



PADRONIZAÇÃO DE NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS EM
CÉLULAS NEURO2A E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMO E
EFEITO DO PEPTÍDEO NFKF

BEATRIZ BARNI BATISTA

SÃO VICENTE – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

PADRONIZAÇÃO DE NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS EM
CÉLULAS NEURO2A E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMO E EFEITO
DO PEPTÍDEO NFKF

Beatriz Barni Batista

Profº Dr. Leandro Mantovani de Castro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de grau de Bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Gerenciamento Costeiro.

SÃO VICENTE - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

B333p Batista, Beatriz Barni
 Padronização de neurodegeneração induzida por drogas em células
 Neuro2-a e avaliação da atividade do proteassomo e efeito do peptídeo
 NFKF / Beatriz Barni Batista. -- São Vicente, 2023
 31 p. : il., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
 Orientador: Leandro Mantovani de Castro

 1. Doenças neurodegenerativas. 2. Via proteassomal. 3. Neuro-2a. 4. Peptídeos bioativos. 5. NFKF. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à vida, por me guiar até esse momento.

À Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP) e ao corpo docente e de funcionários pela oportunidade e pelo auxílio nos anos da minha formação.

Ao Prof^o Dr. Leandro Mantovani de Castro pela orientação e pelo imenso apoio e compreensão que tornaram essa realização possível e o caminho até ela mais leve.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Angelica Ottoni e ao projeto de extensão Universidade Aberta à Terceira Idade, pelo acolhimento e confiança em todos esses anos.

À Tatiana e Patrícia Pacini, por me darem base e apoio para que eu seja o que quiser desde que cheguei ao mundo.

À minha avó, Leodetti Maria, por sempre acreditar em mim e à minha irmã, Isabelle Alves, pelo seu olhar sobre mim, que me inspira a ser melhor.

À turma XVII, pela união e por sempre compartilhar o conhecimento. Em especial, ao Douglas Gonçalves pela parceria que muitas vezes me salvou durante a graduação.

À república Fenda, por ter sido meu lar desde o dia em que cheguei e onde construí lembranças e laços que me sustentaram durante o curso e existirão para sempre no meu coração.

A todos os amores que me acompanharam e apoiaram, em algumas ou todas as fases desse caminho, em especial Débora Lopes, Elisa Ângelo, Cássia Alves, Henrique Silva, Marjorie Jasper, Mariana Esteves, Karla Rossi, Kaique Tavano, Gabriel Ferreira e Santana Oliveira.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O sistema ubiquitina-proteassomo é uma das principais vias de degradação de proteínas mal dobradas e agregados proteicos tóxicos, elementos abundantemente presentes em doenças como a Doença de Parkinson e algumas epilepsias. Falhas nesse sistema de controle de qualidade proteico são apontadas como potenciais fatores de risco ou causas para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. O presente estudo teve como objetivo padronizar o protocolo de neurodegeneração induzido pelas drogas Pentilenotetrazol e 6-hidroxiopamina em células Neuro-2a, através de ensaio de viabilidade celular pelo MTT e avaliar a alteração na atividade do proteassomo na presença de diferentes concentrações das drogas, bem como o efeito do peptídeo NFKF. O modelo induzido pelas concentrações 30 e 20mM de Pentilenotetrazol demonstrou diminuição da atividade do proteassomo em medida semelhante à diminuição da viabilidade celular, enquanto o modelo induzido por 75 e 50 μ M de 6-hidroxiopamina demonstrou atividade catalítica reduzida precocemente. O peptídeo NFKF foi aplicado nas concentrações 10, 25, 50 e 100 μ M e não demonstrou efeito significativo sobre os dois modelos em nenhuma delas.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas. Atividade do proteassomo. Neuro-2a. NFKF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	7
1.1 Desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas	7
1.1.1 Epilepsia	8
1.1.2 Doença de Parkinson	9
1.2 Sistema ubiquitina-proteassomo	11
1.2.1 Sistema ubiquitina-proteassomo e doenças neurodegenerativas	13
1.3 Neuro2a como modelo de estudo de processos neurodegenerativos induzido por drogas	15
1.4 Peptídeo NFKF	16
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Cultura de células	17
3.2 Tratamento com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e pentilenotetrazol (PTZ)	17
3.3 Ensaio de viabilidade celular MTT	17
3.4 Ensaio de atividade do proteassomo	18
4. RESULTADOS	18
4.1 Estabelecimento da linhagem celular e indução da neurodegeneração por drogas	18
4.2 Avaliação da atividade do proteassomo	20
4.3 Avaliação do efeito do peptídeo nfkf na viabilidade celular frente a neurodegeneração induzida por droga	21
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

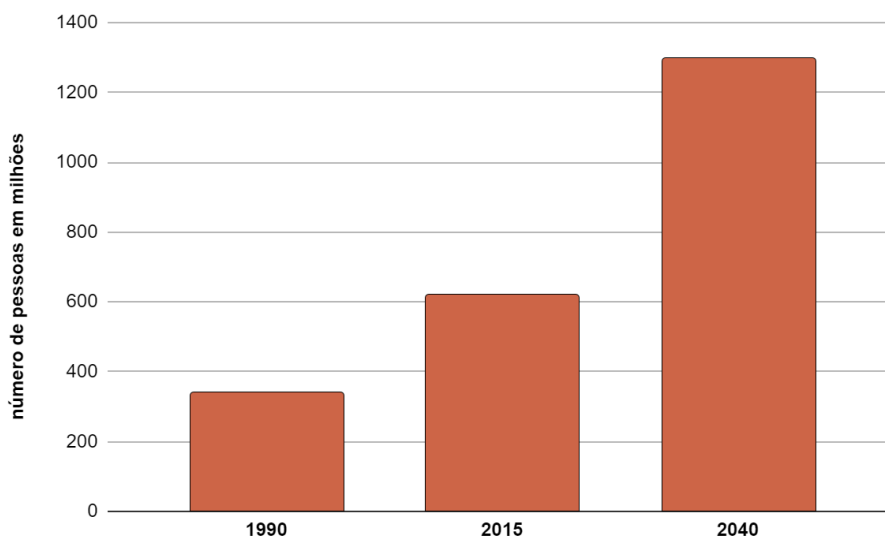
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas

Desordens neurológicas são desarranjos que afetam um ou mais elementos do sistema nervoso e são determinadas de acordo com a estrutura acometida. Sua origem pode ser hereditária, provocada por danos físicos no cérebro, nervos ou medula espinhal, associada a outras doenças e infecções ou desconhecida. Em sua maioria, possuem caráter crônico e são acompanhadas por comorbidades (AAIDD, 2010).

Doenças neurodegenerativas são definidas pela disfunção e morte progressiva de neurônios e embora apresentem etiologia e características fisiopatológicas distintas, compartilham de processos fundamentais como estresse proteotóxico, falha nos sistemas de controle de qualidade de proteínas, estresse oxidativo e neuroinflamação (Dugger & Dickson, 2017). A prevalência dessas doenças têm aumentado, entre outros fatores, devido ao envelhecimento da população. Essa transição demográfica em curso, conforme a projeção indicada na figura 1, demanda avanços nas técnicas de diagnóstico e tratamento, que hoje têm eficácia limitada, em parte, pelo conhecimento ainda elusivo acerca da etiologia e fisiopatologia dessas doenças (Heemels, 2016; Oliveira, 2019).

Figura 1 — Estimativa da população global acima de 65 anos entre 1990 e 2040



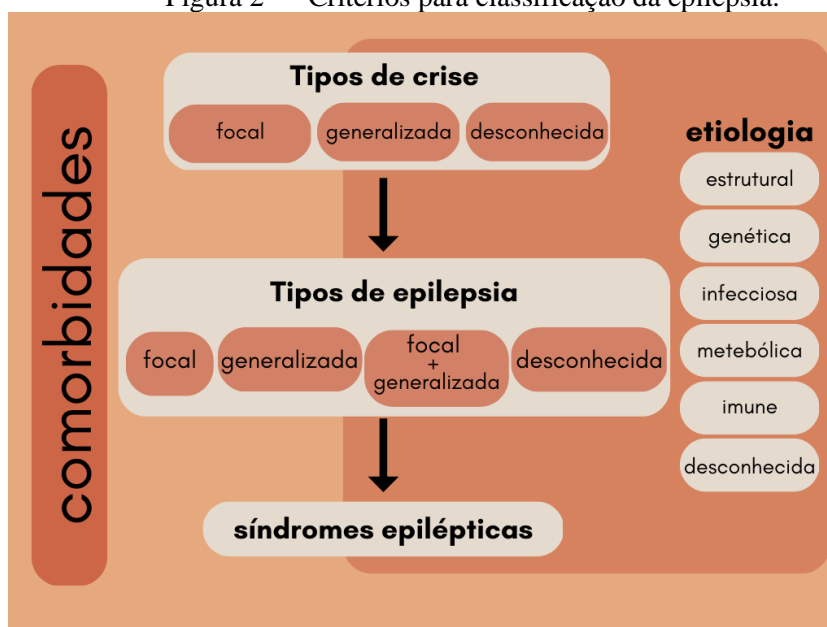
Fonte: Adaptado de DORSEY (2018)

1.1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns, atingindo aproximadamente 1% da população mundial. É caracterizada pela predisposição a convulsões recorrentes e não-provocadas que se dão devido ao desequilíbrio entre os circuitos neuronais inibitórios e excitatórios, e afetam o controle dos músculos, comportamento, sensibilidade e consciência da pessoa acometida (Di et al., 2016; World Health Organization, 2019).

O diagnóstico de epilepsia se dá a partir da apresentação de um conjunto bem definido de sintomas, e a partir daí busca-se primeiramente classificar a epilepsia pelo tipo de crise, seguido de tipo de epilepsia e posteriormente, em muitos casos, é possível identificar uma síndrome epiléptica específica. Simultaneamente, é investigada a etiologia, que segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser classificada em: estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imune ou desconhecida (Fisher et al., 2014; Scheffer et al., 2017; World Health Organization, 2019). Além das convulsões recorrentes, a epilepsia vem acompanhada de comorbidades cognitivas, psicológicas e sociais que impactam profundamente a vida das pessoas acometidas (figura 2).

Figura 2 — Critérios para classificação da epilepsia.



Fonte: Adaptado de SCHEFFER (2017)

O principal tratamento é focado no controle das crises, através do uso de drogas antiepiléticas (DAE), que são selecionadas a partir do quadro clínico e histórico apresentados. O tratamento mais indicado baseia-se em monoterapia, entretanto não havendo reação ao primeiro medicamento utilizado, recomenda-se outras duas tentativas de monoterapia com

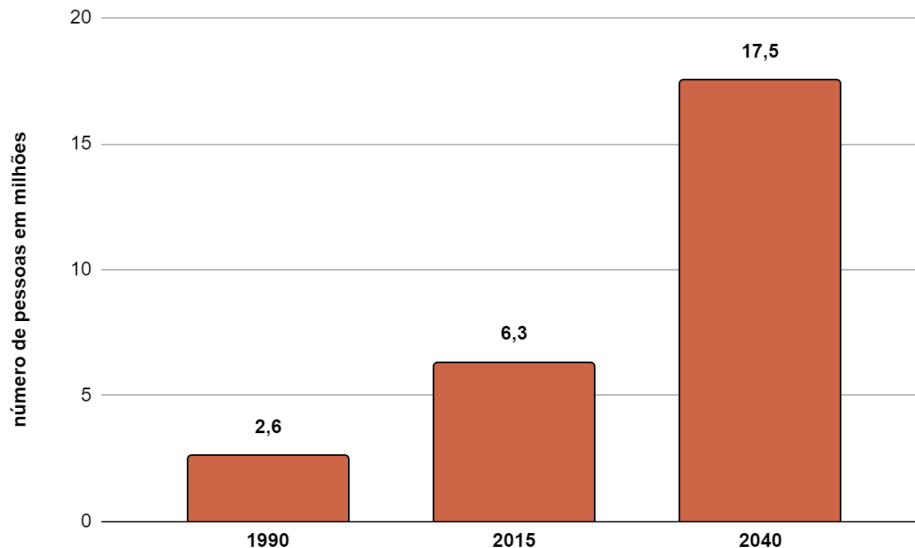
drogas diferentes, seguidas de uma ou duas tentativas de medicamentos combinados e em último caso, avaliação para intervenção cirúrgica (Poliquin & Kang, 2022).

Visto que cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento com DAE e mais de 5 milhões de casos incidem todos os anos, número que tende a crescer devido ao aumento na expectativa de vida e na taxa de sobrevivência à danos advindos de episódios epiléticos, se faz necessária maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da epilepsia para que sejam desenvolvidas terapias mais eficientes (World Health Organization, 2019).

1.1.2 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é a 2ª doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, sendo a primeira a Doença de Alzheimer. Estimativas apontam mais de 8.5 milhões de pessoas acometidas até 2019, e há projeções de que em 2040 esse número chegue a 17.5 milhões (figura 3) (Dorsey et al., 2018; World Health Organization, 2022). A DP se manifesta geralmente entre os 50 e os 80 anos de idade, com pico na 7ª década (Feigin et al., 2019).

Figura 3 — Estimativa do número de pessoas com Parkinson entre 1990 e 2040



Fonte: Adaptado de DORSEY (2018)

A DP se dá majoritariamente (85-95%) de forma esporádica, tendo sua origem relacionada, entre outras causas, ao envelhecimento e a fatores ambientais como exposição a metais pesados e pesticidas. Uma minoria dos casos (5-15%) é associada unicamente a fatores genéticos e existem ainda casos provocados pela interação genética-ambiente, onde indivíduos geneticamente vulneráveis são mais propensos a desenvolver a doença após exposição a fatores ambientais de risco (Ball et al., 2019; El-Gamal et al., 2021).

Atingindo tanto o sistema nervoso central quanto o periférico, a DP leva a uma gama de sintomas motores como tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural e sintomas não motores como distúrbios do sono, disfunção cognitiva e disfunções de comportamento (Cabreira & Massano, 2019; Lang & Espay, 2018).

Um marcador patológico bem definido da DP é a agregação anômala da proteína alfa-sinucleína no tecido neural e consequente formação dos corpos de Lewy, cujo acúmulo provoca o processo de neurodegenerescência, que evolui e se propaga pelo sistema nervoso até a *substantia nigra pars compacta*, levando à perda de neurônios dopaminérgicos e à apresentação dos sintomas motores (Cabreira & Massano, 2019). No entanto, ainda não é conhecido um biomarcador ou teste que garanta a confirmação do diagnóstico de DP *in vivo*, exceto alguns testes genéticos específicos, úteis para aconselhamento genético, mas que não causam grande impacto no tratamento (Ferreira & Massano, 2017; Massano & Bhatia, 2012). Testes como a detecção de alfa-sinucleína na pele, retina, urina, plasma e líquido cefalorraquidiano vem sendo estudada como possível biomarcador da doença, embora os resultados até o momento não sejam suficientes para sua aplicação clínica (Goldman et al., 2018). O diagnóstico, portanto, é complexo e tem base na confirmação de sintomas clínicos característicos de parkinsonismo - designação de um conjunto de sintomas presentes em diversas doenças-, histórico clínico e exames detalhados, que poderão excluir outras causas de tais sintomas (Massano & Bhatia, 2012). Recentemente, a *International Parkinson and Movement Disorder Society*, a fim de aumentar a precisão diagnóstica, sugeriu novos critérios para o reconhecimento da doença, com foco principalmente na exclusão de outras causas de parkinsonismo e identificação de *red flags* (Postuma et al., 2015).

Exames que já são realizados ou se encontram em fase de estudos podem auxiliar no aumento da especificidade diagnóstica, bem como na identificação de biomarcadores e sinalização de outras causas de parkinsonismo. No entanto, devido ao alto custo e outras limitações, esses métodos ainda não são aplicados na maioria dos casos (Cabreira & Massano 2019).

As terapias hoje disponíveis não são capazes de parar a neurodegeneração ou substituir os neurônios perdidos, mas podem melhorar os sintomas através de tratamento individualizado e realizado por equipe multidisciplinar com administração de fármacos. Agonistas dopaminérgicos como a Levodopa são comumente usados no estágio inicial da doença, tendo um bom resultado sobre os sintomas motores, mas a longo prazo apresentam um sério risco de efeitos colaterais que podem atingir diversos sistemas no organismo da pessoa afetada (Lorente-picón & Laguna, 2021).

Muitos estudos na área da neurociência têm como objetivo desvendar a fisiopatologia da DP, a fim de estabelecer diagnósticos mais acessíveis e novos alvos para o desenvolvimento de drogas e um dos principais desafios se dá pelo envolvimento de diversas vias no processo neurodegenerativo da doença.

1.2 Sistema ubiquitina-proteassomo

As proteínas desempenham papel importante na maioria das reações em um organismo, e o equilíbrio entre sua síntese e degradação, a proteostase, é fundamental para o bom funcionamento deste. No entanto, o processo de síntese e enovelamento é complexo e envolve muitas falhas, o que gera proteínas mal dobradas que, além de não cumprirem sua função, podem formar agregados tóxicos para as células. Para evitar isso, existem mecanismos de controle de qualidade nas células responsáveis por dar assistência no processo de enovelamento, degradar proteínas mal dobradas e agregados tóxicos e, em último caso, induzir morte celular programada (Poliquin & Kang, 2022).

Existem duas principais vias que degradam proteínas mal dobradas: a autofagia e o sistema ubiquitina-proteassomo (SUP). A forma principal de autofagia, a macrofagia, se dá através do engolfamento de componentes celulares grandes como organelas e agregados protéicos em compartimentos de membrana dupla que se fundem a lisossomos e são degradados por uma série de enzimas lisossomais (Rousseau & Bertolotti, 2018; Tanaka & Matsuda, 2014).

O SUP é responsável por degradar proteínas intracelulares regulatórias de vida curta ou mal dobradas a partir da marcação seletiva feita por ubiquitinas (figura 4). Essa marcação seletiva, chamada de ubiquitinação, acontece através da ação de três tipos de enzimas: ativadoras da ubiquitina (E1), conjugadoras de ubiquitina (E2) e ligases ubiquitina-proteína (E3). As E1 catalisam a ativação do grupo carboxílico da glicina localizado no C-terminal da ubiquitina, formando uma ligação tiol-éster entre E1 e ubiquitina, processo que consome ATP. Em seguida, a ubiquitina é transferida para o grupo tiol da enzima E2. A E3 faz o reconhecimento da proteína a ser degradada, e em seguida a ubiquitina ligada à E2 também se liga à proteína alvo através de uma ligação isopeptídica entre o resíduo glicina do C-terminal da ubiquitina e o grupo amina do resíduo de lisina da proteína. O processo de ubiquitinação acontece várias vezes até que se obtenha a cadeia poli-ubiquitina final, cujas ligações isopeptídicas são reconhecidas pelo proteassomo para degradação. Existem diversas enzimas E2 e E3, capazes de reconhecer múltiplos sinais de degradação e marcar diversos grupos protéicos intracelulares (Sousa, 2018).

O proteassoma 26s (figura 5) está presente nas células eucarióticas e possui 2.5MDa, sendo composto por uma porção central, a partícula catalítica 20s (PC) e duas porções periféricas, as partículas regulatórias 19s (PR) (Rousseau & Bertolotti, 2018; Tanaka & Matsuda, 2014).

A PC possui formato cilíndrico e é composta por 2 subunidades alfa e 2 subunidades beta, dispostas em quatro anéis heptaméricos empilhados na sequência $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. As subunidades- α funcionam como portões que barram proteínas não marcadas de acessarem a parte central e serem degradadas. As subunidades- β formam a câmara catalítica, onde estão contidos ao menos três sítios catalíticos: a subunidade β_1 , com atividade *caspase-like*, cliva ligações peptídicas após um resíduo ácido; a subunidade β_2 , com atividade *tripsina-like*, que cliva ligações após um resíduo básico; e a subunidade β_5 , com atividade *quimotripsina-like*, que cliva ligações após um resíduo hidrofóbico (Rousseau & Bertolotti, 2018).

As PR ficam dispostas uma de cada lado da PC, orientadas de forma oposta e são compostas por dois sub complexos: a tampa e a base. A tampa é formada por subunidades não ATPásicas e tem como principal função separar as proteínas das cadeias de ubiquitina, liberando as ubiquitinas no citoplasma para que realizem esse ciclo novamente. A base é formada por subunidades ATPásicas e não ATPásicas e tem três principais funções: reconhecer proteínas marcadas para degradação, desdobrá-las após a deubiquitinação e transportá-las ao centro catalítico, onde também tem participação na abertura das subunidades- α para entrada do substrato (Rousseau & Bertolotti, 2018; Tanaka, 2009; Tanaka & Matsuda, 2014; Sousa 2018).

Existe uma versão inativada do proteassoma no citoplasma, o proteassomo 20s, no qual peptídeos e polipeptídeos simples conseguem entrar e ser catalisador sem serem marcados e sem gasto energético. No entanto, substratos mais complexos precisam ser reconhecidos e transportados pelas PR presentes no proteassomo 26s (Sousa 2018).

Figura 4 — Funcionamento do Sistema ubiquitina-proteassomo

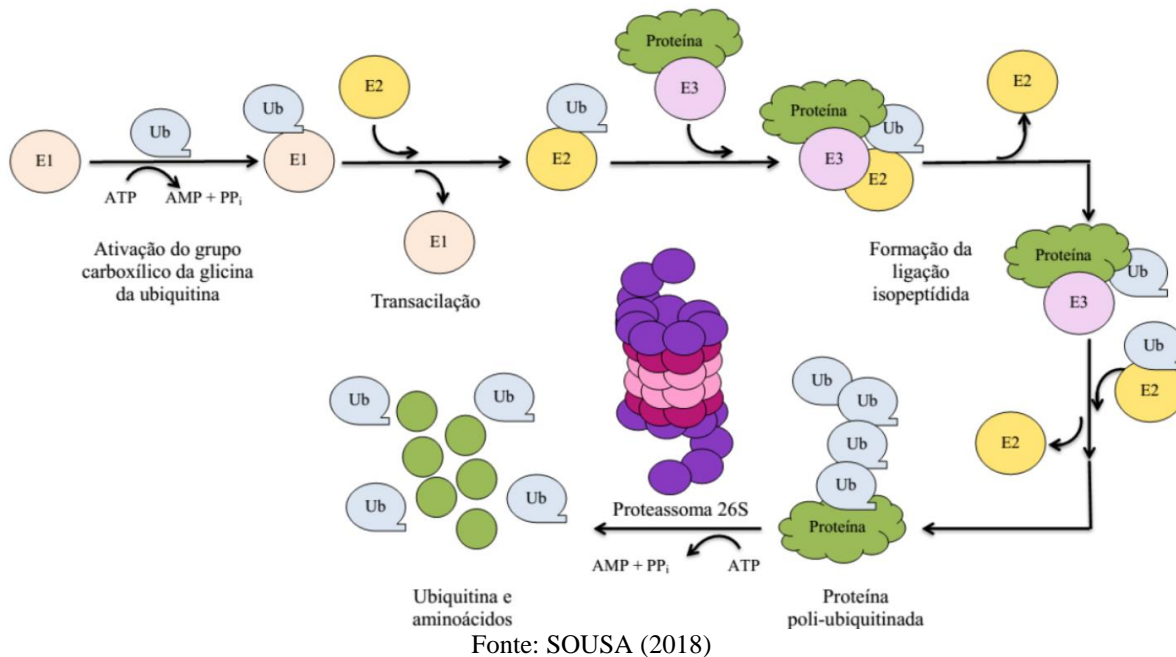
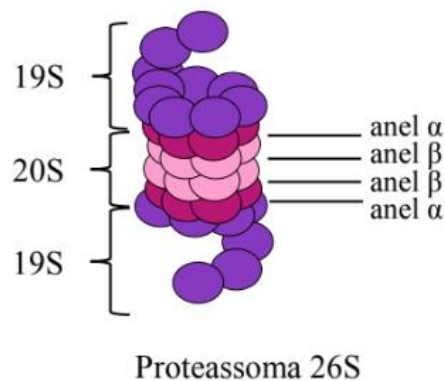


Figura 5 — Estrutura do proteassomo 26s



Fonte: SOUSA (2018)

1.2.1 Sistema ubiquitina-proteassomo e doenças neurodegenerativas

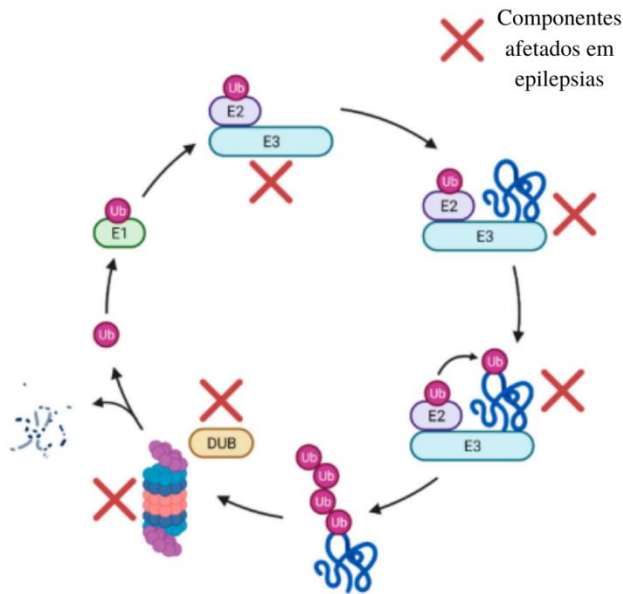
A agregação insolúvel de proteínas mal formadas é um marcador conhecido nas doenças neurodegenerativas, e há indicativos de que falhas na via de degradação proteossomal, uma das responsáveis por remover essas proteínas das células, são potenciais causas ou fatores de risco para a neurodegeneração (Rousseau & Bertolotti, 2018; Sheikh et al., 2013; Tanaka & Matsuda, 2014).

Uma das evidências que relacionam a disfunção no SUP com a DP é a identificação de proteínas ubiquitinadas nos corpos de Lewy, marcador característico da doença. Além disso, mutações responsáveis por inativar a enzima Parkin, uma E3 (ubiquitina-ligase) que marca proteínas a serem degradadas pelo SUP podem ser associadas à manifestação da DP esporádica

e genética, demonstrando a influência dessa via de degradação na fisiopatologia da DP. A inibição do proteassomo também já foi reportada como fator contribuinte para a neurodegeneração e formação de corpos de inclusão em diversos modelos de DP *in vivo* (Rezvani et al., 2012).

Epilepsias de origem genética se relacionam de algumas formas com a proteostase e o funcionamento do SUP, podendo afetar diversos componentes do processo de degradação proteica (figura 6). Esse sistema tem parte importante na atividade neuronal uma vez que regula proteínas pré e pós sinápticas, crescimento de dendritos e formação de novas sinapses (Poliquin & Kang, 2022). Além disso, a atividade excitatória excessiva característica das convulsões modula o funcionamento do proteassomo e pode alterar a expressão de proteínas sinápticas (Caldeira et al., 2013; Poliquin & Kang, 2022). Problemas na proteostase podem levar ao estresse de retículo endoplasmático, resposta adaptativa que estimula a degradação de proteínas. Nas epilepsias genéticas, devido à constante presença de proteínas mal dobradas, esse estresse pode ser estimulado e em excesso levar à apoptose, resposta que é observada em neurônios após convulsões (Poliquin & Kang, 2022). Além disso, o estímulo excessivo de degradação decorrente do estresse do retículo endoplasmático leva à diminuição de subunidades de proteínas funcionais, contribuindo para a manifestação de convulsões em algumas dessas epilepsias. Proteínas mutantes características de epilepsias genéticas também podem levar à insuficiência da atividade do SUP ao alterar o funcionamento das enzimas E3 e das deubiquitinases ou formar agregados protéicos em abundância, causando falhas ou sobrecarregando essa via (Poliquin & Kang, 2022).

Figura 6 — Funcionamento do SUP e componentes que podem ser prejudicados na epilepsia



Fonte: Adaptado de POLIQUIN e KANG (2022)

A associação entre idade e manifestação de doenças neurodegenerativas é fortemente evidenciada e muitos estudos sugerem que a capacidade das células de remover proteínas e agregados tóxicos diminui com a idade. Portanto, a investigação de novas vias de regulação desse sistema e posteriormente a potencialização da sua atividade são vistos como um possível avanço no tratamento dessas doenças (Rousseau & Bertolotti, 2018; Tanaka & Matsuda, 2014).

1.3 Neuro2a como modelo de estudo de processos neurodegenerativos induzido por drogas

Neuro-2a é uma linhagem celular de neuroblastoma de camundongo e possui muitas propriedades semelhantes a neurônios, de forma que vem sendo usada amplamente em modelos *in vitro* de estudos de função neuronal, neurotoxicidade e neurodegeneração (Kang et al., 2017).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma neurotoxina amplamente utilizada para induzir características parkinsonianas (Hernandez-Baltazar et al., 2018). Com estrutura similar à dopamina, possui alta afinidade pelos transportadores desse neurotransmissor, através dos quais acessa o meio intracelular, se acumula e é oxidada, levando à formação de radicais livres e causando estresse oxidativo e posteriormente a morte de neurônios (Blum et al., 2001; Jagmag et al., 2016; Luthman et al., 1989; Schober, 2004). A 6-OHDA também induz neuroinflamação

e interfere nas vias autofágica e proteasomal, prejudicando a degradação protéica (Cicchetti et al., 2002; Marin & Aguilar, 2011; Pierson et al., 2005).

O Pentilenotetrazol (PTZ) é um antagonista dos receptores de ácido gama aminobutírico (GABA), utilizado como droga convulsivante em estudos experimentais devido à sua propriedade epileptogênica (Morimoto et al., 2004; Shimada & Yamagata, 2018). O PTZ limita o funcionamento de sinapses inibitórias, provocando aumento da atividade neuronal, e causando convulsões generalizadas em animais (Tourov et al., 1996).

1.4 Peptídeo NFKF

O NFKF é um fragmento peptídico descrito com resultados positivos em um modelo de epilepsia em camundongo, retardando o início da primeira convulsão induzida pela pilocarpina (de Araujo et al., 2019) e prevenindo a neurodegeneração em um modelo experimental de encefalomielite autoimune (Heimann et al., 2020). Este fragmento peptídico é gerado a partir da hemopressina, de sequência PVNFKFLSH, fragmento da cadeia alfa da hemoglobina, que foi descrita como o primeiro agonista inverso de receptor canabinóide do tipo 1. Foi demonstrado que a hemopressina pode desempenhar diferentes efeitos biológicos, como por exemplo, influência na pressão arterial (Blais et al., 2005), além de apresentar um efeito antinociceptivo (Dale et al., 2005).

Até o momento não se sabe muito sobre a via biossintética envolvida na geração de peptídeos de hemopressina. Um possível mecanismo envolve o complexo proteolítico do proteassoma, que se acredita degradar 80% de todas as proteínas celulares (Song et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo padronizar em células Neuro-2a o protocolo de neurodegeneração induzido pelas drogas Pentilenotetrazol (PTZ) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) através do ensaio de viabilidade celular pelo MTT, para posterior avaliação da atividade do proteassomo e efeito do peptídeo NFKF neste modelo celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Células Neuro2A foram descongeladas e mantidas em estufa a 37°C (atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂) em meio DMEM, com alta concentração de glicose, (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®, Grand Island, NY, USA) acrescido 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 72 horas de cultivo as células foram lavadas com PBS uma vez, tripsinizadas e plaqueadas para expansão do cultivo celular, sendo mantidas nas mesmas condições.

3.2 Tratamento com 6-OHDA e PTZ

Ao atingirem 80% de confluência, as células foram novamente lavadas com PBS uma vez tripsinizadas e plaqueadas a uma concentração de $0,05 \times 10^6$ por poço, em placas de cultivo de 24 poços em meio com 10% de soro fetal bovino. A cada 24 horas o soro foi substituído por meio novo contendo inicialmente 5% e depois 2% de soro. Após 24 horas nesta condição, as células foram lavadas com PBS uma vez e foram realizados os tratamentos com PTZ, nas concentrações de 40, 30, 20 e 10 mM, e com 6-OHDA, nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 µM. As drogas foram testadas separadamente, diluídas em meio de cultura, sem soro e sem antibiótico, por 6 e 24 horas.

3.3 Ensaio de viabilidade celular MTT

Após o período de tratamento, as células aderentes foram lavadas com PBS uma vez e foi adicionado meio novo sem soro e sem antibiótico acrescido de reagente MTT para uma concentração final de 0,5 mg/ml. As células foram incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora. O meio foi então removido e substituído por DMSO, para dissolução dos cristais. As placas foram agitadas vigorosamente em shaker por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado em placas transparentes de 96 poços. A leitura da absorbância a 570 nm foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M2e (Molecular Devices, EUA). O teste MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-,5-diphenyltetrazolium bromide) 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 a 570 nm.

3.4 Ensaio de atividade do proteassomo

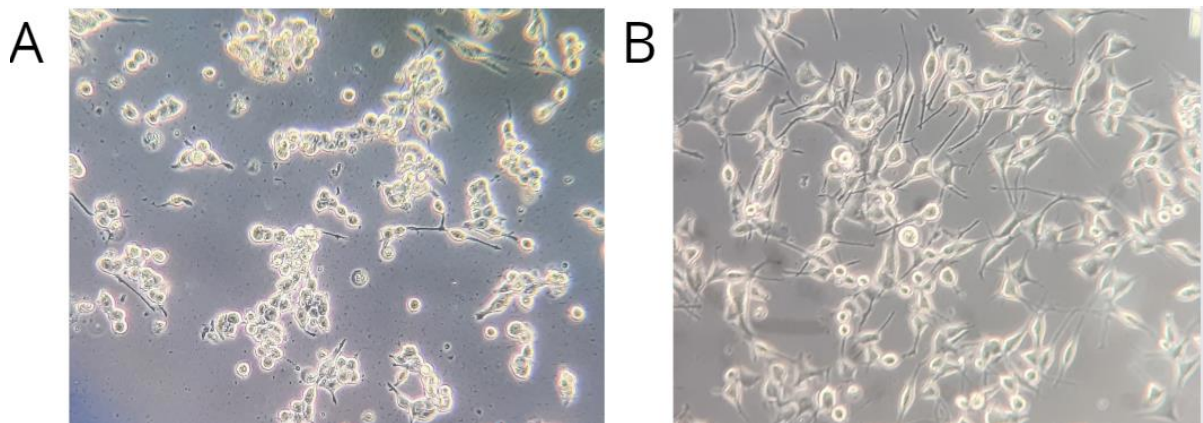
Os reagentes para medir a atividade de cada uma das subunidades catalíticas do Proteassomo (quimiotripsina, tripsina e caspase) foram preparados conforme instruções do fabricante e equilibrados à temperatura ambiente. Em seguida 25 μ ls de extratos de células Neuro2a, controle e tratados, foram adicionados aos poços de uma placa branca. Em seguida, 25 μ ls de cada reagente mencionado anteriormente foi adicionado individualmente em cada amostra. A placa foi selada, o conteúdo misturado a 700 rpm usando um agitador de placas por 2 minutos e Incubado em temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos. A luminescência foi medida a cada 10 minutos em um luminômetro.

4. RESULTADOS

4.1 Estabelecimento da linhagem celular e indução da neurodegeneração por drogas

Inicialmente, a linhagem Neuro2a foi descongelada e mantida em meio apropriado com uma concentração de soro fetal bovino de 10%. Nesta condição as células se encontram em estado de proliferação sendo possível observar células com morfologia com a presença de poucos prolongamentos e de contorno mais arredondado (Figura 7, A). Após o plaqueamento as células foram mantidas em meio com 10% de soro por 24 horas. Em seguida, a concentração de soro foi diminuída gradativamente a cada 24 horas para 5% e depois 2%. Com 2% de soro é possível observar a presença de muitos prolongamentos neuronais, além de um aspecto morfológico mais triangular. Após 24 horas nesta concentração foram realizados os tratamentos com as drogas desejadas.

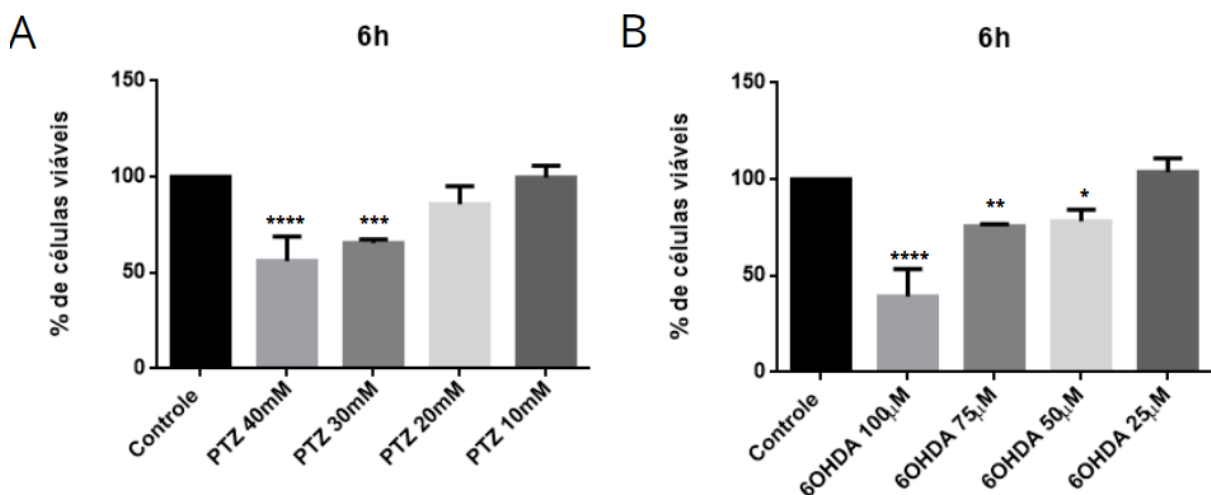
Figura 7 — Morfologia das células Neuro2A cultivadas em meio DMEM na presença de 10% (A) e 2% de soro fetal bovino (Aumento 400X)



Fonte: Elaboração Própria

O tempo de indução da neurodegeneração frente ao PTZ e a 6-OHDA foi avaliado pelo ensaio MTT após 6 e 24 horas de tratamento com diferentes concentrações das drogas. Com 6 horas de tratamento, para o PTZ foi observado uma diminuição de 44%, 35%, e 15% no número de células viáveis nas concentrações de 40, 30 e 20 mM, respectivamente (Figura 8, A). Para o tratamento com 6-OHDA na concentração de 100 μ M 45% foram viáveis, na de 75 μ M, 75% e com 50 μ M, 78% (Figura 8, B).

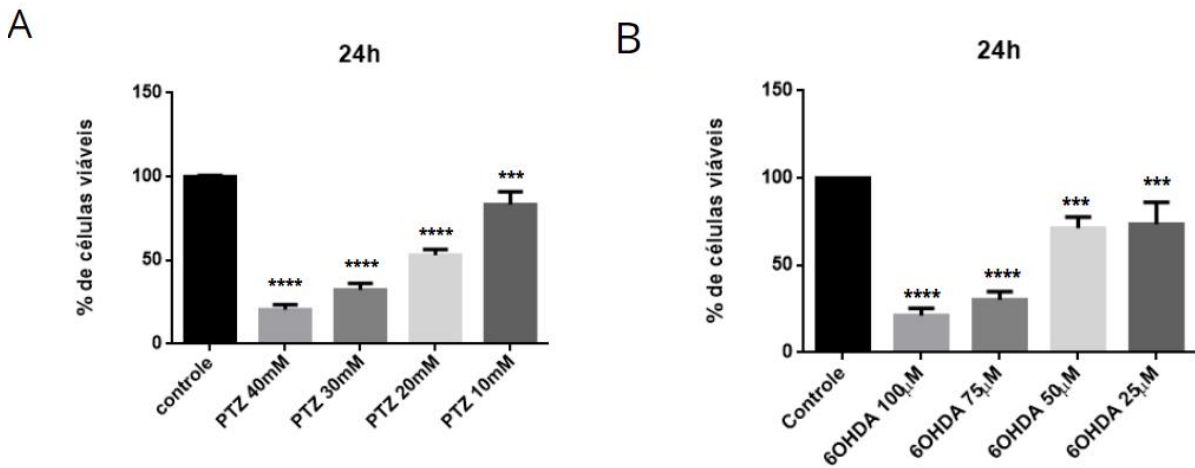
Figura 8 — Ensaio de Viabilidade Celular em Células Neuro2a tratadas por 6 horas com diferentes concentrações de PTZ (A) e 6-OHDA (B). As comparações estatísticas foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett usando o software GraphPad Prism; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Elaboração Própria

Em 24 horas de tratamento, é possível observar, tanto para o PTZ como para a 6-OHDA, alterações na porcentagem de células viáveis em todas as concentrações testadas, com as duas maiores concentrações das drogas testadas apresentando redução no percentual de células viáveis abaixo dos 50% (Figura 9).

Figura 9 — Ensaio de Viabilidade Celular em Células Neuro2a tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de PTZ (A) e 6-OHDA (B). As comparações estatísticas foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett usando o software GraphPad Prism;***p < 0,001 e ****p < 0,0001.

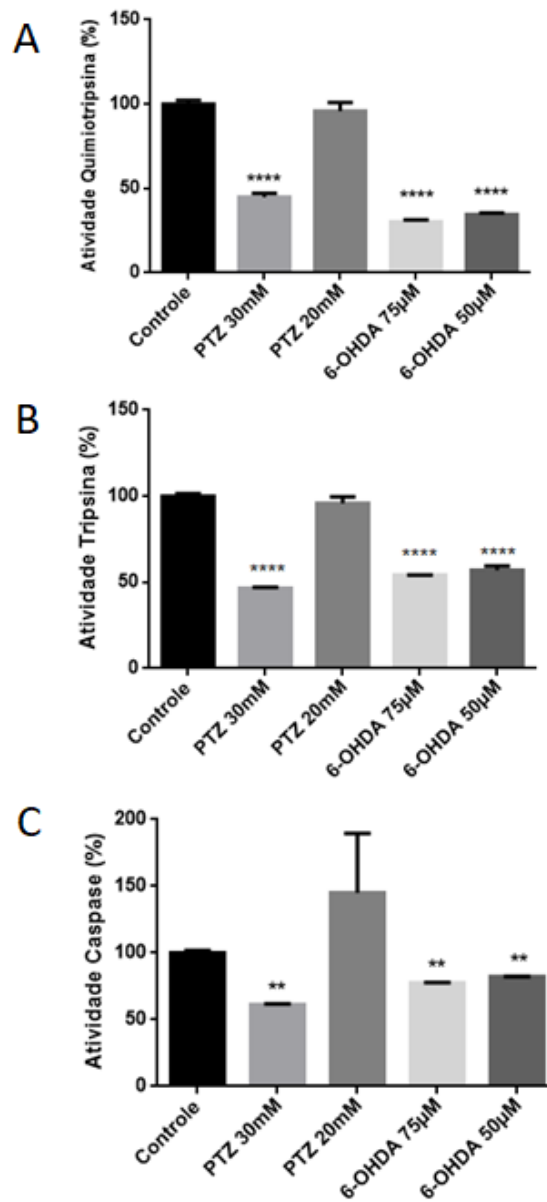


Fonte: Elaboração Própria

4.2 Avaliação da atividade do proteassomo

A atividade de cada subunidade catalítica do proteassomo foi avaliada após 6 horas de tratamento com as drogas. Após esse período foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de todas as subunidades catalíticas, exceto para a concentração de 20mM de PTZ, que apresentou a mesma atividade observada no controle para as subunidades quimotripsina e tripsina e um aumento em torno de 45%, porém, houve uma alta variabilidade entre as triplicatas para esta condição (Figura 10).

Figura 10 — Ensaio de atividade das subunidades catalíticas do proteassomo em extratos de células Neuro2A. As comparações estatísticas foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett usando o software GraphPad Prism; **p < 0,05 e ****p < 0,0001.



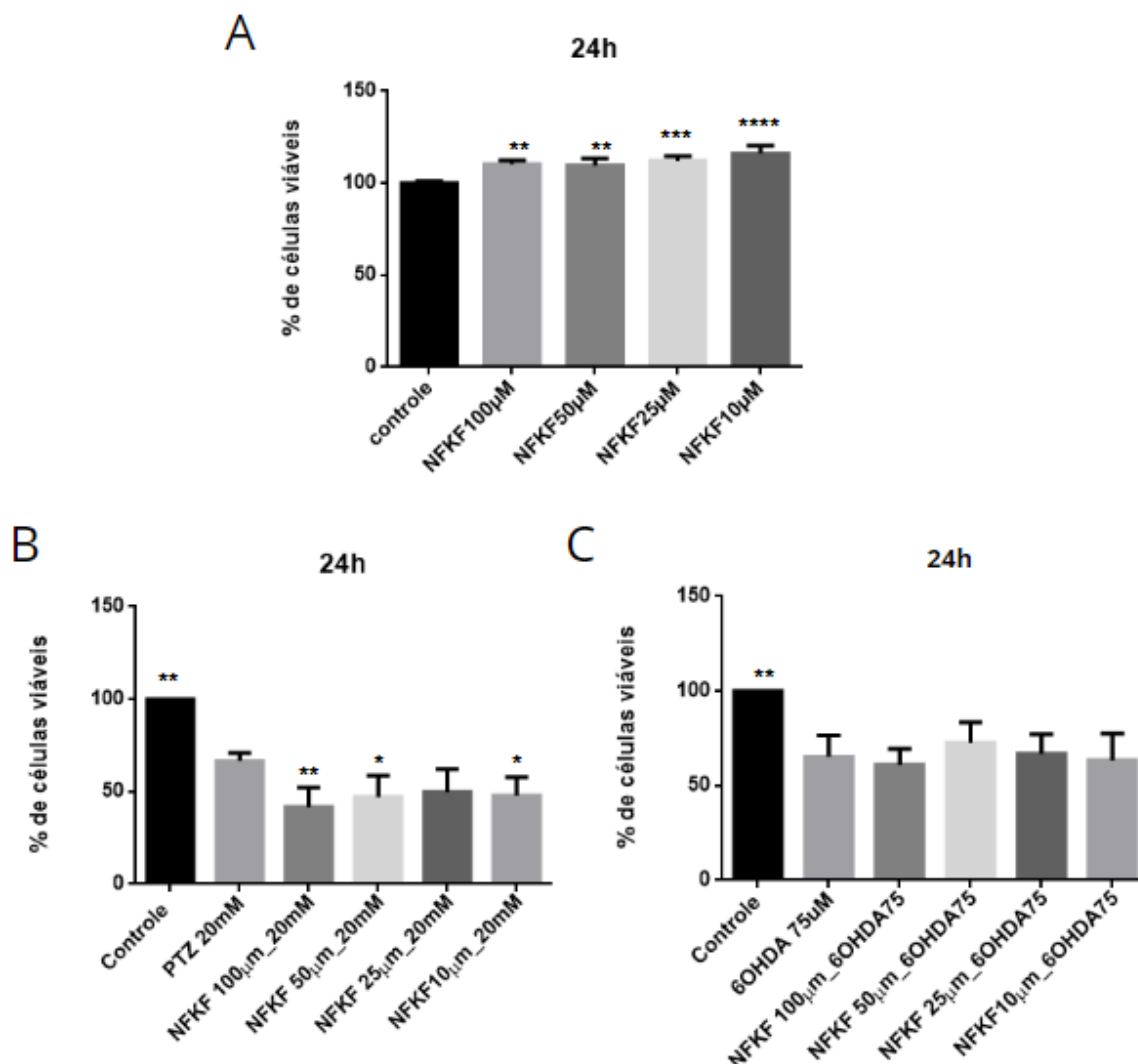
Fonte: Elaboração própria

4.3 Avaliação do efeito do peptídeo nfkf na viabilidade celular frente a neurodegeneração induzida por droga

Inicialmente, o peptídeo NFKF foi testado isoladamente e promoveu um aumento muito discreto, porém estatisticamente significativo, na porcentagem de células Neuro2A viáveis, que variou entre 9 e 16 % (Figura 11, A).

Quando as células foram tratadas simultaneamente por 24 horas com 20 mM de PTZ e diferentes concentrações do peptídeo foi observado uma diminuição no percentual de células viáveis em relação ao tratamento com o PTZ (Figura 11, B). No tratamento com 75 μ M de 6-OHDA e as diferentes concentrações do peptídeo testadas, não foram observadas alterações estatisticamente significantes em relação ao grupo tratado somente com a 6-OHDA (Figura 11, C).

Figura 11 — Ensaio de Viabilidade Celular em Células Neuro2a tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do peptídeo NFKF (A), concomitantemente com 20mM de PTZ (B) e 75µM de 6-OHDA (B). As comparações estatísticas foram realizadas usando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett usando o software GraphPad Prism; *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 e ****p < 0,0001.



Fonte: Elaboração Própria

4. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como um dos propósitos iniciais estabelecer em células Neuro2A diferenciadas a padronização do protocolo de neurodegeneração induzida pelas drogas PTZ e 6-OHDA, conhecendo assim as concentrações necessárias destas drogas nos tempo de tratamento testados capazes de afetar os processos relacionados à homeostase celular. Neuro2A é uma linhagem celular de neuroblastoma murino que espontaneamente se diferencia em células semelhantes a neurônios exibindo crescimento de neuritos em resposta à privação sérica (Wu et al., 1998). Recentemente, um estudo demonstrou a formação de um grande número de neuritos após 72 horas de baixa concentração de soro, que foram positivos para um conhecido marcador neuronal, a tubulina β III (Teli et al., 2022). Como primeiro resultado, foi possível estabelecer com sucesso essa diferenciação, demonstrado pela presença de prolongamentos neuronais (Figura 7).

A avaliação de resposta em 6 horas teve como objetivo estabelecer concentrações das drogas onde as alterações na viabilidade celular fossem observadas, porém não de maneira drástica, permitindo avaliar posteriormente, se houve alteração na atividade de algumas proteínas ou complexos proteicos, como o proteassomo. A avaliação do tratamento com o PTZ e 6-OHDA após 24 horas foi utilizada no intuito de estabelecer uma concentração de droga capaz de afetar em torno de 50% a viabilidade celular para posterior avaliação dos efeitos neuroprotetores ou citotóxicos de peptídeos, sendo especificamente testado neste estudo o peptídeo NFKF.

A integração dos resultados de viabilidade celular e atividade das subunidades catalíticas do proteassomo, obtidos após 6 horas de tratamento, evidenciaram que apesar de as duas drogas terem causado uma diminuição na atividade do proteassomo, o tratamento com PTZ parece acompanhar a porcentagem % morte celular observada, pois para o tratamento com 30mM de PTZ esta porcentagem de células viáveis foi de 65% com uma diminuição abaixo do 50%, enquanto que para 20 mM não houve alteração na atividade do proteassomo, onde 85% das células foram viáveis.

Já no tratamento com 6-OHDA por 6 horas, as concentrações de 75 e 50 μ M apresentaram uma discreta diminuição na viabilidade celular (25 e 23%, respectivamente), porém foi observada uma drástica redução na atividade das subunidades catalíticas do proteassomo, principalmente quimotripsina e tripsina. A atividade de caspase apresentou uma redução de 23% e 18%. Esses dados sugerem um efeito precoce da 6-OHDA na atividade das subunidades catalíticas do proteassomo. Um modelo de neurodegeneração induzido pela 6-

OHDA em peixe medaka mostrou uma leve redução da atividade proteossomal após 1 hora de tratamento. Três dias após a injeção, a atividade do proteassomo no cérebro desses peixes tornou-se comparável à dos cérebros do grupo controle (Matsui et al., 2010). Um outro estudo que avaliou a atividade do proteassomo em células PC12, observou um aumento nas atividades tripsina, quimotripsina e caspase em células tratadas com 10-100 microM de 6-OHDA em 15 horas, enquanto doses mais altas causaram um declínio acentuado. Contudo, não foram realizados ensaios com 6 horas de tratamento (Elkon et al., 2004). Estudos sugerem que 6-OHDA induz um aumento precoce de oxidantes intracelulares. As espécies reativas de oxigênio geradas ativam a via JNK e regulam as proteínas do ciclo celular implicadas na passagem G1/S, conduzindo assim as células pós-mitóticas à reentrada no ciclo celular. A neurotoxina também inativa a via de sobrevivência do AKT, um efeito que parece ser independente do aumento de espécies reativas de oxigênio induzido por 6-OHDA (Rodriguez-Blanco et al., 2008). Dentre os mecanismos que os organismos desenvolveram para lidar com o estresse oxidativo, estão os sistemas proteolíticos, incluindo o proteassomo. Foi demonstrado em vários tipos de células ou tecidos que as proteínas modificadas oxidativamente são degradadas seletivamente. Além disso, o estresse oxidativo pode causar um aumento transitório na degradação intracelular de proteínas celulares de vida curta e longa (Dudek et al., 2005; Ferrington et al., 2001). No entanto, todos os componentes do SUP (E1, E2s, alguns E3s, proteassoma e enzimas deubiquitinantes) também são prejudicados por extensos insultos oxidativos (Zhang et al., 2008). É possível especular que as concentrações de 6-OHDA testadas em nosso estudo, tenham sido suficientes para gerar um efeito negativo sobre a atividade do proteassomo com 6 horas de tratamento.

Recentemente, tem sido demonstrado que o tratamento de linhagens celulares humanas com diferentes tipos e concentrações de inibidores do proteassomo regulam positivamente ou negativamente a geração de distintos fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares pelo proteassomo (Dasgupta et al., 2014; Gelman et al., 2013; Fricker et al., 2012). Esses fragmentos têm sido referidos por alguns autores como peptídeos intracelulares, onde a atividade biológica de algumas dezenas dessas moléculas têm sido demonstrada (De Araujo et al., 2019). Um estudo utilizando o modelo de 6-OHDA em cérebro de zebrafish demonstrou alteração na concentração de alguns peptídeos intracelulares após 3 dias da realização do tratamento com droga (Fiametti et al., 2021). Neste sentido, estudos futuros de peptidoma de células neuronais tratadas com 6-OHDA podem evidenciar fragmentos alterados frente a esta molécula e investigados quanto ao papel citotóxico ou neuroprotetor desses peptídeos durante a neurodegeneração.

Adicionalmente, este estudo investigou se o peptídeo NFKF, fragmento da cadeia alfa da hemoglobina, foi capaz de prevenir a neurodegeneração induzida pelas drogas PTZ e 6-OHDA. Como descrito anteriormente, este peptídeo foi capaz de prevenir a neurodegeneração em um modelo experimental de encefalomielite autoimune (Heimann et al., 2020). Além disso, um estudo de ancoragem molecular sugere que o NFKF tem a melhor pontuação de interação ao receptor canabinoide do tipo 1 do que AM6538, canabidiol e rimonabanto. *In vivo*, foi demonstrado que o NFKF administrado por via oral é muito eficiente na prevenção de convulsões induzidas por pilocarpina e sintomas em camundongos (De Araujo et al., 2019). Contudo, os resultados para as duas drogas testadas não foram efetivos em inibir o processo de neurodegeneração, e no tratamento com PTZ houve uma redução mais acentuada no número de células viáveis. Interessantemente, o NFKF foi capaz de aumentar discretamente a porcentagem de células viáveis quando administrado isoladamente.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu a padronização de um protocolo de neurodegeneração em células neuro2A induzido pelas drogas PTZ e 6-OHDA. Além disso, o tratamento com 6-OHDA por 6 horas evidenciou uma redução drástica da atividade do proteassomo em concentrações que não causaram uma redução acentuada no número de células viáveis, enquanto o tratamento com PTZ demonstrou que a atividade do proteassomo parece refletir o número de células viáveis. Por fim, o peptídeo NFKF não foi capaz de aumentar o número de células viáveis quando tratado concomitantemente com as drogas testadas por 24 horas.

Dessa forma, estudos futuros são necessários para investigar mais profundamente a relação entre a atividade do proteassomo e as doenças neurodegenerativas, bem como os efeitos e mecanismos dos peptídeos intracelulares como alternativa para regulação desta via, que pode vir a ser um caminho para o desenvolvimento de métodos terapêuticos mais eficientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAIDD - American Association on Intellectual and Developmental Disabilities Intellectual Disability, Definition, Classification, and Systems of Supports, 11th edition, 2010. Disponível em: <http://www.aaid.org>

BALL, Nicole et al. **Parkinson's disease and the environment**. *Frontiers in neurology*, p. 218, 2019.

BETTING, Luiz Eduardo et al. **Tratamento de epilepsia: consenso dos especialistas brasileiros**. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 61, p. 1045-1070, 2003.

BLAIS, Paul-André et al. **Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice: a comparative study**. *Peptides*, v. 26, n. 8, p. 1317-1322, 2005.

BLUM, David et al. **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease**. *Progress in neurobiology*, v. 65, n. 2, p. 135-172, 2001.

CABREIRA, Verónica; MASSANO, João. **Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização**. *Acta Médica Portuguesa*, v. 32, n. 10, 2019.

CALDEIRA, M.V.; Curcio, M.; Leal, G.; Salazar, I.L.; Mele, M.; Santos, A.R.A.; Melo, C.V.; Pereira, P.; Canzoniero, L.M.T.; Duarte, C.B. **Excitotoxic Stimulation Downregulates the Ubiquitin-Proteasome System through Activation of NMDA Receptors in Cultured Hippocampal Neurons**. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1832, 263–274.

CICCHETTI, F. et al. **Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging**. *European Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 6, p. 991-998, 2002.

DALE, Camila Squarzoni et al. **Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia**. *Peptides*, v. 26, n. 3, p. 431-436, 2005.

DASGUPTA, Sayani et al. **Proteasome inhibitors alter levels of intracellular peptides in HEK293T and SH-SY5Y cells**. *PloS one*, v. 9, n. 7, p. e103604, 2014.

DE ARAUJO, Christiane B. et al. **Intracellular peptides in cell biology and pharmacology**. *Biomolecules*, v. 9, n. 4, p. 150, 2019.

DI, Xiao-Jing et al. **Grp94 protein delivers γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors to Hrd1 protein-mediated endoplasmic reticulum-associated degradation**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 18, p. 9526-9539, 2016.

DORSEY, E. et al. **The emerging evidence of the Parkinson pandemic**. *Journal of Parkinson's disease*, v. 8, n. s1, p. S3-S8, 2018.

DUDEK, E. J. et al. **Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases.** The FASEB journal, v. 19, n. 12, p. 1707-1709, 2005.

DUGGER, Brittany N.; DICKSON, Dennis W. **Pathology of neurodegenerative diseases.** Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 9, n. 7, p. a028035, 2017.

EL-GAMAL, Mohamed et al. **Neurotoxin-induced rodent models of Parkinson's disease: benefits and drawbacks.** Neurotoxicity Research, v. 39, n. 3, p. 897-923, 2021.

ELKON, Hanoch; MELAMED, Eldad; OFFEN, Daniel. **Oxidative stress, induced by 6-hydroxydopamine, reduces proteasome activities in PC12 cells.** Journal of Molecular Neuroscience, v. 24, n. 3, p. 387-400, 2004.

FEIGIN, Valery L. et al. **Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.** The Lancet Neurology, v. 18, n. 5, p. 459-480, 2019.

FERREIRA, M.; MASSANO, J. **An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations.** Acta Neurologica Scandinavica, v. 135, n. 3, p. 273-284, 2017.

FERRINGTON, Deborah A. et al. **Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 2, p. 937-943, 2001.

FIAMETTI, Louise Oliveira; CORREA, Claudia Neves; CASTRO, Leandro Mantovani de. **Peptide profile of zebrafish brain in a 6-OHDA-induced Parkinson model.** Zebrafish, v. 18, n. 1, p. 55-65, 2021.

FISHER, Robert S. et al. **ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.** Epilepsia, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014.

FRICKER, Lloyd D. et al. **Peptidomic analysis of HEK293T cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides.** Journal of proteome research, v. 11, n. 3, p. 1981-1990, 2012.

GELMAN, Julia S. et al. **Alterations of the intracellular peptidome in response to the proteasome inhibitor bortezomib.** PloS one, v. 8, n. 1, p. e53263, 2013.

GITLER, Aaron D.; DHILLON, Paraminder; SHORTER, James. **Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope.** Disease models & mechanisms, v. 10, n. 5, p. 499-502, 2017.

GOLDMAN, Jennifer G. et al. **Cerebrospinal fluid, plasma, and saliva in the BioFIND study: relationships among biomarkers and Parkinson's disease features.** Movement Disorders, v. 33, n. 2, p. 282-288, 2018.

HEEMELS, MT. **Neurodegenerative diseases.** Nature 539, 179 (2016).

HEIMANN, Andrea S. et al. **NFKF is a synthetic fragment derived from rat hemopressin that protects mice from neurodegeneration.** *Neuroscience Letters*, v. 721, p. 134765, 2020.

HERNANDEZ-BALTAZAR, Daniel et al. **Animal model of Parkinson disease: Neuroinflammation and apoptosis in the 6-hydroxydopamine-induced model.** *Experimental Animal Models of Human Diseases*. Rijeka: InTech, p. 375-393, 2018.

JAGMAG, Shail A. et al. **Evaluation of models of Parkinson's disease.** *Frontiers in neuroscience*, v. 9, p. 503, 2016.

KANG, Xu et al. **Cyclooxygenase-2 contributes to oxidopamine-mediated neuronal inflammation and injury via the prostaglandin E2 receptor EP2 subtype.** *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

LANG, Anthony E.; ESPAY, Alberto J. **Disease modification in Parkinson's disease: current approaches, challenges, and future considerations.** *Movement Disorders*, v. 33, n. 5, p. 660-677, 2018.

LORENTE-PICÓN, Marina; LAGUNA, Ariadna. **New avenues for Parkinson's Disease therapeutics: Disease-modifying strategies based on the gut microbiota.** *Biomolecules*, v. 11, n. 3, p. 433, 2021.

LUTHMAN, J. et al. **Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage.** *Behavioural brain research*, v. 33, n. 3, p. 267-277, 1989.

MARIN, C.; AGUILAR, E. **In vivo 6-OHDA-induced neurodegeneration and nigral autophagic markers expression.** *Neurochemistry international*, v. 58, n. 4, p. 521-526, 2011.

MASSANO, João; BHATIA, Kailash P. **Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 2, n. 6, p. a008870, 2012.

MATSUI, Hideaki et al. **Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson's disease.** *Journal of neurochemistry*, v. 115, n. 1, p. 178-187, 2010.

MORIMOTO, Kiyoshi; FAHNESTOCK, Margaret; RACINE, Ronald J. **Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain.** *Progress in neurobiology*, v. 73, n. 1, p. 1-60, 2004.

OLIVEIRA, Anderson Silva. **Transição demográfica, transição epidemiológica e envelhecimento populacional no Brasil.** *Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, v. 15, n. 32, p. 69-79, 2019.

PENA, Stefanie A. et al. **Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements.** *Journal of drug targeting*, v. 28, n. 2, p. 111-128, 2020.

PIERSON, Johan et al. **Increased levels of ubiquitin in the 6-OHDA-lesioned striatum of rats.** *Journal of Proteome Research*, v. 4, n. 2, p. 223-226, 2005.

POLIQUN, Sarah; KANG, Jing-Qiong. **Disruption of the Ubiquitin-Proteasome System and Elevated Endoplasmic Reticulum Stress in Epilepsy.** Biomedicines, v. 10, n. 3, p. 647, 2022.

POSTUMA, Ronald B. et al. **MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease.** Movement disorders, v. 30, n. 12, p. 1591-1601, 2015.

REZVANI, Nooshin et al. **Heterozygosity for the proteasomal Psmc1 ATPase is insufficient to cause neuropathology in mouse brain, but causes cell cycle defects in mouse embryonic fibroblasts.** Neuroscience Letters, v. 521, n. 2, p. 130-135, 2012.

RODRIGUEZ-BLANCO, Jezabel et al. **Intracellular signaling pathways involved in post-mitotic dopaminergic PC12 cell death induced by 6-hydroxydopamine.** Journal of neurochemistry, v. 107, n. 1, p. 127-140, 2008.

ROUSSEAU, Adrien; BERTOLOTTI, Anne. **Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease.** Nature reviews Molecular cell biology, v. 19, n. 11, p. 697-712, 2018.

SCHEFFER, I. E. et al. **Classificação das epilepsias da ILAE: Relatório da Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE.** Epilepsia, v. 58, n. 4, p. 512-21, 2017.

SCHOBER, Andreas. **Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP.** Cell and tissue research, v. 318, n. 1, p. 215-224, 2004.

SHEIKH, Saba et al. **Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions.** Journal of neurodegenerative diseases, v. 2013, 2013.

SHIMADA, Tadayuki; YAMAGATA, Kanato. **Pentylentetrazole-induced kindling mouse model.** JoVE (Journal of Visualized Experiments), n. 136, p. e56573, 2018.

SONG, Chang Zheng et al. **Inhibition of intraerythrocytic proteasome retards the generation of hemorphins.** Peptides, v. 33, n. 1, p. 170-173, 2012.

SOUSA, Carlota Miguel Leonardo de. **Resistência aos inibidores do proteassoma: uma estratégia in silico.** 2018. Tese de Doutorado.

TANAKA, Keiji; MATSUDA, Noriyuki. **Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1843, n. 1, p. 197-204, 2014.

TANAKA, Keiji. **The proteasome: overview of structure and functions.** Proceedings of the Japan Academy, Series B, v. 85, n. 1, p. 12-36, 2009.

TELI, Prajakta; KALE, Vaijayanti; VAIDYA, Anuradha. **Mesenchymal stromal cells-derived secretome protects Neuro-2a cells from oxidative stress-induced loss of neurogenesis.** Experimental Neurology, v. 354, p. 114107, 2022.

TOUROV, Alexandre et al. **Spike morphology in PTZ-induced generalized and cobalt-induced partial experimental epilepsy.** Functional neurology, v. 11, n. 5, p. 237-245, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Epilepsy: a public health imperative.** World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Parkinson disease: a public health approach: technical brief.** 2022.

WU, G. et al. **Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells.** Journal of neurocytology, v. 27, n. 1, p. 1-14, 1998.

ZHANG, Xinyu et al. **The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells.** Investigative ophthalmology & visual science, v. 49, n. 8, p. 3622-3630, 2008.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: BEATRIZ BARNI BATISTA

Título: "Padronização de neurodegeneração induzida por drogas em células Neuro2A e Avaliação da atividade do proteassomo e efeito do peptídeo NFKF"

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro	APROVADO
Profa. Dra. Cristiane Angelica Ottoni	APROVADO

PARECER:

A aluna apresentou seu trabalho com segurança, demonstrando conhecimento sobre o assunto, respondendo as questionamentos da comissão avaliadora.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Beatriz Barni Batista** obteve o seguinte conceito:

APROVADO

REPROVADO

São Vicente, 24 de janeiro de 2023.

Leandro Mantovani de Castro

Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Cristiane Angelica Ottoni

Profa. Dra. Cristiane Angelica Ottoni