos que confirmam a síntese correta de acordo com a razão massa/carga. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrofotômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com ionização por electrospray por injeção direta, em modo de detecção positiva.

4.3. Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é um método amplamente utilizado para avaliar estruturas secundárias de diferentes moléculas como proteínas e peptídeos. É um método espectroscópico óptico baseado na absorção de luz polarizada (Chem. Soc. Rev., 2021). Um espectro de DC indica uma estrutura completa em hélice quando duas bandas negativas são mostradas em ~222 e ~208 nm, e uma banda positiva em ~190 nm. Uma molécula com estrutura completa em folha- β tem uma banda negativa entre 210-220 nm e uma banda positiva entre 195-200 nm. Uma molécula de estrutura aleatória tem uma banda negativa em 200

nm (Ranjbar *et al.*, 2009). Neste estudo, o DC foi realizado em 3 pHs diferentes (5, 7,4 e 10) para observar possível modificação estrutural e estabilidade do peptídeo e também em trifluoretanol (TFE), um solvente conhecidamente estruturante e estabilizante (Vincenzi *et al.*, 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos sintetizados.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7 (A), p-MRSP36 (B), p-MARCKS1B (C), p-EEAT2 (D) e p-Tbeta4 (E) nos pHs 5 (preto), 7,4 (vermelho), 10 (azul) e TFE (violeta).

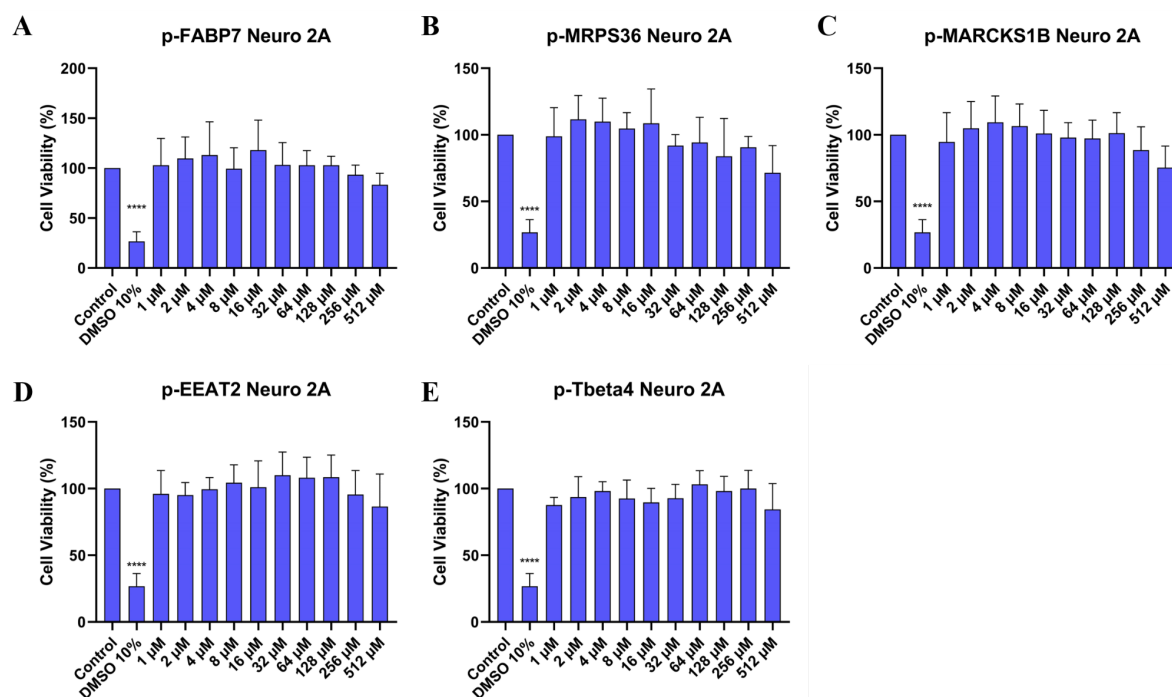
Na maioria dos pHs observados, os peptídeos apresentam estrutura majoritariamente randômica, com exceção de p-MRPS36 e p-Tbeta4 em TFE. Os dois peptídeos apresentaram perfis de hélice no agente estruturante.

4.4. Ensaio de viabilidade celular por MTT

Neuro 2A é uma linhagem celular de neuroblasto de camundongo (ATCC CCL-131) amplamente usada em pesquisas em neurociência, enquanto SHSY5Y é uma sublinhagem clonada de neuroblastoma humano (ATCC CRL-2266) e é a linhagem celular mais comumente usada em pesquisas *in vitro* sobre DP (loghen *et al.*, 2023). Para investigar se os peptídeos são citotóxicos, o ensaio de citotoxicidade por MTT foi realizado em ambas as linhagens celulares. As concentrações dos peptídeos começaram em 512 μ M e seguiram uma diluição seriada até 1 μ M. DMSO 10% foi usado como controle positivo.

O tratamento em células Neuro 2A (Figura 6) indica que todos os peptídeos não apresentam citotoxicidade. Isso inclui todas as concentrações estudadas, até mesmo a mais alta de 512 μ M.

Figura 6 - Viabilidade celular (%) de células Neuro 2A tratadas em diferentes concentrações dos peptídeos.

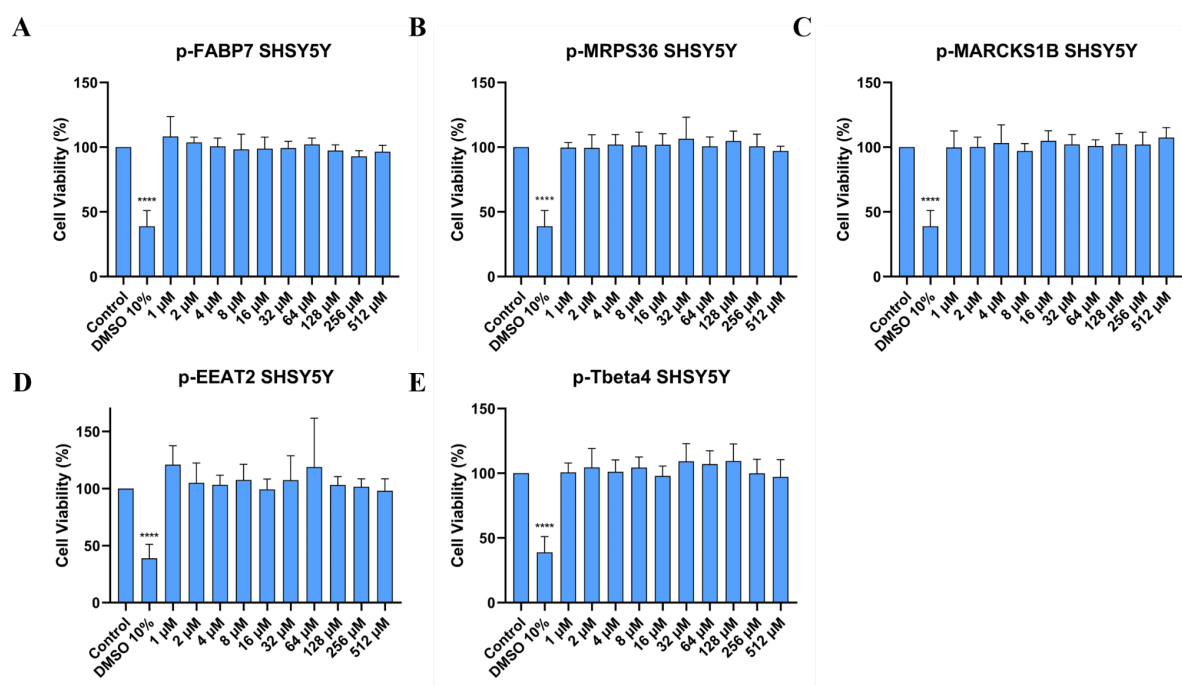


Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7 (A), p-MRPS36 (B), p-MARCKS1B (C), p-EAAT2 (D) e p-Tbeta4 (E). Os experimentos foram realizados em duplicatas, em três ocasiões diferentes. ****, $p < 0,0001$.

A Figura 7 mostra que os peptídeos tampouco apresentaram citotoxicidade na linhagem de neuroblastoma humano, SHSY5Y.

Figura 7 - Viabilidade celular (%) de células SHSY5Y tratadas em diferentes concentrações dos peptídeos.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: p-FABP7 (A), p-MRPS36 (B), p-MARCKS1B (C), p-EAAT2 (D) e p-Tbeta4 (E). Os experimentos foram realizados em duplicatas, em três ocasiões diferentes. ****, $p < 0,0001$.

4.5. Ensaio de Embriotoxicidade em Zebrafish (FET Test)

Como mencionado anteriormente, duas concentrações de cada peptídeo foram utilizadas no teste FET. p-FABP7 50 μM foi a única concentração do peptídeo que não apresentou qualquer tipo de alteração em comparação ao grupo controle. Para todas as outras concentrações de peptídeos, embora tenha ocorrido pelo menos uma característica de toxicidade ou morte, os resultados indicam que os peptídeos são provavelmente não tóxicos. Os resultados são mostrados abaixo na Tabela 6 e nas Figuras 8-11.

Tabela 6 - Características de toxicidade e letalidade de cada concentração de peptídeo observada no ensaio de embriotoxicidade

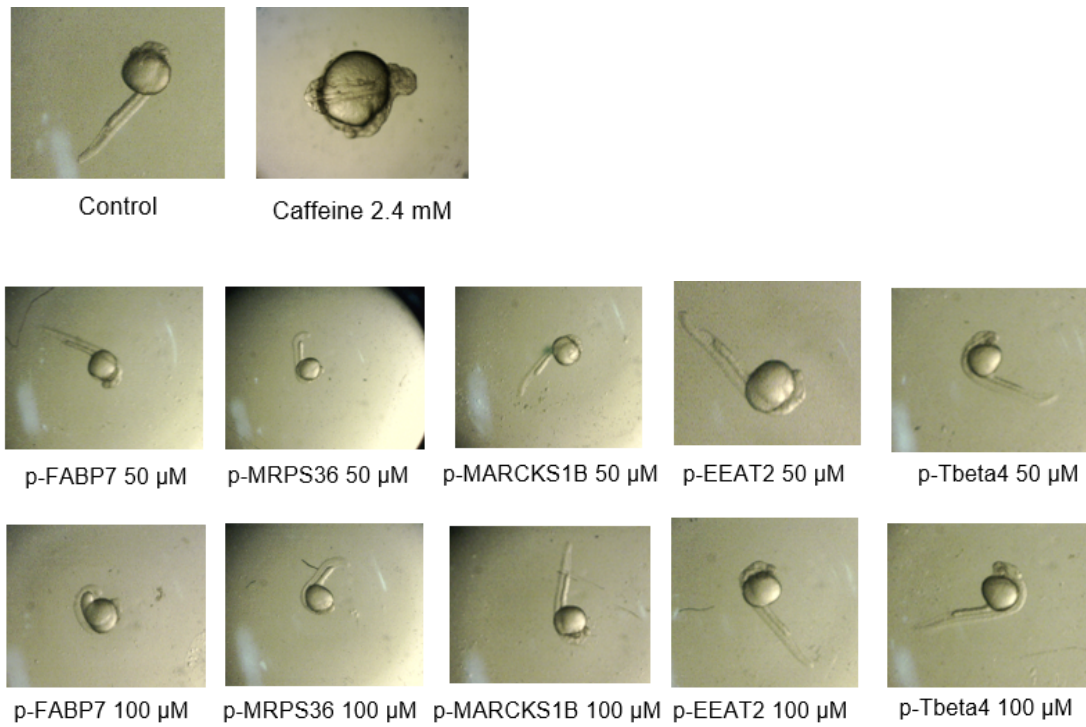
[illegible]

	Edema cardíaco	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	10	-
	Malformação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Morte	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	7	-
96 h	Coluna curvada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Edema de saco vitelino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-
	Edema cardíaco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Malformação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Morte	-	-	1	-	1	-	-	-	1	1	-	-
Total	Coluna curvada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	-
	Edema de saco vitelino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-
	Edema cardíaco	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	16	-
	Malformação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	Morte	-	2	7	4	6	2	3	3	4	3	15	-
Total %	Coluna curvada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-
	Edema de saco vitelino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,16 %	-
	Edema	-	-	-	-	4,16%	-	-	-	-	-	66,66	-

cardíaco											%	
Malformação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,16%	-
Morte	-	8,33%	29,16 %	16,66%	25%	8,33%	12,5%	12,5%3	16,66%	12,5%	62,5%	-

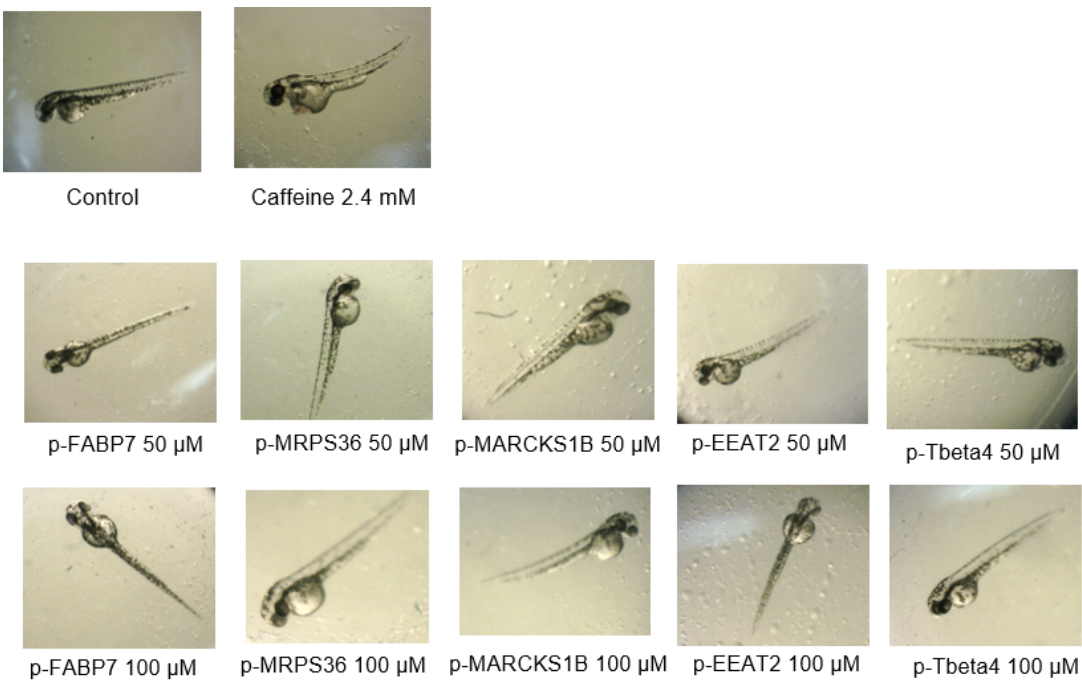
Fonte: elaboração da autora (2025)

Figura 8 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μM e 100 μM a 24 hpf.



Fonte: elaboração da autora (2025).
Legenda: Um embrião tratado com cafeína 2,4 mM apresentou malformação. Todos os outros embriões apresentaram desenvolvimento normal.

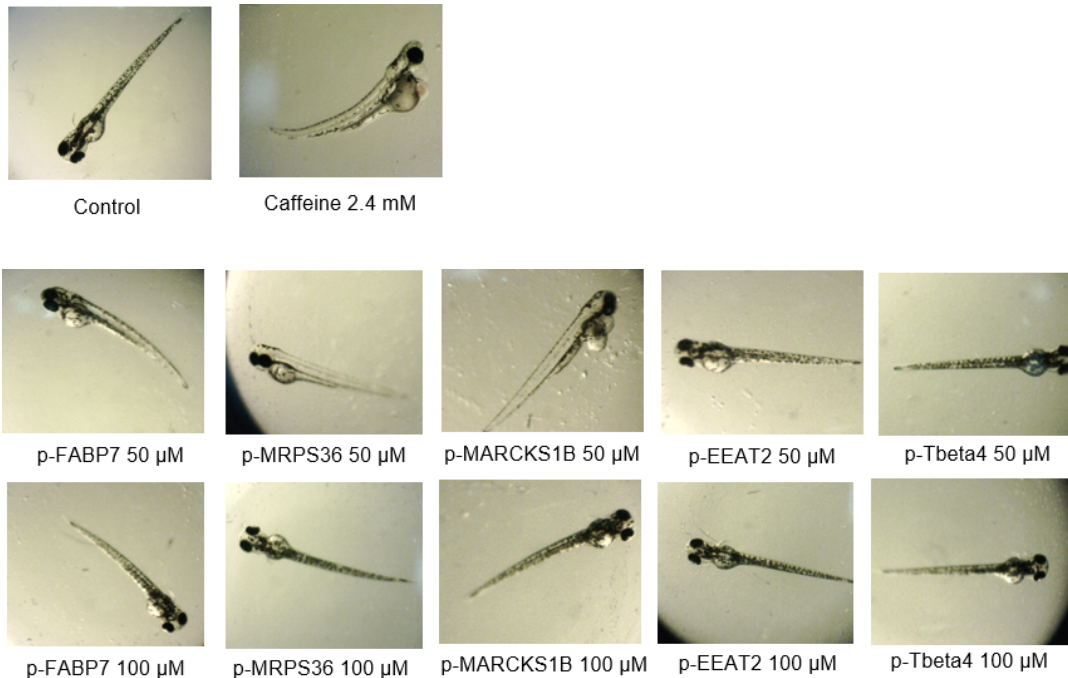
Figura 9 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μM e 100 μM a 48 hpf.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: Embrião tratado com cafeína 2,4 mM apresentou coluna curvada e edema cardíaco. Todos os outros embriões apresentam desenvolvimento normal.

Figura 10 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μM e 100 μM a 72 hpf.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: Um embrião tratado com p-MARCKS1B 50 μM apresentou edema cardíaco. Embriões tratados com cafeína 2,4 mM apresentaram edema cardíaco e coluna curvada. Todos os outros embriões apresentaram desenvolvimento normal.

Figura 11 - Embriões de zebrafish tratados com cada peptídeo a 50 μM e 100 μM a 96 hpf.



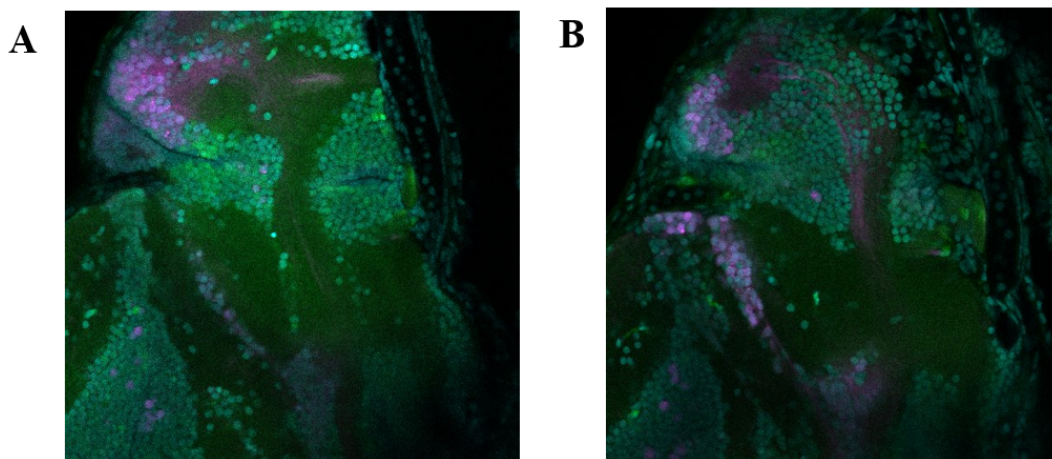
Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: Cafeína 2,4 mM - edema cardíaco, edema de saco vitelino, coluna curvada. Todos os outros embriões apresentam desenvolvimento normal.

4.6. Análise de integridade neuronal total

A fluorescência média de toda a imagem (Figura 12) foi medida usando o software Image J. Tanto para a fluorescência NeuroD (Figura 13) quanto para a fluorescência HuC (Figura 14), não foi observada diferença significativa de fluorescência entre o grupo controle e os embriões tratados com 6-OHDA, nem em comparação com os embriões tratados com peptídeo. Esses resultados nos levam a acreditar que essas linhagens não são as mais adequadas para observar as possíveis diferenças entre os grupos estudados.

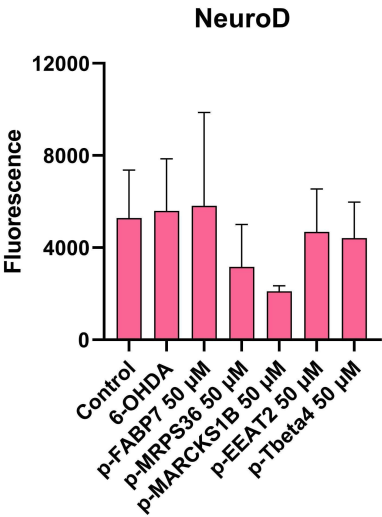
Figura 12 - Imagens demonstrativas de embriões transgênicos TG(*HuC:gfp/NeuroD:rfp*).



Fonte: elaboração da autora (2025).

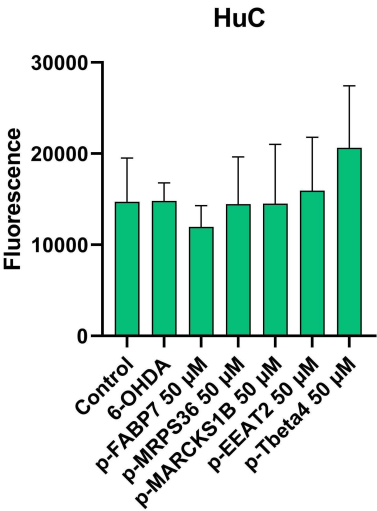
Legenda: (A) Grupo controle. (B) Grupo 6-OHDA. Em verde, HuC; em magenta, NeuroD; em ciano, DNA.

Figura 13 - Fluorescência média de NeuroD em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos.



Fonte: elaboração da autora (2025).
Legenda: Embriões 4 dpf foram incubados em solução de 6-OHDA 750 µM por 24 h, depois em solução contendo cada peptídeo a 50 µM por 24 h.

Figura 14 - Fluorescência média de HuC em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos.



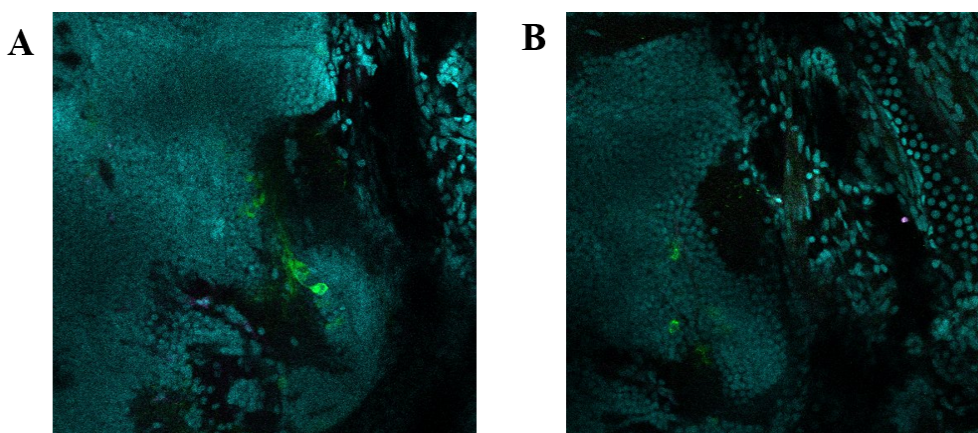
Fonte: elaboração da autora (2025).
Legenda: Embriões 4 dpf foram incubados em solução de 6-OHDA 750 μ M por 24 h, depois em solução contendo cada peptídeo a 50 μ M por 24 h.

4.7. Análise de integridade de neurônios dopaminérgicos

A fluorescência foi medida utilizando Image J. Primeiramente, os neurônios catecolaminérgicos marcados pela imunofluorescência foram encontrados no telencéfalo do zebrafish (Figura 15). Estes neurônios são análogos aos neurônios dopaminérgicos em humanos. Foi criado um Z-stack contendo 10 camadas antes e 10 camadas depois do ponto onde os neurônios dopaminérgicos apresentaram maior fluorescência. Após isso, a fluorescência média foi calculada pelo mesmo software.

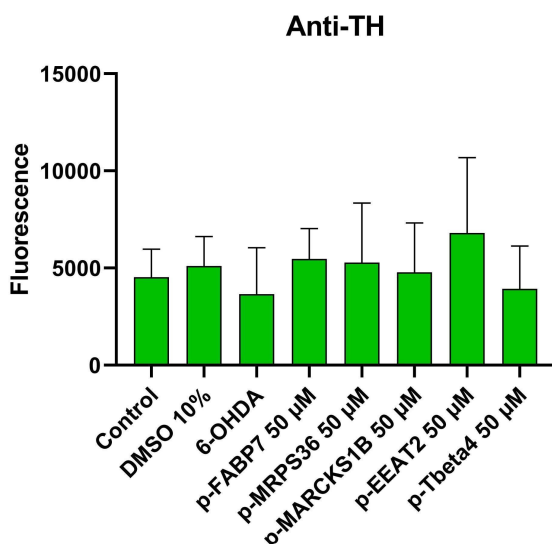
A quantificação da fluorescência anti-TH também não resultou em significância estatística (Figura 16), mas neste cenário o 6-OHDA apresentou menos fluorescência nos neurônios dopaminérgicos do que no grupo controle, o que indica que foi um modelo melhor, ainda que não ideal, para observar a possível influência dos peptídeos neste modelo de DP. O peptídeo p-EEAT2-R apresentou a fluorescência mais alta e todos os peptídeos, exceto p-Tbeta4-R, apresentaram fluorescência mais alta que o grupo controle.

Figura 15 - Imagens demonstrativas de imunofluorescência de embriões *wildtype*.



Fonte: elaboração da autora (2025).
Legenda: (A) Grupo controle. (B) Grupo 6-OHDA. Em ciano, DNA; em verde, neurônios dopaminérgicos.

Figura 16 - Imunofluorescência de anti-tirosina hidroxilase em embriões de zebrafish tratados com os peptídeos acoplados à Rodamina-B.

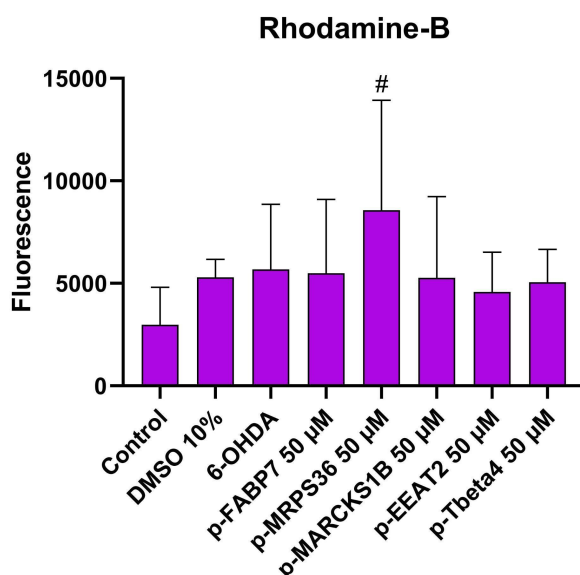


Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: Embriões 4 dpf foram incubados em solução de 6-OHDA 750 µM por 24 h, depois em solução contendo cada peptídeo acoplado à Rodamina-B a 50 µM por 24 h.

A fluorescência da rodamina-B também foi quantificada, com o objetivo de observar se e onde o peptídeo penetrava e se eles se concentravam mais em uma área do que em outra, por exemplo. Foi possível observar apenas que p-MRPS36-R apresentou maior concentração de Rodamina-B que o grupo controle (Figura 17). Ao observar as fotos tiradas no microscópio confocal, não foi possível identificar se o peptídeo estava mais concentrado em uma região específica. Em vez disso, o que foi observado foi um fundo magenta conforme mostrado na Figura 18.

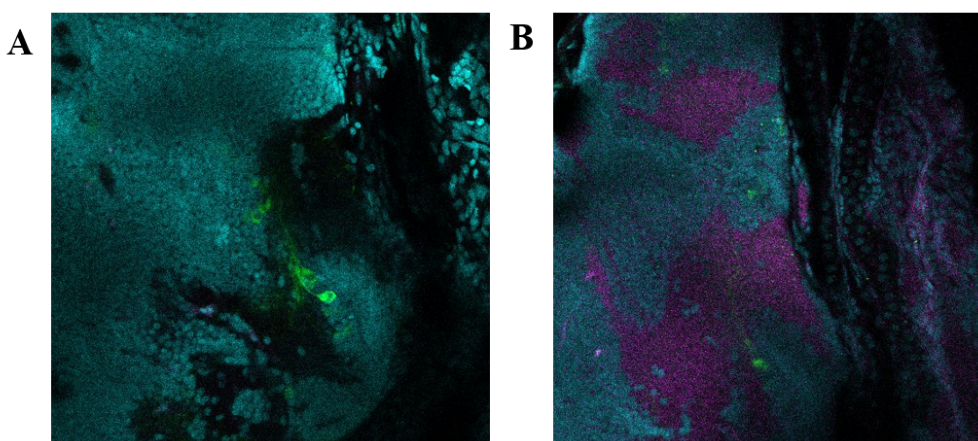
Figura 17 - Fluorescência de Rodamina-B em embriões tratados com os peptídeos acoplados à Rodamina-B.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: Embriões 4 dpf foram incubados em solução de 6-OHDA 750 µM por 24 h, depois em solução contendo cada peptídeo acoplado à Rodamina-B a 50 µM por 24 h.

Figura 18 - Imagens demonstrativas da região do telencéfalo de *D. rerio* tratadas com imunofluorescência anti-tirosina hidroxilase.



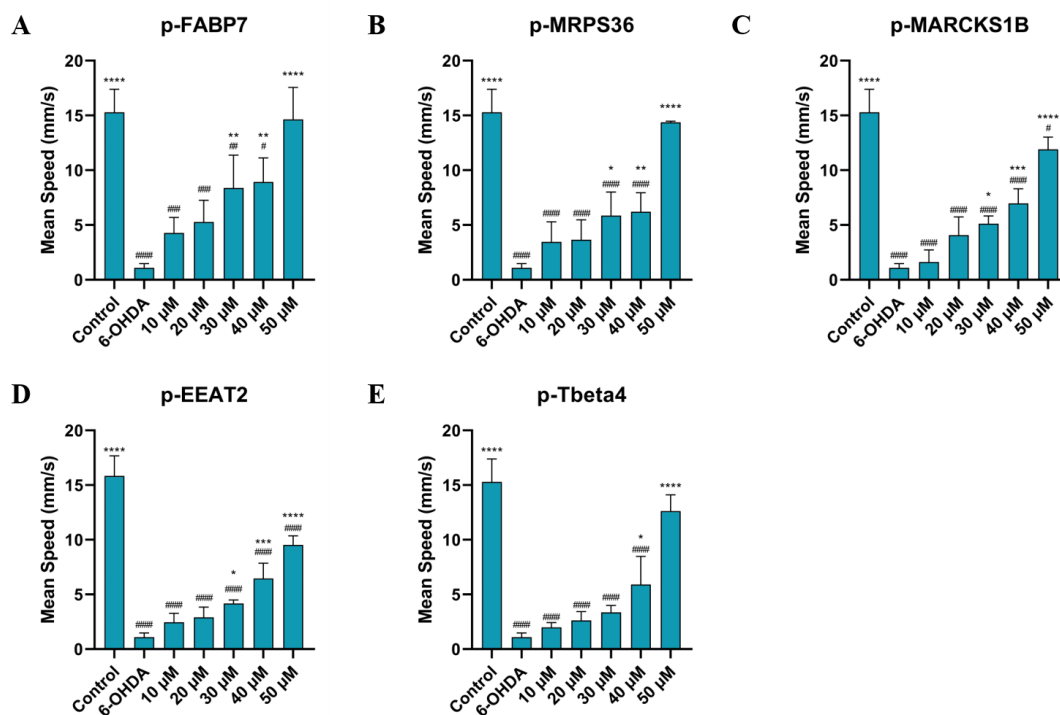
Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: (A) Grupo controle. (B) p-MRPS36-R 50 µM. Em ciano, DNA; em verde, neurônios dopaminérgicos; em magenta, Rodamina-B.

4.8. Ensaio comportamental de *Danio rerio*

Como demonstrado nas Figuras 19 e 20, todos os cinco peptídeos demonstraram uma melhora significativa da velocidade média (mm/s) e distância percorrida (mm) em comparação com o grupo 6-OHDA nas duas concentrações mais altas estudadas, 40 μ M e 50 μ M. Os peptídeos p-FABP7, p-MRPS36 e p-Tbeta4, em comparação ao grupo Controle, não tiveram diferença significativa na maior concentração estudada. Isto sugere que os peptídeos de alguma forma ajudam a recuperar da deficiência de movimento causada pelo 6-OHDA.

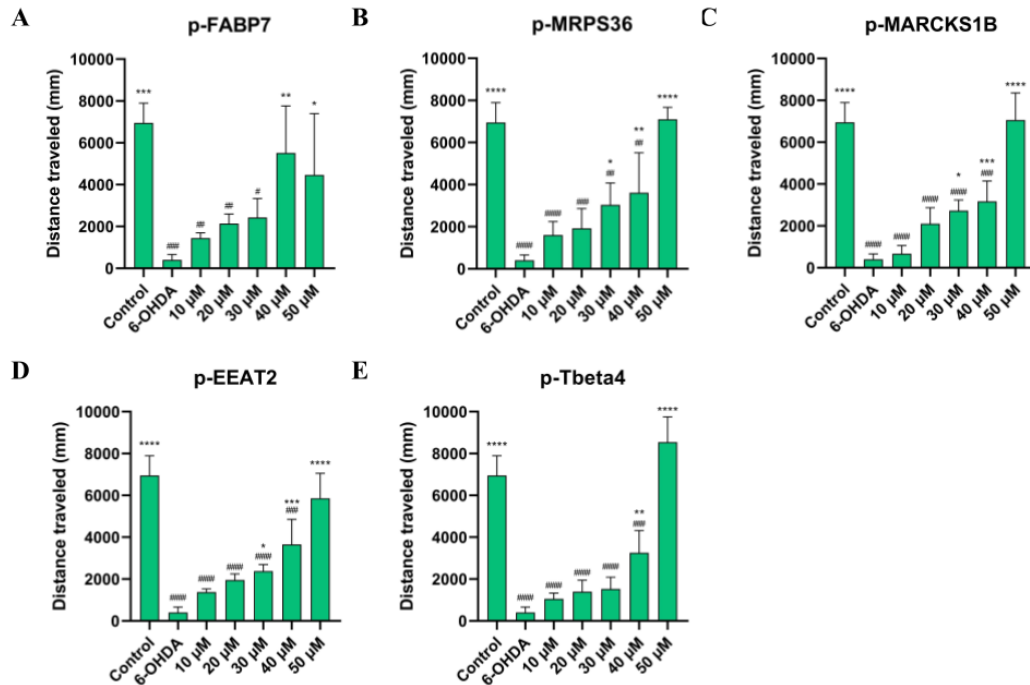
Figura 19 - Velocidade média de zebrafish selvagem tratado com 6-OHDA 750 μ M, seguido por cada peptídeo em diferentes concentrações.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: As concentrações utilizadas dos peptídeos foram: 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M e 50 μ M. #, $p < 0.01$, ##, $p < 0.001$, ###, $p < 0.0001$, ####, $p < 0.00001$ em comparação com o grupo controle. *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$, ***, $p < 0.0001$, ****, $p < 0.00001$ em comparação com o grupo 6-OHDA.

Figura 20 - Distância total nadada por zebrafish selvagem tratado com 6-OHDA 750 μ M, seguido por cada peptídeo em diferentes concentrações.



Fonte: elaboração da autora (2025).

Legenda: As concentrações utilizadas dos peptídeos foram: 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M e 50 μ M. #, $p < 0.01$, ##, $p < 0.001$, ###, $p < 0.0001$, ####, $p < 0.00001$ em comparação com o grupo controle. *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$, ***, $p < 0.0001$, ****, $p < 0.00001$ em comparação com o grupo 6-OHDA.

5 DISCUSSÃO

Apesar de ser a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, a causa da DP continua desconhecida. Além disso, os tratamentos existentes apresentam diversos efeitos colaterais e buscam apenas melhorar os sintomas e desacelerar a piora do quadro do paciente. Por conta disso, diversos estudos têm buscado compreender melhor a própria DP, como também encontrar estratégias para melhorar o tratamento e, quem sabe, curar a doença. Neste cenário, em um estudo anterior Fiametti *et al.* (2021) identificaram que 9 de 118 peptídeos no cérebro de zebrafish sofrem alteração significativa em um modelo de neurodegeneração com 6-OHDA, o que sugere que os peptídeos intracelulares têm importância biológica na DP. Contudo, o papel destes peptídeos na doença permanece desconhecido. Dos 9 peptídeos identificados por Fiametti *et al.* (2021) como estatisticamente significantes, 5 foram escolhidos para estudo neste mestrado.

Como são peptídeos inéditos, é importante caracterizá-los em relação à hidrofobicidade, por exemplo, e às suas estruturas. Por meio dos cromatogramas é possível calcular a porcentagem de solução apolar pelo qual cada peptídeo tem mais afinidade, conforme descrito no item 2 dos métodos. A sequência com maior afinidade pela acetonitrila (mais hidrofóbica) foi p-MRPS36 (33%), seguida por p-FABP7 (22,2%), p-EEAT2 (20,1%), p-MARCKS1B (13,2%) e p-Tbeta4 (12%). Essa informação será importante em etapas futuras do estudo destas moléculas já que podem definir ou impedir determinada forma de administração em mamíferos, por exemplo.

É possível comparar a estrutura secundária indicada pelo espectro DC de cada peptídeo com as respectivas proteínas precursoras. FABP7 possui dobramento em folha- β na maior parte de sua estrutura, mas apresenta duas áreas próximas em hélice, que é onde p-FABP7 está localizado (Lenz *et al.*, 2023). Porém, o espectro DC do p-FABP7 (Figura 5A) indica uma estrutura aleatória para este peptídeo em todos os pHs estudados e também em TFE.

MRPS36 tem uma estrutura aleatória com quatro áreas distantes que se desenvolvem em hélice (Hevler *et al.*, 2023). Seu espectro DC do p-MRPS36 (Figura 5B) indica que em todos os pHs estudados este peptídeo permanece com uma estrutura aleatória, mas em TFE seu perfil muda para um helicoidal, mostrando que esta configuração é possível.

Os peptídeos p-MARCKS1B (Figura 5C) e p-EEAT2 (Figura 5D) tiveram resultados semelhantes: seus espectros mostram que nos 3 pHs estudados e também em TFE ambos os peptídeos permaneceram em estrutura randômica. A proteína 1-B relacionada à MARCKS tem uma estrutura predominantemente aleatória (Brudvig; Weimer, 2015), enquanto EEAT2 tem uma estrutura majoritariamente em hélice (Zhang *et al.*, 2022).

Em relação ao Tbeta, o peptídeo precursor de 43 aminoácidos tem principalmente uma forma aleatória, mas possui duas hélices em sua estrutura (Hoch; Volk, 2016). O DC de p-Tbeta4 (Figura 5E) indica que o peptídeo derivado mantém uma estrutura aleatória nos pHs estudados, mas em TFE o perfil muda para o de hélice.

A respeito da citotoxicidade, duas linhagens celulares foram usadas para realização de ensaios de viabilidade celular por MTT. Este ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível (Ghasemi *et al.*, 2021). O ensaio foi realizado em linhagem de neuroblasto de camundongo e também em uma sublinhagem clonada de neuroblastoma humano. Foi realizada uma diluição seriada de 512 μ M até 1 μ M de cada peptídeo. Em ambas as linhagens, nenhum peptídeo apresentou diferença estatisticamente significativa com o grupo controle em nenhuma das concentrações estudadas (Figuras 7 e 8).

Ainda se referindo à toxicidade, o ensaio de embriotoxicidade em zebrafish foi feito com apenas duas concentrações de cada peptídeo devido às limitações de quantidade de material. Isso impossibilitou o cálculo da concentração letal de 50% dos embriões (LC_{50}), que é uma informação importante para seguir para fases mais avançadas do estudo dessas moléculas como ferramenta contra a DP. A possibilidade de repetir esse ensaio no Brasil está sendo estudada e possivelmente acontecerá em um momento futuro. Essa repetição será importante não apenas para o cálculo da LC_{50} , mas também para melhor compreensão dos resultados obtidos nos ensaios realizados. Tratamento com todos os peptídeos, com exceção de p-FABP7 a 50 μ M, levou à morte de alguns embriões, porém sem nenhuma apresentação prévia de traço de toxicidade. Além disso, não é possível traçar um padrão em relação às mortes. Por exemplo, o

tratamento com p-MRPS36 a 50 μ M causou 29,16% de letalidade, enquanto tratamento com o mesmo peptídeo a 100 μ M causou apenas 16,66% de letalidade. O motivo disto não ficou totalmente claro, mas é possível que tenha relação com a forma de decorionização escolhida, ou ainda com a própria manipulação dos embriões durante o emplacamento e tratamento.

Apesar do ensaio comportamental ter sido realizado com a intenção de observar apenas o comportamento das larvas de zebrafish após o tratamento descrito nos métodos, seus resultados demonstraram que o tratamento agudo com cada peptídeo em concentrações de até 50 μ M não é tóxico. É possível afirmar isso já que não houve letalidade após a imersão por 24 h dos embriões em solução com diferentes concentrações das moléculas em questão. Para além disso, tratamento com todos os peptídeos nas concentrações de 40 μ M e 50 μ M demonstraram recuperação estatisticamente significativa da função motora dos animais observados. Tratamento com p-FABP7, p-MRPS36 e p-Tbeta4 a 50 μ M resultou em resultados estatisticamente iguais aos do grupo controle nos dois parâmetros analisados, que foram velocidade média do nado e distância total nadada. É possível que esses resultados tenham relação com a função das proteínas precursoras de cada peptídeo, o que será discutido a seguir.

O primeiro peptídeo, p-FABP7, é derivado da proteína de ligação a ácidos graxos 7. As proteínas de ligação a ácidos graxos (FABPs) são proteínas de baixo peso molecular (~15 kDa) que servem como chaperonas para moléculas hidrofóbicas, como ácidos graxos, e estão envolvidas no metabolismo, transdução de sinal e regulação genética (Islam *et al.*, 2019). Islam e colaboradores (2019) demonstraram que o aumento de FABP7 eleva a expressão de enzimas antioxidantes e protege contra a sinalização de apoptose, podendo ser por isso que esta sequência a 50 μ M recuperou o movimento dos embriões a ponto de ser estatisticamente igual ao grupo controle. Esta sequência a 50 μ M também causou uma tendência de aumento em sua fluorescência anti-TH em comparação com os grupos 6-OHDA e controle.

Os embriões tratados com p-MRPS36, derivado da proteína ribossômica mitocondrial S36 (MRPS36), também tiveram melhora significativa em seu movimento a 50 μ M, a ponto de ser estatisticamente igual ao grupo controle. Hevler *et al.* (2023) sugerem que MRPS36 evoluiu como uma proteína adaptadora E3, substituindo funcionalmente o domínio de ligação à subunidade periférica no

complexo eucariótico 2-oxoglutarato desidrogenase. Em outras palavras, o MRPS36 pode ter um papel na geração de NADH na respiração aeróbica. Considerando a correlação entre doenças neurodegenerativas e atividade reduzida das mitocôndrias (Compagnoni *et al.*, 2020), p-MRPS36, que é um fragmento do MRPS36, pode melhorar a funcionalidade motora neste modelo de 6-OHDA através de sua ação na geração de NADH. Esta sequência apresentou uma fluorescência anti-TH ligeiramente superior em comparação com os grupos 6-OHDA e controle, mas não o suficiente para ser estatisticamente significativa.

O tratamento com o terceiro peptídeo, p-MARCKS1B, também resultou em melhora significativa do movimento a 40 e 50 μ M, embora não o suficiente para ser estatisticamente igual ao grupo controle. Este peptídeo é derivado da região C-terminal da proteína 1-B do substrato C quinase rico em alanina miristoilada (proteína 1-B relacionada a MARCKS). As proteínas desta família controlam o movimento celular através da regulação do citoesqueleto de actina, envolvido na formação de filopódios e lamelipódios, sendo altamente conservados entre os vertebrados. As proteínas relacionadas ao MARCKS desempenham vários papéis relacionados ao crescimento cerebral, migração neuronal, crescimento de neuritos, liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica (Amri *et al.*, 2018), estes dois últimos possivelmente explicando a recuperação do movimento em comparação com o grupo 6-OHDA e também sua fluorescência ligeiramente maior em comparação com os grupos 6-OHDA e controle.

O peptídeo p-EEAT2 é derivado do Transportador Excitatório de Aminoácidos 2 (*Excitatory Amino Acid Transporter 2* - EAAT2), uma proteína com papel essencial na reciclagem do glutamato, o neurotransmissor mais abundante no cérebro dos mamíferos (Fontana *et al.*, 2023). Um estudo de Trudler *et al.* (2021) sugere que os oligômeros de α -sinucleína, que estão presentes nos corpos de Lewy, induzem a liberação de glutamato dos astrócitos, causando receptores extra-sinápticos excessivos de N-metil-D-aspartato, que estão ligados à neurodegeneração. Assim, é possível que p-EEAT2 tenha tido um papel importante na recuperação do movimento neste modelo por ser derivado de uma proteína envolvida na reciclagem do glutamato. Em relação à fluorescência anti-TH, p-EEAT2 foi o peptídeo que apresentou maior fluorescência entre os cinco peptídeos estudados, embora não tenha sido o que apresentou melhor recuperação de movimento no ensaio comportamental.

O último peptídeo estudado foi p-Tbeta4 e é derivado da Timosina beta-4 (Tbeta4), um peptídeo de 43 aminoácidos cuja principal função é regular a polimerização da actina, necessária para a organogênese e a motilidade celular (Olianas *et al.*, 2021). Além disso, estudos com Tbeta4 indicam que é um peptídeo que auxilia na recuperação miocárdica em casos pós-infarto através da migração celular, bem como na recuperação da córnea (Xing *et al.*, 2021) e fígado (Yang *et al.*, 2020). Há também evidências de que o Tbeta4 auxilia no tratamento da esclerose múltipla através da recuperação da funcionalidade neuronal (Zhang *et al.*, 2019), bem como na melhora de lesões induzidas pela privação de oxigênio-glicose (Zhang *et al.*, 2019) e reversão de comprometimento cognitivo em ratos (Wang *et al.*, 2021). Em outras palavras, o Tbeta4 pode ser um aliado na recuperação neuronal, e possivelmente este peptídeo derivado também o é, como sugerem os resultados. O tratamento a 50 μ M foi estatisticamente igual ao do grupo controle, sugerindo uma recuperação total dos movimentos.

É interessante notar que os peptídeos que tiveram melhores resultados no ensaio comportamental, p-FABP7, p-MRPS36 e p-Tbeta4, apresentaram fluorescência muito semelhante ou ligeiramente inferior ao grupo controle. Por outro lado, p-EEAT2, que teve a menor recuperação de movimento no ensaio comportamental, teve a maior fluorescência entre todos os peptídeos. Isto sugere que os peptídeos podem superestimular os neurônios e até mesmo que isso poderia prejudicar ou perturbar a recuperação do movimento.

6 CONCLUSÃO

A síntese, purificação e caracterização dos cinco peptídeos foram realizadas com sucesso. Em soluções aquosas em pHs 5, 7,4 e 10, todos os peptídeos mantiveram uma estrutura secundária randômica. Em TFE, p-MRPS36 e p-Tbeta4 apresentaram um perfil de hélice. Nenhum dos peptídeos apresentou citotoxicidade em nenhuma das linhagens celulares estudadas, nem na maior concentração observada. Isso sugere que são moléculas que podem ser usadas com segurança. Essa informação é apoiada pelos resultados do ensaio comportamental em larva de zebrafish, que indica que todos os peptídeos ajudam a recuperar o comprometimento motor causado pelo tratamento com 6-OHDA nas duas maiores concentrações estudadas (40 μ M e 50 μ M). Três peptídeos tiveram destaque no tratamento a 50 μ M por não demonstrarem diferença estatística em comparação ao grupo controle. Isso pode indicar que p-FABP7, p-MRPS36 e p-Tbeta4 levaram a uma recuperação completa do comprometimento físico do modelo. É importante mencionar que o modelo transgênico do zebrafish não foi o ideal para observar a neurodegeneração por 6-OHDA. Isto provavelmente ocorreu porque 6-OHDA é especificamente uma neurotoxina catecolaminérgica (Glinka *et al.*, 1997), e ambos os fatores NeuroD e HuC estão envolvidos em diferentes desenvolvimentos neurológicos e estágios de diferenciação (Thomas *et al.*, 2012; Park, *et al.*, 2000), o que torna mais difícil observar os efeitos em um pequeno grupo de neurônios específicos. Em relação à imunofluorescência anti-tirosina hidroxilase, o tratamento com nenhum dos peptídeos resultou em diferença estatisticamente significativa, mas os resultados sugerem que todos os peptídeos, exceto o p-Tbeta4, estimulam os neurônios catecolaminérgicos um pouco mais do que o grupo controle. Ou seja, existe uma tendência de estímulo deste grupo neuronal por estas moléculas. Mais estudos são necessários para entender melhor o mecanismo de ação de cada peptídeo, bem como para garantir a segurança dessas moléculas em tratamentos de longo prazo e compreender melhor como explorar seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIJANPOUR, S.; MIRYOUNESI, M.; GHAFOURI-FARD, S. The role of excitatory amino acid transporter 2 (EEAT2) in epilepsy and other neurological disorders. *Metabolic Brain Disease*, v. 38, p. 1-16, 2023. DOI: 10.1007/s11011-022-01091-5.
- ÁLVAREZ, G. *et al.* Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules*, v. 22, n. 5, p. 709, 2017. DOI: 10.3390/molecules22050709.
- AMRI, M.; FITZGERALD, U.; SCHLOSSER, G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *Journal of Biomedical Science*, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/s12929-018-0445-1.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, v. 323, p. 548–560, 2020.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. CCL-131. *Neuro-2a. Animal cells*. United States of America: American Type Culture Collection, [2024]. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-131/>. Acesso em: 23 nov. 2024.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. CRL-2266. *SH-SY5Y. Human cells*. United States of America: American Type Culture Collection, [2024]. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2266>. Acesso em: 23 nov. 2024.
- BACON, J. M.; JONES, J. L.; LIU, G.; DICKINSON, J.; RASPIN, K. Mitochondrial ribosomal proteins in metastasis and their potential use as prognostic and therapeutic targets. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 43, p. 1119-1135, 2024. DOI: 10.1007/s10555-024-10216-4.
- BEHL, T. *et al.* Exploring the role of Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 59, p. 4257-4273, 2022. DOI: 10.1007/s12035-022-02851-1.
- BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. *Lancet*, v. 397, p. 2294-2303, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
- BONAFEDE, R.; MARIOTTI, R. ALS pathogenesis and therapeutic approaches: the role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, 2017. DOI: 10.3389/fncel.2017.00080.
- CAMACHO-SOTO, A. *et al.* Traumatic brain injury in the prodromal period of Parkinson's disease: a large epidemiological study using Medicare data. *Annals of Neurology*, v. 82, n. 5, p. 744-754, 2017. DOI: 10.1002/ana.25074.
- CHIA, K. *et al.* Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2022. DOI: 10.3389/fnmol.2022.940484.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90396-4.

CIECHANOVER, A.; KWON, Y. T. Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 2017. DOI: 10.3389/fnins.2017.00185.

COMPAGNONI, G. M. et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 57, p. 2959-2980, 2020. DOI: 10.1007/s12035-020-01926-1.

DOVONOU, A. et al. Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Translational Neurodegeneration*, v. 12, p. 36, 2023. DOI: 10.1186/s40035-023-00368-8.

DOYLE, J. M.; CROLL, R. P. A critical review of zebrafish models of Parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 835827, 2022. DOI: 10.2289/fphar.2022.835827.

EBRAHIMI, M. et al. Astrocyte-expressed FABP7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic function of cortical neurons. *Wiley Periodicals*, 2015. DOI: 10.1002/glia.22902.

FIAMETTI, L. O.; CORREA, C. N.; CASTRO, L. M. Peptide profile of zebrafish brain in a 6-OHDA-induced Parkinson model. *Zebrafish*, v. 18, n. 1, 2021. DOI: 10.1089/zeb.2020.1945.

FONTANA, I. C. et al. A medicinal chemistry perspective on excitatory amino acid transporter 2 dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 66, p. 233-2347, 2023. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c015272.

GARCÍA, D. S. et al. Non-motor symptoms burden, mood, and gait problems are the most significant factors contributing to a poor quality of life in non-demented Parkinson's disease patients: Results from the COPPADIS Study Cohort. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 66, p. 151-157, 2019. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2019.07.031.

GERSTNER, J. R. et al. FABP7: a glial integrator of sleep, circadian rhythms, plasticity and metabolic function. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 17, 2023. DOI: 10.3389/fnsys.2023.1212213.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021. DOI: 10.3390/ijms222312827.

GHAVAMI, S. et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, v. 112, p. 24-49, 2014. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YODIM, M. B. H. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. In: RIEDERER, P.; CALNE, D. B.; HOROWSKI, R.; MIZUNO, Y.;

POEWE, W.; YODIM, M. B. H. (eds.). *Advances in Research on Neurodegeneration*. Journal of Neural Transmission. Supplementa, v. 50. Springer, Vienna, 1997. DOI: 10.1007/978-3-7091-6842-4_7.

GOMES, A. *et al.* Protective effects of 24-epibrassinolide against the 6-OHDA zebrafish model of Parkinson's disease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 269, p. 109630, 2023. DOI: 10.1016/j.cbpc.2023.109630.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxidopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model. *Neurology*, v. 32, p. 533-539, 2017.

HEVLER, J. F. *et al.* MRPS36 provides a structural link in the eukaryotic 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Open Biology*, v. 13, p. 220363, 2023. DOI: 10.1098/sob.220363.

HUGHES, G. I. *et al.* Machine learning discriminates a movement disorder in a zebrafish model of Parkinson's disease. *Disease Models & Mechanisms*, v. 13, p. dmm045815, 2020. DOI: 10.1242/dmm.045815.

IOGHEN, O. C.; CEAALAN, L. C.; POPESCU, B. O. SHSY5Y cell line in vitro models for Parkinson disease research - old practice for new trends. *Journal of Integrative Neuroscience*, v. 22, n. 1, p. 20, 2023. DOI: 10.31083/j.jin2201020.

ISLAM, A. *et al.* FABP7 protects astrocytes against ROS toxicity via lipid droplet formation. *Molecular Neurobiology*, v. 56, p. 5763-5779, 2019. DOI: 10.1007/s12035-019-1489-2.

JOST, S. T. *et al.* Levodopa dose equivalency in Parkinson's disease: updated systematic review and proposals. *Movement Disorders*, v. 38, n. 7, p. 1236-1252, 2023. DOI: 10.1002/mds.29410.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970. DOI: 10.1016/0003-2697(70)90146-6.

LENZ, S. *et al.* Understanding FABP7 binding to fatty acid micelles and membranes. *Biophysical Journal*, v. 122, p. 603-615, 2023. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.01.023.

MACCHI, Z. A. *et al.* Patient and caregiver characteristics associated with caregiver burden in Parkinson's disease: a palliative care approach. *Annals of Palliative Medicine*, v. 9, suppl. 1, p. S24-S33, 2020. DOI: 10.21037/apm.2019.10.01.

MACKAY, D. F. *et al.* Neurodegenerative disease mortality among former professional soccer players. *New England Journal of Medicine*, v. 381, p. 1801-1808, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1908483.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

NIXON, R. A.; RUBINSZTEIN, D. C. Mechanisms of autophagy-lysosome dysfunction in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 25, p. 926-946, 2024. DOI: 10.1038/s41580-024-00757-5.

Novabiochem catalog. Peptide Synthesis. Merck KGaA, p. 3.28, 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD guideline for the testing of chemicals: Fish Embryo Toxicity (FET) test*. France: Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline 236, [2024]. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/36817070>. Acesso em: 23 fev. 2024.

OKADA, Y. *et al.* Effectiveness of long-term physiotherapy in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 11, n. 4, 2021. DOI: 10.3233/JPD-212782.

OLIANAS, A. *et al.* Thymosin β 4 and β 10 are highly expressed at the deep infiltrative margins of colorectal cancer - a mass spectrometry analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 25, p. 7285-7296, 2021. DOI: 10.26355/eurev_202112_27422.

PRABHA, N. *et al.* Neuroprotective and antioxidant capability of RW20 peptide from histone acetyltransferases caused by oxidative stress-induced neurotoxicity in in vivo zebrafish larval model. *Journal of King Saud University - Science*, v. 34, p. 101861, 2022.

RAZALI, K. *et al.* The promise of the zebrafish model for Parkinson's disease: today's science and tomorrow's treatment. *Frontiers in Genetics*, v. 12, p. 655550, 2021. DOI: 10.3389/fgene.2021.655550.

RODRÍGUEZ, M. A. *et al.* Vigorous aerobic exercise in the management of Parkinson disease: a systematic review. *PM&R*, v. 13, n. 8, p. 890-900, 2020. DOI: 10.1002/pmrj.12500.

ROMERO, A. *et al.* Optimization of zebrafish larvae 6-OHDA exposure for neurotoxin-induced dopaminergic marker reduction. *Zebrafish*, v. 21, n. 4, 2024. DOI: 10.1089/zeb.2023.0098.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Tools and method for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chemical Society Reviews*, v. 50, p. 8400, 2021. DOI: 10.1039/d0cs0058d.

SAHOO, S. *et al.* Role of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in a α -synuclein aggregate clearance. *Molecular Neurobiology*, v. 59, p. 5379-5407, 2022. DOI: 10.1007/s12035-022-0287-1.

SHAHMORADIAN, S. H. *et al.* Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature Neuroscience*, v. 22, n. 7, p. 1109-1119, 2019. DOI: 10.1038/s41593-019-0423-2.

SHRADER, M.; FRICKER, L. D. Current challenges and future directions in peptidomics. *Methods in Molecular Biology*, v. 2758, 2024. DOI: 10.1007/978-1-0716-3646-6_26.

TRUDLER, D. *et al.* α -synuclein oligomers induce glutamate release from astrocytes and excessive extrasynaptic NMDAR activity in neurons, thus contributing to synapse loss. *Neurobiology of Disease*, v. 41, n. 10, p. 2264-2273, 2021. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1871-20.2020.

TSOI, P. S. *et al.* Aggregation of disordered proteins associated with neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 4, p. 3380, 2023. DOI: 10.3390/ijms24043380.

TWOHIG, D.; NIELSEN, H. M. α -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, v. 14, p. 23, 2019. DOI: 10.1186/s13024-019-0320-x.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, p. 107-110, 1968.

VAZ, R. L. *et al.* Identification of antiparkinsonian drugs in the 6-hydroxydopamine zebrafish model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 189, 2019. DOI: 10.1016/j.pbb.2019.172828.

VIEJO, L. *et al.* Systematic review of human post-mortem immunohistochemical studies and bioinformatics analyses unveil the complexity of astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 48, n. 1, e12753, 2021. DOI: 10.1111/nan.12753.

VINCENZI, M.; MERCURIO, F. A.; LEONE, M. About TFE: old and new findings. *Current Protein and Peptide Science*, v. 20, n. 5, p. 425-451, 2019.

WANG, M. *et al.* Thymosin β reverses phenotypic polarization of glial cells and cognitive impairment via negative regulation of NF- κ B signaling axis in APP/PS1 mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 18, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s12974-021-02166-3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Parkinson disease: a public health approach. *Technical brief*. Geneva: World Health Organization, 2022. Licence: CC BY-NC-SA 2.0 IGO.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, v. 12, p. 10, 2017.

XING, Y. *et al.* Progress on the function and application of Thymosin β 4. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.767785.

YANG, L. *et al.* *Gene*, v. 758, 144946, 2020. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144946.

ZHANG, Z.; LIU, S.; HUANG, S. Thymosin β 4 prevents oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury in rat cortical neurons. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 15, p. 2385-2393, 2019. DOI: 10.2147/NDT.S208600.

ZHANG, Z. *et al.* Structural basis of ligand binding modes of human EEAT2. *Nature Communications*, v. 13, 3329, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-31031-x.