

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

LARISSA DE OLIVEIRA PIASSI

**Efeitos da inibição da enzima PARP1 em resposta ao estresse
oxidativo induzido *in vitro* em modelos neurais humanos**

Ribeirão preto

2022

LARISSA DE OLIVEIRA PIASSI

Efeitos da inibição da enzima PARP1 em resposta ao estresse oxidativo induzido *in vitro* em modelos neurais humanos

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Piassi, Larissa de Oliveira

Efeitos da inibição da enzima PARP1 em resposta ao estresse oxidativo induzido *in vitro* em modelos neurais humanos. Ribeirão Preto, 2022.

86f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Sakamoto Hojo, Elza Tiemi.

1. Poli (ADP-ribose) polimerase-1; 2. PARP1; 3. Inibição de PARP1; 4. Danos oxidativos; 5. Modelos neurais; 6. Morte celular

Nome: PIASSI, Larissa de Oliveira

Título: Efeitos da inibição da enzima PARP1 em resposta ao estresse oxidativo induzido *in vitro* em modelos neurais humanos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Bolsa de Mestrado/Proc. 88887.480608/2020-00) – Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Proc. nº 309854/2017-2; Proc. nº 311533/2021-3

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho. (Processo Nº 2018/21.709-1)

Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP

Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por ter me acolhido no laboratório e me orientado neste trabalho. Por toda a compreensão, apoio, conversas sobre os projetos e sobre a vida, e por me cobrar quando achava que eu não estava dando o meu máximo. Obrigada de coração!

À **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi** pelo carinho, amizade e alegria e por sempre fazer com que todos no laboratório se sentissem muito acolhidos. Obrigada professora, por sempre se preocupar com cada um de nós e dar o seu melhor para que estivéssemos bem, além de proporcionar os lanches, almoços e aniversários mais gostosos.

À **Prof^a. Dr^a. Ester Silveira Ramos**, Chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética, e ao **Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética-FMRP-USP, por todo o apoio e dedicação à nossa pós.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Passos Junior** e à **Prof^a. Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões** por gentilmente permitirem a utilização de alguns equipamentos de seus laboratórios e a todo o pessoal dos laboratórios de Imunogenética Molecular e Biologia e Desenvolvimento de Abelhas, por toda a disponibilidade em ajudar.

Às funcionárias da limpeza do Departamento de Genética, em especial à **Dona Maria** e **Dona Francisca**, por todo zelo e cuidado com o laboratório e com o departamento.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com críticas e sugestões.

À secretaria do Departamento de Genética, principalmente a **Sra. Susie Adriana Nalon**, por toda a atenção, atendimentos prestados e cuidado com os alunos da pós.

À instituição **CAPES**, pela bolsa de mestrado, sem a qual eu não poderia ter desenvolvido este trabalho. Ao **CNPq**, **FAPESP** e **FAEPA** pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Genética e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela estrutura e apoio oferecidos para o desenvolvimento desse projeto.

De modo especial agradeço ao amigo do coração **Luiz Augusto da Costa Junior**, melhor técnico que qualquer laboratório poderia ter. Obrigada por todas as conversas, “puxões de orelha”, conselhos, risadas, pelo incentivo nos esportes, por sempre toparem me acompanhar

nas corridas e pegar no meu pé, enfim, você foi essencial e eu jamais conseguiria agradecer por todo carinho que teve comigo nesses anos. Amo tu Junão!

À **Natália Chermont dos Santos Moreira** e **Jessica Ellen Barbosa de Freitas Lima**, por toda a ajuda na realização desse trabalho, não teria sido possível sem vocês. Obrigada pela amizade, pelas risadas, por me fazerem refletir sobre as coisas da vida, por sempre me “empurrarem pra frente” me incentivando e mostrando os caminhos, e pelas pessoas incríveis que vocês são. Vocês me inspiram a ser melhor todos os dias. Amo vocês duas demais, senhoritas.

Aos amigos do laboratório **Rê, Gustavinho** e **Alice** e a todos que passaram por lá nesses anos, especialmente **Danilo, Ana Paula, Thayná** e **Laisa**. Obrigada de coração galera, pela amizade, sugestões, conhecimentos, risadas e por estarem sempre dispostos a ajudar. Cada um foi particularmente importante pra mim e eu aprendi muito com vocês.

Às fofoletes **Ana, Caroles, Le, Livinha** e **Angel**, meu grupinho de graduação que, mesmo de longe, ainda me apoia e incentiva sempre.

Aos amigos **Lucas, Nat e Lelê (nenenzinha mais linda), Dani, Carlinha, Dany, Fabi, Aline, Pozzoli, Sgotti, Michelito, Ju, Chiapetto, Simone, Iris** e todos os membros do movimento dos focolares. Obrigada pessoal por toda a unidade construída e por sempre estarem lá quando eu precisei, cada um tem um cantinho especial no meu coração!

Aos meus pais **Piassi** e **Maria Olivia**, à minha irmã **Vanessa**, ao meu cunhado **Bruno (Cai-cai)** e especialmente à minha sobrinha **Livinha**. Não tenho palavras pra agradecer a vocês por tudo que são e fazem por mim. Eu não seria quem eu sou se não fosse por vocês. Amo tanto vocês que nem sei explicar.

Agradeço, sobretudo, a Deus! Sem Ele nada teria sido possível!

RESUMO

PIASSI, L.O. **Efeitos da inibição da enzima PARP1 em resposta ao estresse oxidativo induzido *in vitro* em modelos neurais humanos.** 2022, 86f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) é uma enzima com múltiplas funções celulares, predominantemente ativada por danos no DNA. A superexpressão de PARP1 tem sido associada a diversos distúrbios neurodegenerativos e o papel do estresse oxidativo tem sido investigado em relação à sua associação com a extensa ativação de PARP1, que pode causar uma crise energética e, finalmente, morte celular. Assim, a inibição de PARP1 tem sido considerada na literatura como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica para várias doenças neurodegenerativas. Neste estudo, testamos a hipótese de que a inibição de PARP1 poderia proteger as células neurais contra danos oxidativos. Nosso objetivo foi caracterizar os efeitos da inibição de PARP1 por NU1025 contra danos induzidos *in vitro* pelo H₂O₂. Células SH-SY5Y (indiferenciadas e diferenciadas em neurônios), NPC5461 e PC12 foram utilizadas como sistemas modelo. Todas as células foram tratadas com NU1025 (20min) e H₂O₂ (4h), isoladamente ou em combinação, e analisadas após 24h. A inibição de PARP1 pelo composto NU1025 associada à indução de danos oxidativos pelo H₂O₂, causou uma redução significativa na viabilidade celular (mais de 40% em todos os modelos celulares), o que não foi observado nos tratamentos com os compostos utilizados isoladamente (H₂O₂ ou NU1025). Nas células SH-SY5Y indiferenciadas, o tratamento com H₂O₂ promoveu uma redução significativa na proporção G0/G1 (~9%) e um aumento significativo em Sub-G1 (~12%), os quais não foram observados nos neurônios; já o tratamento combinado (inibidor de PARP1 e H₂O₂) aumentou significativamente a proporção Sub-G1, tanto nas células indiferenciadas (~16%) quanto nos neurônios (~30%). Nos ensaios de morte celular, foi observado um aumento significativo na porcentagem de células necróticas após o tratamento com H₂O₂ (~17%), o qual foi potencializado pela combinação com o inibidor (NU1025 + H₂O₂) (~40%); no entanto, esses efeitos foram observados apenas em células SH-SY5Y indiferenciadas. Nestas, o tratamento combinado também provocou um aumento significativo nas quebras no DNA (~16%) e nos níveis intracelulares (~67%) e mitocondriais (~21%) do radical superóxido (O₂•). Por outro lado, uma redução significativa no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi promovida pelo tratamento com H₂O₂ (~35%), mas um efeito menos proeminente, mas ainda

significativo, foi observado quando combinado com NU1025 (~29%). Alterações na massa mitocondrial não foram observadas em nenhum dos tratamentos. A expressão proteica de SOD1 foi aumentada significativamente (2,5 vezes) quando células indiferenciadas foram tratadas apenas com H₂O₂, mas na combinação de NU1025 e H₂O₂ esse aumento não foi observado. Como um todo, nossos resultados indicam que a redução da viabilidade celular em resposta à inibição de PARP1 seguida de indução de dano oxidativo possivelmente ocorreu como resultado do aumento de O₂•⁻ intracelular, promovido pela baixa expressão de SOD1, que gerou danos ao DNA e, conseqüentemente, a morte celular. Assim, a inibição de PARP1 intensificou os níveis de dano oxidativo em células SH-SY5Y indiferenciadas e neurodiferenciadas, PC12 e NPC5461. Esses resultados destacam o papel crucial da PARP1 no reparo do DNA e nos mecanismos de defesa antioxidante, indicando que a inibição da PARP1 não parece representar um alvo terapêutico adequado para fundamentar novas estratégias terapêuticas para pacientes com doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Poli (ADP-ribose) polimerase-1; PARP1; Inibição de PARP1; danos oxidativos; modelos neurais; morte celular.

ABSTRACT

PIASSI, L.O. **PARP1 inhibition enhances *in vitro* induced-oxidative damage in human neural models.** 2022, 86f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Poly (ADP-ribose)-polymerase 1 (PARP1) is an enzyme with multiple cellular functions, predominantly activated by DNA damage. Overexpression of PARP1 has been associated with several neurodegenerative disorders and the role of oxidative stress has been investigated regarding its association with an extensive PARP1 activation that may cause an energy crisis, and ultimately, cell death. Thus, PARP1 inhibition has been considered in the literature as a new possibility of therapeutic intervention for several diseases, including those of a neurodegenerative nature. Our aim was to characterize the effects of PARP1 inhibition by NU1025 against *in vitro* induced-damage by hydrogen peroxide (H₂O₂). Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y-undifferentiated and differentiated into neurons), human neural progenitor cells (NPC5461) and rat pheochromocytoma cells (PC12) were used as model systems. All cells were treated with NU1025 (20min) and H₂O₂ (4 h), alone or in combination, and analyzed after 24h. PARP1 inhibition associated with induced-oxidative damage by H₂O₂, caused a significant reduction in cell viability (more than 40% in all cell models), which was not observed in treatments with each compound tested alone (H₂O₂ or NU1025). In undifferentiated SH-SY5Y cells, treatment with H₂O₂ alone promoted a significant reduction in the G0/G1 ratio (~9%) and increase in Sub-G1 (~12%), which were not observed in differentiated neurons, while the combined treatment (NU1025 + H₂O₂) promoted a significant increase in the Sub-G1 proportion in both undifferentiated cells (~16%) and neurons (~30%). In cell death assays, a significant increase in the percentage of necrotic cells was observed after treatment with H₂O₂ (~17%), which was potentiated by the combination with NU1025 (~40%); however, these effects were observed only in undifferentiated SH-SY5Y cells. In these, the combined treatment promoted a significant increase in DNA breaks (~16%) and in intracellular (~67%) and mitochondrial (~21%) superoxide radical (O₂•) levels. On the other hand, a significant reduction in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was promoted by treatment with H₂O₂ (~35%), but a less prominent, but still significant effect was observed when combined with NU1025 (~29%); however, changes in mitochondrial mass were not observed in any of the treatments. In addition, SOD1 protein expression was significantly increased (2.5-fold) when

undifferentiated cells were treated with H₂O₂ alone, but the combination of NU1025 and H₂O₂ did not change SOD1 expression. As a whole, our results indicate that the reduction in cell viability in response to PARP1 inhibition followed by the induction of oxidative damage, possibly occurred as a result of the increase in intracellular O₂•⁻ promoted by the low expression of SOD1, which generated DNA damage and, consequently, cell death. Thus, PARP1 inhibition intensified the levels of oxidative damage in undifferentiated and neurodifferentiated SH-SY5Y cells, PC12 and NPC5461 cell lines. These results highlight the crucial role of PARP1 in DNA repair and antioxidant defense mechanisms, indicating that PARP1 inhibition does not seem to represent a suitable therapeutic target to support new therapeutic strategies for patients with neurodegenerative diseases.

Key words: Poly (ADP-ribose) polymerase-1; PARP1; PARP1 inhibition; oxidative damage; neural models; cell death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de ação das PARPs NAD⁺ é usado como substrato para a formação de PAR e é reabastecido nas células a partir da nicotinamida, usando ATP. As cadeias PAR são rapidamente catabolizadas por PAR glicohidrolase (PARG). PARG cliva as ligações ribose-ribose da PAR. A clivagem da porção ADP-ribose terminal resulta na liberação de mono (ADP-ribose). (Fonte: Adaptado de Ray Chaudhuri; Nussenzweig, 2017). 25
- Figura 2.** Protocolo de diferenciação das células da linhagem SH-SY5Y com AR. As células foram semeadas (dia -1) em placas com meio de cultura DMEM/F10 contendo 10% de SBF e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO² por 24h para aderência. Após esse período, o meio é removido e é adicionado meio de diferenciação (MD) composto por DMEM/F10 com 1% de SBF e AR a 10 µM. O meio de diferenciação é trocado a cada 2 dias até o termino da diferenciação (após 8 dias). 36
- Figura 3.** Viabilidade celular das células SH-SY5Y indiferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. ***p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo; as barras representam a comparação entre os grupos; ###p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao H₂O₂. DMSO 0,2% (controle negativo). 46
- Figura 4.** Distribuição das células SH-SY5Y indiferenciadas nas diferentes fases do ciclo celular (A) e Sub-G1 (B). As células foram tratadas com NU1025 por 20 min, em seguida com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *Two-Way ANOVA* (ciclo celular) e *One-Way ANOVA* (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; **p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo). 48

Figura 5. Danos no DNA avaliados pelo ensaio do cometa após tratamento das células com NU1025 por 20 min, em seguida com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os dados foram representados como porcentagens de DNA na cauda. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* com o pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; ** p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).....49

Figura 6. Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)*, por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos; #p<0,05; ##p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).51

Figura 7. Quantificação de ROS após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. (A) ROS intracelular mensurado pela marcação com o corante *Dihydroethidium (DHE - 1,5 µM)*. (B) ROS mitocondrial mensurado pela marcação com o corante *MitoSox red (1,5 µM)*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).....53

Figura 8. Análises de parâmetros mitocondriais após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. (A) Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante *Tetramethylrhodamine (TMRM - 40 nM)*. (B) Massa mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoTracker Green (50 µM)*. Os valores são provenientes de três experimentos

independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).....55

Figura 9. Análise expressão da proteína SOD1 após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. **(A)** Expressão de proteínas SOD1 (~18 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blotting*. **(B)** Os níveis de expressão de SOD1 após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).56

Figura 10. Imunofluorescência das células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios, mostrando à expressão dos marcadores neuronais com os anticorpos anti- β -III-tubulina (1:500), anti-MAP2 (1:500), anti-NeuN (1:500) e coloração Hoechst 33342 nuclear (0,15 μ g/mL). Alterações morfológicas observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência (Zeiss).58

Figura 11. Células da linhagem celular SH-SY5Y após 8 dias de tratamento com AR. As alterações morfológicas e a neurodiferenciação são observadas sob ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (Carl Zeiss). Foram observadas redes de interconexões (círculos pontilhados) entre neurônios maduros diferenciados. Dimetilsulfóxido, 0,2% (DMSO, controle negativo); ácido retinoico, 10 μ M (AR, controle positivo).59

Figura 12. Análise da expressão da proteína β -III-tubulina após tratamento das células SH-SY5Y com AR por 8 dias **(A)** Expressão de proteínas β -III-tubulina (~55 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blotting*. **(B)** Os níveis de expressão de β -III-tubulina após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-*

Way ANOVA e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. 60

Figura 13. Viabilidade celular das células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. E posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo e as barras em comparação entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo). 61

Figura 14. Distribuição das células SH-SY5Y diferenciadas nas diferentes fases do ciclo celular (A) e Sub-G1 (B) após inibição de PARP. As células foram tratadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle negativo. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo); H₂O₂ (30 μ M); NU1025 (200 μ M). 62

Figura 15. Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas (em neurônios) com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)*, por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo). 64

Figura 16. Viabilidade celular das células NPC5461 (A) e PC12 (B) tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo e as barras em comparação entre os grupos. DMSO 0,2% (controle negativo). 66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagens de viabilidade celular obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.46
- Tabela 2.** Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way* ANOVA (ciclo celular) e *One-Way* ANOVA (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*.....48
- Tabela 3.** Porcentagens de danos no DNA avaliados pelo ensaio do Cometa após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.....50
- Tabela 4.** Porcentagens de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)*, por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.....51
- Tabela 5.** Intensidade média de fluorescência para quantificação de ROS após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. ROS intracelular mensurado pela marcação com o corante *Dihydroethidium (DHE - 1,5 µM)* e ROS mitocondrial mensurado pela marcação com o corante *MitoSox Red (1,5 µM)*.

Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.53

Tabela 6. Intensidade média de fluorescência de alterações mitocondriais das células SH-SY5Y indiferenciadas após tratamento com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante *Tetramethylrhodamine* (TMRM – 40 nM) e massa mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoTracker Green* (50 μ M). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.55

Tabela 7. Níveis de expressão da proteína SOD1 após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os níveis de expressão de SOD1 após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0* (Lite Software). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.57

Tabela 8. Níveis de expressão da proteína β -III-tubulina após tratamento das células SH-SY5Y com ácido retinóico (AR) por 8 dias.60

Tabela 9. Porcentagens de viabilidade celular obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. .61

Tabela 10. Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way ANOVA* (ciclo celular) e *One-Way ANOVA* (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*.63

Tabela 11. Porcentagens de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin (Guava Technologies)*, por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. 64

Tabela 12. Porcentagens de viabilidade celular das células NPC5461 e PC12 tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
3-ABA	3-aminobenzamide
Alt-NHEJ	Reparo por junção não homóloga alternativa
AR	Ácido retinóico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BER/SSB	Reparo por excisão de bases
BSA	<i>Bovine Serun Albimin</i>
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
Cu ⁺	Cobre
DBD	<i>DNA biding domain</i>
DHE	<i>Dihidroetídio</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB s	<i>Double strand breaks</i>
ES	<i>Embryonic stem cell</i>
Fe ²⁺	Ferro
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HR	Reparo por recombinação homóloga
IP	Iodeto de propídeo
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
MARs	Mono(ADP-ribosil)ases
MD	Meio de diferenciação
NAD ⁺	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>

NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NG	<i>Neural Growth</i>
NMDA	N-methyl-d-aspartato
NOX1	NADPH oxidase 1
NOX4	NADPH oxidase 4
NPCs	Células progenitoras neurais
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Superóxido
O ₃	Ozônio
PAR	Poli(ADP-ribose)
PARG	Poli(ADP-ribose) glicohidrolase
PARPs	Poli (ADP-ribose) polimerases
PC12	Linhagem de feocromocitoma de rato
PS	Fosfatidilserina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SBF	Soro bovino fetal
SH-SY5Y	Linhagem de neuroblastoma humano
SOD	Superóxido dismutase
SSBs	<i>Single strand breaks</i>
TMRM	<i>Tetrametilrhodamina</i>
U937	Linhagem de leucemia mieloide humana
Δψ _m	Potencial de membrana mitocondrial

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Poli (ADP-ribose) polimerase	24
1.2 PARP nas doenças neurodegenerativas	26
1.3 Estresse oxidativo.....	27
1.4 Modelos <i>in vitro</i> no estudo de doenças neurodegenerativas.....	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Linhagens Celulares e Cultivo Celular	35
3.2 Ensaio de neurodiferenciação.....	36
3.3 Ensaio de imunofluorescência	36
3.4 Tratamentos com inibidor de PARP e H ₂ O ₂	37
3.5 Viabilidade celular para análise de citotoxicidade.....	37
3.6 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo.....	38
3.7 Ensaio Cometa alcalino para detecção de quebras no DNA	38
3.8 Análise de morte celular	39
3.9 Análise de espécies reativas de oxigênio	40
3.10 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial	41
3.11 Quantificação de massa mitocondrial.....	41
3.12 Avaliação da expressão proteica por Western Blotting.....	42
3.12.1 Extração de proteínas com solução de lise	42
3.12.2 Eletroforese de proteínas.....	42
3.12.3 Imunodeteção e visualização de Proteínas	42
3.13 Análises estatísticas.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 A inibição de PARP potencializa os efeitos do H ₂ O ₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas	45
4.2 A combinação de NU1025 e H ₂ O ₂ promove aumento da fração Sub-G1 nas células SH-SY5Y indiferenciadas	47
4.3 A combinação de NU1025 e H ₂ O ₂ induz quebras no DNA em células SH-SY5Y indiferenciadas	49
4.4 A inibição de PARP aumenta as taxas de necrose promovidas pelo H ₂ O ₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas.....	50
4.5 Aumento nos níveis de superóxido intracelular e mitocondrial após inibição de PARP e indução de estresse oxidativo em células SH-SY5Y indiferenciadas	52

4.6	A inibição de PARP potencializa a redução do potencial de membrana mitocondrial promovida pelo H ₂ O ₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas.....	54
4.7	A inibição de PARP afeta o sistema antioxidante em células SH-SY5Y indiferenciadas.....	56
4.8	Neurodiferenciação das células SH-SY5Y com AR.....	57
4.8.1	Neurodiferenciação e expressão de marcadores neuronais nas células SH-SY5Y	57
4.8.2	Alterações morfológicas nas células SH-SY5Y após diferenciação com AR.....	58
4.8.3	Aumento na expressão proteica de β-III-tubulina nas células SH-SY5Y após diferenciação com AR.....	59
4.9	A inibição de PARP também potencializa os efeitos do H ₂ O ₂ em neurônios	60
4.10	A combinação da inibição de PARP1 e H ₂ O ₂ induz um aumento em Sub-G1 nos neurônios	62
4.11	A combinação da inibição de PARP e H ₂ O ₂ não induz morte celular nos neurônios	63
4.12	Efeitos da inibição de PARP em resposta ao estresse oxidativo nas células NPC5461 e PC12	65
5.	DISCUSSÃO	68
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	BIBLIOGRAFIA.....	78

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poli (ADP-ribose) polimerase

As Poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs) constituem uma família de enzimas capazes de catalisar a transferência de resíduos de ADP-ribose de moléculas de NAD⁺ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) para proteínas alvo, incluindo a própria PARP (Curtin; Szabo, 2020). São constituídas de três domínios principais: uma porção N-terminal de 46 kDa, que compreende o domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA binding domain*), que contém dois motivos de dedo de zinco, relacionados ao reconhecimento das quebras de DNA de fita simples e dupla; um domínio de automodificação central de 22 kDa que contém 15 resíduos de glutamato altamente conservados, considerados alvos de ação da auto-poli (ADP-ribosilação); e a região C-terminal de 54 kDa, a qual possui o local de ligação ao NAD⁺ e o domínio catalítico que sintetiza cadeias de poli (ADP-ribose) (PARs) (Langelier et al., 2012).

A superfamília das PARP é composta por pelo menos 18 membros, codificados por diferentes genes que compartilham homologia em um domínio catalítico conservado (Amé et al., 2004). Destes, quatro — PARP1, PARP2, PARP5A e PARP5B — são capazes de sintetizar as PARs, enquanto as demais enzimas da família constroem apenas unidades únicas de ADP-ribose e, portanto, são classificadas como mono(ADP-ribosil)ases (MARS)(Cohen; Chang, 2018). As PARPs, desempenham um papel importante em vários processos celulares, incluindo modulação da estrutura da cromatina, transcrição, replicação, recombinação e reparo do DNA (Morales et al., 2014). Além disso, eles também desempenham papéis importantes na regulação da estabilidade de proteínas, direcionando-as para ubiquitinação (Cohen; Chang, 2018).

Para a síntese das cadeias PAR, as PARPs clivam NAD⁺ entre os nucleotídeos nicotinamida e ribose e catalisam a transferência de ADP-ribose a resíduos de ácido glutâmico, asparagina ou lisina de proteínas receptoras. Subsequentemente, uma reação de alongamento e ramificação usando unidades ADP-ribose adicionais, leva à formação das PARs, estruturas altamente ramificadas e complexas de mais de 200 resíduos de ADP-ribose. Esse processo é conhecido como poli(ADP-ribosilação) ou

PARilação (Diefenbach; Bürkle, 2005; Pieper et al., 2000). A remoção dessas cadeias é feita principalmente pela enzima poli(ADP-ribose) glicohidrolase (PARG) que promove a rápida destruição catabólica de PAR, quase imediatamente após a síntese, permitindo assim o controle temporal das funções do PAR (Gibson; Kraus, 2012) (**figura 1**).

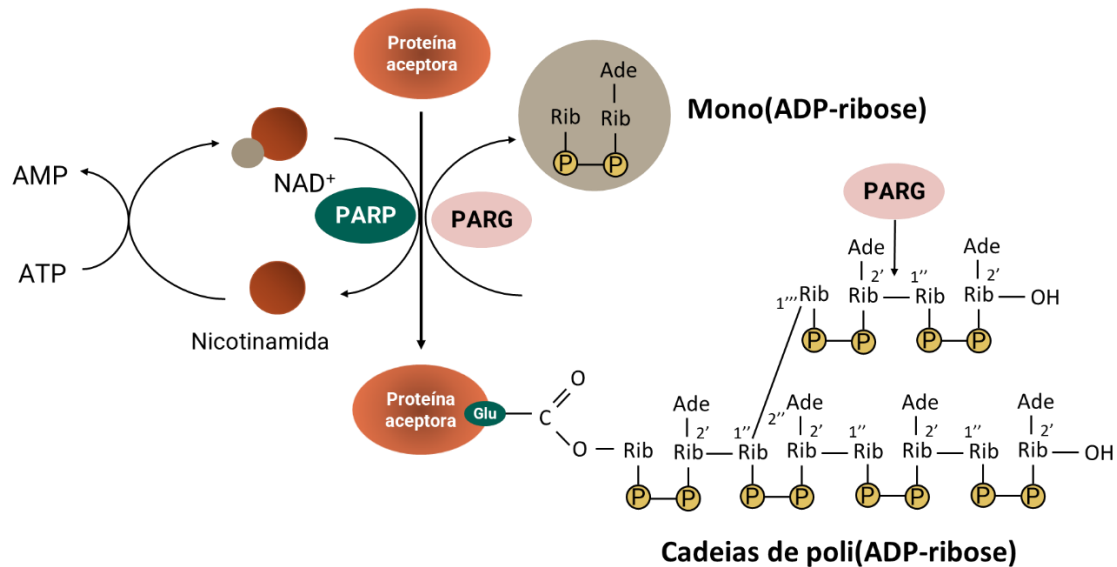


Figura 1. Mecanismo de ação das PARPs: NAD⁺ é usado como substrato para a formação de PAR e é reabastecido nas células a partir da nicotinamida, usando ATP. As cadeias PAR são rapidamente catabolizadas por PAR glicohidrolase (PARG). PARG cliva as ligações ribose-ribose da PAR. A clivagem da porção ADP-ribose terminal resulta na liberação de mono (ADP-ribose). (Fonte: Adaptado de Ray Chaudhuri; Nussenzweig, 2017).

Devido ao seu tamanho e alta densidade de carga negativa, as PARs podem alterar a estrutura de proteínas alvo e modificar interações entre PARPs e proteínas ou PARPs e ácidos nucleicos, ou funcionar como um andaime de recrutamento de proteínas altamente dinâmico (Cohen; Chang, 2018). Existem vários exemplos dessa função, incluindo a montagem de complexos de reparo de DNA durante o dano ao DNA, regulação da sinalização de Fator Nuclear kappa B (NF-κB), montagem do polo do fuso mitótico e montagem dos grânulos de estresse citoplasmático (Cohen; Chang, 2018). A PARilação, portanto, tem efeitos profundos nas propriedades bioquímicas ou fisiológicas das proteínas (Bai, 2015).

De todos os membros da superfamília das PARP, PARP1 é a enzima nuclear mais extensivamente estudada (Ray Chaudhuri; Nussenzweig, 2017). Descrita há mais de 50 anos, sabe-se hoje que PARP1 desempenha papéis importantes em múltiplos processos

metabólicos e de transdução de sinal, mas principalmente no reparo do DNA e na manutenção da integridade do genoma, sendo a formação das PAR, o evento mais precoce da resposta aos danos no DNA (Amé et al., 2004; Bai, 2015). Como consequência, esse evento leva ao recrutamento de proteínas e nucleases de reparo do DNA para os locais de dano, facilitando o reparo (Wang et al., 2019).

Em condições fisiológicas normais PARP1 é constitutivamente expressa na maioria das células, apresentando uma atividade basal, provavelmente mantida pela ocorrência fisiológica de danos ao DNA, possivelmente resultantes da produção endógena de espécies oxidativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*). No entanto, foi observado que em algumas doenças, há um aumento na expressão e atividade de PARP, o qual tem sido implicado na morte neuronal em uma série de condições patológicas incluindo isquemia, lesão de isquemia-reperfusão, inflamação, lesão neurológica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, entre outras (Curtin; Szabo, 2020). Nestas condições, o aumento dos níveis de ROS, que danificam o DNA, podem ser relacionados à hiperativação de PARP1 a qual gera uma drástica redução dos níveis de NAD⁺, podendo comprometer as funções celulares e levar à morte celular (Alano et al., 2010).

1.2 PARP nas doenças neurodegenerativas

A ativação da PARP no reparo do DNA ajuda no resgate de células danificadas, embora isso possa ocorrer após um leve dano no DNA, ocorre exatamente o contrário nos casos de danos excessivos (Pieper et al., 2000). Danos maciços ao DNA provocam um aumento substancial na atividade da PARP, promovendo um consumo rápido de NAD⁺ que leva ao seu esgotamento. NAD⁺ é uma coenzima importante no metabolismo energético e sua depleção resulta em menor produção de ATP o que, somado ao consumo de ATP na tentativa de re-sintetizar NAD⁺, promove uma crise celular energética que culmina em morte celular (Jagtap; Szabo, 2005). Além disso, foi relatado que o próprio polímero PAR é diretamente tóxico para os neurônios e a degradação dos mesmos pelas PARGs previne a morte celular induzida por esses polímeros (Andrabi et al., 2006).

O papel de PARP em doenças neurodegenerativas tem sido amplamente estudado em modelo animal. Abeti e colaboradores (2011) demonstraram que em co-culturas de células astrocíticas de ratos, a morte neural é mediada pela atividade da PARP em resposta ao estresse oxidativo gerado pela ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Nessas células, os efeitos do peptídeo β -amilóide são impedidos quando PARP é inibida. Adicionalmente, outros autores também mostraram que a nicotinamida, um inibidor endógeno de PARP, pode apresentar um potencial terapêutico em processos neurodegenerativos, devido à redução nos níveis de estresse oxidativo, apoptose e atividade de PARP1, conforme avaliados também em modelo animal em condições de exposição ao peptídeo A β (Turunc Bayrakdar et al., 2014).

A hiperativação da PARP1 desempenha, ainda, um papel fundamental na neurotoxicidade induzida pelo glutamato (Lau; Tymianski, 2010). A superativação dos receptores N-methyl-d-aspartato (NMDA) (Dong et al, 2009) devido ao aumento na expressão desse neurotransmissor, provoca um aumento dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, desencadeando uma cascata de eventos que eventualmente levam à hiperativação de PARP, que por sua vez resulta em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e, conseqüentemente, morte celular (Abramov; Duchon, 2008; Dong et al., 2009; Lau; Tymianski, 2010). Nesse contexto, as pesquisas nesse campo visam compreender o envolvimento da PARP-1 na etiologia das doenças neurodegenerativas e buscar novas abordagens terapêuticas para o tratamento da DA.

1.3 Estresse oxidativo

As ROS são produzidas naturalmente pelas células como resultado de processos bioquímicos como a transferência de elétrons mitocondrial (Curtin; Szabo, 2020). No entanto, uma característica proeminente nas doenças neurodegenerativas é o aumento na produção de ROS (Barnham et al., 2004). Embora existam múltiplas fontes endógenas de geração de ROS, incluindo o retículo endoplasmático, peroxissomos, lisossomas e membranas, as mitocôndrias são as maiores contribuintes, sendo responsável por cerca de 90% da produção dessas moléculas (Tönnies; Trushina, 2017).

As ROS são amplamente definidas como espécies químicas contendo oxigênio com propriedades reativas e incluem todos os metabólitos instáveis da molécula de oxigênio (O_2). Entre eles estão os radicais livres, definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares, tais como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$), além das espécies não radicalares, que são agentes oxidantes ou que podem ser facilmente convertidos em radicais, como ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3), oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Prasad et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Em baixas concentrações, as ROS exibem efeitos benéficos regulando a sinalização e a homeostase celular; em altos níveis, no entanto, as ROS, em especial os radicais livres, têm a capacidade de danificar componentes celulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Zhang et al., 2016), podendo também induzir a abertura dos poros e transição de permeabilidade mitocondrial (Rottenberg; Hoek, 2017). Os sistemas de defesa antioxidante no corpo humano mantêm o equilíbrio entre a produção e a neutralização de ROS e incluem as enzimas superóxido dismutase – Cu/Zn-SOD (SOD1) e Mn-SOD (SOD2) –, catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutationa S-transferase (GST) e glutationa (GSH) (Prasad et al., 2017; Zhang et al., 2016).

O equilíbrio entre a produção de ROS e a eficácia dos mecanismos de defesa antioxidante é essencial para a função celular normal. Existem dados consistentes na literatura que demonstram que o desbalanço nesse equilíbrio, favorecendo o estado pró-oxidante nas células, resulta em uma condição de estresse oxidativo, a qual se agrava progressivamente com o avançar da idade, desencadeando o desenvolvimento de doenças metabólicas, cardiovasculares e degenerativas (Görlach et al., 2015; Liu et al., 2017; Lobo et al., 2010). Em muitas doenças neurodegenerativas, a atividade das enzimas antioxidantes é alterada, contribuindo para o acúmulo de ROS, o que promove danos oxidativos irrestritos e, conseqüentemente, leva à morte celular (Tönnies; Trushina, 2017).

Uma série de dados na literatura mostram a participação de PARP1 em várias doenças neurodegenerativas nas quais as condições fisiopatológicas produzem quantidades genotóxicas de ROS (Mao; Zhang, 2022). Uma vez que níveis aumentados

de ROS podem resultar em lesões ao DNA, particularmente em bases de DNA oxidadas, como consequência, ocorre a hiperativação de PARP1, que gera uma drástica redução dos níveis de NAD⁺ promovendo um desequilíbrio eletroquímico na mitocôndria, que pode comprometer as funções celulares e assim levar à morte celular (Alano et al., 2010; Hocsak et al., 2017). Devido a isso, torna-se interessante compreender o envolvimento de PARP na DA, visto que os mecanismos moleculares implicados nessa abordagem ainda são pouco conhecidos. Nestas, o dano tecidual induzido por estresse oxidativo poderia ser evitado por meio da inibição farmacológica ou do silenciamento do gene de PARP1 (Czapski et al., 2006; D'Avila et al., 2012; Pellicciari et al., 2004).

1.4 Modelos *in vitro* no estudo de doenças neurodegenerativas

Em neurociência, existe uma carência de modelos *in vitro* adequados para pesquisas voltadas ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças (Agholme et al., 2010). Na impossibilidade de realizar biópsias de tecido cerebral humano, vários estudos têm sido realizados com linhagens de culturas neuronais primárias derivadas de ratos e camundongos.

Um modelo de células neurais já estabelecido e amplamente utilizado em pesquisas em neurociência é a linhagem celular PC12 (Darbinian, 2013). As células PC12, embora originárias de um feocromocitoma da medula adrenal de rato, exibem algumas características de neurônios dopaminérgicos maduros, sendo amplamente caracterizadas pela neurosecreção (catecolaminas, dopamina e norepinefrina) e pela presença de canais iônicos e receptores de neurotransmissores (Wang et al., 2015; Westerink; Ewing, 2008). Essas características, bem como a facilidade de cultivo e grande conhecimento sobre sua proliferação e diferenciação, fazem dessa linhagem um modelo amplamente versátil para estudos sobre manipulação farmacológica, atividade neurotóxica de várias substâncias e como modelo para doenças neurodegenerativas (De Los Rios et al., 2018; Grau; Greene, 2012; Wiatrak et al., 2020; Zeng et al., 2017). No entanto, esses modelos apresentam limitações, uma vez que não retratam, em sua totalidade, os processos metabólicos humanos (Shipley et al., 2016). Uma das alternativas encontradas pelos pesquisadores foi a utilização de células neuronais

transformadas, como a linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), embora esta possua origem tumoral.

A linhagem SH-SY5Y é um subclone neuroblástico da linhagem de neuroblastoma humano SK-N-SH, estabelecida em cultura em 1970 a partir de um tumor metastático de medula óssea (Kovalevich; Langford, 2013). No estado indiferenciado, as células SH-SY5Y são caracterizadas morfológicamente por corpos celulares não polarizados semelhantes a neuroblastos e tendem a crescer em aglomerados, podendo formar agrupamentos à medida que crescem umas sobre as outras na região central de uma massa celular (Kunzler et al., 2017). Várias características dessa linhagem conferiram vantagens quanto à sua utilização *in vitro*, tornando-a um importante modelo para estudos de neurotoxicidade e neuroproteção em pesquisa experimental, sendo frequentemente escolhida devido às propriedades neuronais colinérgicas e à facilidade de manutenção (Xicoy et al., 2017).

As células da linhagem SH-SY5Y possuem um cariótipo estável, composto por 47 cromossomos e, apesar de sua origem tumoral, são capazes de exibir um fenótipo neuronal funcional e morfológico quando expostas *in vitro* a vários agentes, como o ácido retinóico (AR), um metabólito ativo do retinol (Shiple et al., 2016). Por exposição a condições de diferenciação apropriadas com AR, as células SH-SY5Y podem ser direcionadas para fenótipos neuronais diferenciados e maduros, tornando-se mais representativas como modelo para estudos de neurotoxicidade ou neuroproteção na pesquisa experimental (Kunzler et al., 2017).

Alternativamente, Takahashi e Yamanaka (2006) obtiveram sucesso na indução de células pluripotentes de fibroblastos embrionários de camundongos, por meio da introdução de quatro fatores transcricionais, Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, sob condições de cultura de células tronco embrionárias (ES). As células resultantes, designadas células iPSCs (*induced pluripotent stem cells*), exibiram a morfologia, propriedades de crescimento e a expressão de genes marcadores de ES. As células iPSCs de origem humana podem ser obtidas a partir da reprogramação de fibroblastos, os quais são acessíveis por meio de biópsias da pele de doadores adultos e expandidas *in vitro* até um número infinito (Hossini et al., 2015; Seki; Fukuda, 2015). Um amplo interesse tem

sido direcionado para possíveis aplicações das células iPSCs em pesquisa, visto que, utilizando-se condições de cultivo adequadas, podem ser diferenciadas em diversos tipos celulares, incluindo células neuronais, clinicamente relevantes *in vitro* para a pesquisa de distúrbios neuronais (Ebrahimi et al., 2020; Kang et al., 2017; Kogut et al., 2014). As células progenitoras neurais (NPCs) são células derivadas da reprogramação de iPSCs e tem se tornado promissoras em neurociência, uma vez que fornecem populações de células homogêneas e proliferativas, constituindo, assim, um ótimo modelo experimental para o estudo de doenças neurodegenerativas (Bahmad et al., 2017; Hossini et al., 2015; Okano; Yamanaka, 2014).

Nesse contexto, a hipótese do presente projeto é que o quadro de estresse oxidativo, apresentado por pacientes com doenças neurodegenerativas, seria responsável por provocar uma série de danos ao DNA, os quais levariam à hiperativação da enzima PARP1 que promoveria uma crise energética nas células, levando à morte dos neurônios. A hiperativação de PARP1 seria, portanto, uma das causas da neurodegeneração em indivíduos com essas doenças. Em contrapartida, sob condições experimentais, a inibição de PARP1 poderia ser capaz de proteger as células frente a danos oxidativos, induzidos em diferentes modelos neurais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O trabalho tem por objetivo caracterizar vários tipos de efeitos biológicos da inibição da enzima PARP1 pelo composto NU1025, em resposta aos danos induzidos pelo H₂O₂, em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) indiferenciadas e diferenciadas em neurônios maduros, bem como em células progenitoras neurais (NPC5461) e em células de feocromocitoma de rato (PC12).

2.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar experimentos para obtenção de neurônios maduros a partir da diferenciação da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y e caracterizar a neurodiferenciação através de análises da morfologia e expressão de marcadores neuronais.
- 2) Avaliar a viabilidade celular após inibição de PARP1 frente a indução de danos oxidativos com o H₂O₂ nas células SH-SY5Y (indiferenciadas e neurodiferenciadas), NPC5461 e PC12;
- 3) Estudar os efeitos da inibição de PARP1 na indução de morte celular, fragmentação no DNA (quebras simples e duplas) e alterações no ciclo celular nas células SH-SY5Y (indiferenciadas e neurodiferenciadas) após a indução de danos oxidativos com o H₂O₂;
- 4) Avaliar os níveis do radical superóxido intracelular e mitocondrial, alterações no potencial de membrana mitocondrial e na massa mitocondrial, nas células SH-SY5Y indiferenciadas, após inibição de PARP1 e indução de danos oxidativos;
- 5) Determinar os efeitos da inibição de PARP no sistema antioxidante por meio da análise dos níveis de expressão de SOD1 nas células SH-SY5Y indiferenciadas, após indução de danos oxidativos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens Celulares e Cultivo Celular

As linhagens de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e de feocromocitoma de rato (PC12) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e na *American Type Culture Collection* (ATCC), respectivamente. As células foram mantidas em nitrogênio líquido (-195 °C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL com solução de criopreservação (90% soro bovino fetal e 10% DMSO). Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas em frascos de cultura de 25 cm² com 10 mL de meio de cultura constituído de DMEM + HAM F10 (1:1 – Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% de solução de penicilina (100 unidades/mL - Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1% de estreptomicina (10mg/mL - Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂, até atingirem o estado de semi-confluência, cerca de 80% ($\sim 5 \times 10^6$ células). As células foram despregadas dos frascos com solução de tripsina - EDTA (0,05%) e subcultivadas em placas de 12 ou 24 poços para realização dos protocolos de tratamento. Inicialmente a linhagem foi avaliada quanto à presença ou ausência de contaminação por micoplasma, utilizando o corante Hoechst 33342 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e análise em microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioplan 2). Foram utilizadas somente as células livres de contaminação por micoplasma.

Foram também utilizadas as células precursoras neurais (NPC5461) derivadas de um indivíduo sadio feminino, adolescente, proveniente do Lab. do Dr Allysson Muotri (Universidade da Califórnia, San Diego, CA, EUA), gentilmente cedidas pelo Prof. Carlos F.M Menck (ICB-USP), as quais foram cultivadas de acordo com protocolo de Vessoni e colaboradores (2016). Resumidamente, foi realizado o cultivo destas células em placas revestidas com poli-l-ornitina (PO, 10 µg/mL) e laminina (2,5 µg/ml), na presença de meio de crescimento neural (NG - *Neural Growth*) composto por DMEM/F12 1:1 com L-glutamina suplementado com 0,5 µg *Neuroplex* X N2, 0,5 X B27, 1% penicilina/estreptomicina (*Life Technologies*).

3.2 Ensaio de neurodiferenciação

A neurodiferenciação foi realizada na linhagem neuronal SH-SY5Y. As células foram cultivadas em placas de seis poços (1×10^5 células/poço), segundo o protocolo de Lopes e colaboradores (2017). O meio de cultura contendo 1% de SBF e AR ($10 \mu\text{M}$) foi trocado a cada dois dias para manter o tratamento, até completar 8 dias.

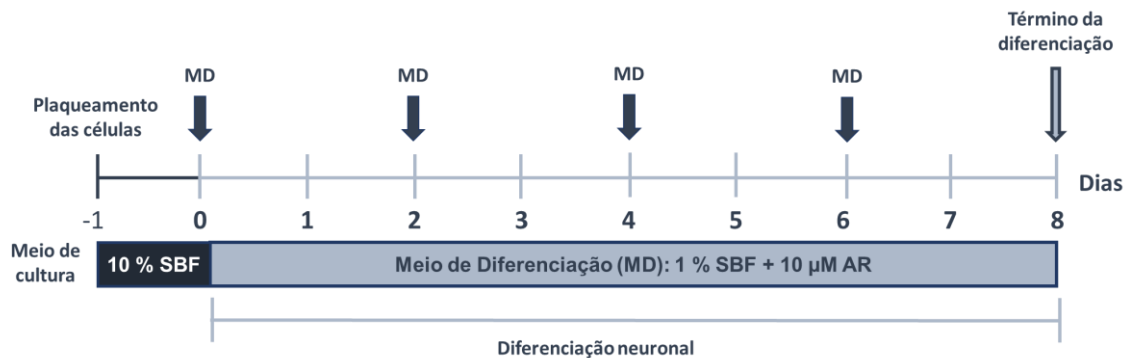


Figura 2. Protocolo de diferenciação das células da linhagem SH-SY5Y com AR. As células foram semeadas (dia -1) em placas com meio de cultura DMEM/F10 contendo 10% de SBF e mantidas em estufa a 37°C e $5\% \text{CO}_2$ por 24h para aderência. Após esse período, o meio é removido e é adicionado meio de diferenciação (MD) composto por DMEM/F10 com 1% de SBF e AR a $10 \mu\text{M}$. O meio de diferenciação é trocado a cada 2 dias até o término da diferenciação (após 8 dias).

3.3 Ensaio de imunofluorescência

Após os ensaios de neurodiferenciação pelo período de 8 dias, as células foram fixadas (PBS-paraformaldeído 3%) por 10 min, sendo posteriormente lavadas com PBS e permeabilizadas (PBS-Triton X-100 0,2%). As células foram, então, incubadas em PBS-BSA 2% contendo os anticorpos primários utilizados para a detecção de marcadores neuronais maduros: anti-rabbit β -III-Tubulina (Abcam); anti-rabbit MAP2 (Abcam) e anti-rabbit NeuN (Abcam) por 45 min a 37°C e posteriormente lavadas. Em seguida, as células foram incubadas (PBS-BSA 1%) com anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor® 488 ou anti-rabbit Alexa Fluor® 647 (Invitrogen) diluído 1:200 por 30 min a 37°C . Por fim, as células foram coradas com Hoechst 33342 ($0,15 \mu\text{g}/\text{mL}$) e, em seguida as lâminas foram preparadas e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss).

3.4 Tratamentos com inibidor de PARP e H₂O₂

As células foram tratadas com o inibidor farmacológico de PARP-1, NU1025 (Sigma Aldrich), utilizado na concentração de 200 µM, sendo adicionado previamente (20 min.) ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 30 µM), o qual foi mantido por 4 h. As concentrações e tempos foram baseados em ensaios preliminares (Montaldi et al., 2015).

De modo geral, as células foram semeadas em placas de 12 poços (4X10⁵ células/poço) e, após 24 h de estabilização, foi adicionado o inibidor de PARP-1 (NU1025) por 20 min. Em seguida, com o inibidor ainda em cultura, foi acrescentado o H₂O₂, o qual foi mantido por 4h. Após esse período, o meio de tratamento foi removido, sendo em seguida adicionado meio de cultura completo, o qual foi mantido nas células em cultura até o momento em que as células foram coletadas e analisadas para cada tipo de ensaio empregado. Como controle foi utilizado o DMSO a 0,2 % (solvente do inibidor).

3.5 Viabilidade celular para análise de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o kit-XTT (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals*) que possibilita detectar células viáveis, baseado no princípio de que as células metabolicamente ativas devem clivar o sal amarelo tetrazolium XTT, formando um corante formazam (cor alaranjada). As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4 x 10⁵ células/poço), e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 e 120 h após o tratamento com o H₂O₂. Após esse tempo, as células foram incubadas com uma solução composta por DMEM sem fenol vermelho e XTT/eléctron (preparada de acordo com as instruções do fabricante). O reagente permaneceu em contato com as células por cerca de 2 h a 37 °C, até que ocorresse a mudança na coloração para alaranjado. Foi, então, realizada a leitura colorimétrica (492 e 690 nm) em um espectrofotômetro (*Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek*), o qual apresenta um resultado de absorbância diretamente proporcional ao número de células vivas da amostra medida. O tratamento com DMSO, foi considerado como controle (correspondendo a 100% de viabilidade).

3.6 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo

As alterações no ciclo celular foram avaliadas pelo uso do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídeo. As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço) e os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . De cada amostra foram, então, separadas alíquotas que foram lavadas com PBS e centrifugadas a 112g por 5 min. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% gelado e mantido, posteriormente, a $-20^\circ C$ até o momento da leitura no citômetro de fluxo. Para a leitura no citômetro, o material armazenado foi centrifugado (112g por 5 min) e o etanol 70%, removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X gelado e novamente centrifugado. O PBS foi então removido e o precipitado novamente ressuspensionado em 200 μL da solução de iodeto de propídeo, composta por PBS 1X, Iodeto de propídeo (3 mg/mL), Ribonuclease A (10 mg/mL) e Triton X-100 (0.2%). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, o material foi analisado no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* pelo programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Technologies)*, no qual foram analisados, ao menos, 5000 eventos para cada amostra.

3.7 Ensaio Cometa alcalino para detecção de quebras no DNA

O ensaio cometa foi utilizado para sinalizar as quebras de fita simples (SSB - *single strand breaks*) ou dupla (DSB - *double strand breaks*) e danos oxidativos nas bases, através da utilização da enzima hOGG1, que detecta primordialmente danos oxidativos por 8-oxo-dG (Valavanidis et al., 2009). Para a realização desse ensaio as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço), e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Singh e colaboradores (1988). Após os tratamentos, as células foram lavadas com solução de PBS 1X, centrifugadas a 112g por 5 min e o *pellet* ressuspensionado em 400 μL de PBS 1X. As células foram adicionadas a 400 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a $37^\circ C$ e adicionadas às lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para

uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para polimerização da agarose. Para cada amostra foram confeccionadas e analisadas duas lâminas. Após a polimerização da agarose, a lamínula foi removida e as lâminas imersas na solução de lise (5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz e deixada à baixa temperatura (4 °C) por um período de 12 h a 48 h.

Após a imersão das lâminas em solução de lise, as mesmas foram lavadas em solução de PBS 1X a 4 °C por 5 min. Em seguida, foram imersas duas vezes por mais 5 min, em uma solução de tampão de enzima hOGG1 (Hepes 40mM, KCl 0,1M, EDTA 0,5mM e BSA 0,2%). Posteriormente, as lâminas foram retiradas da solução e nelas adicionado 50 µL de tampão de enzima contendo 0,1 U de hOGG1, sendo cobertas com lamínulas e incubadas em uma câmara úmida à 37°C por 20 min. Após esse período, as lâminas foram mantidas a -20 °C por 1 min, para facilitar a retirada das lamínulas. Em seguida, estas foram transferidas para uma cubeta contendo solução de eletroforese a 4 °C, e mantidas por 20 min.

Por fim, as lâminas foram dispersas em uma cuba de eletroforese contendo o tampão de eletroforese e submetidas a uma corrente de 25V e 300mA por 20 min. Em seguida, as lâminas foram imersas em um tampão de neutralização por 15 min, fixadas com etanol absoluto por 3 min e então coradas com 50 µL de *SYBR Green 2X*, para a análise em microscópio de fluorescência (*Zeiss*, com filtro 516-560nm) acoplado a um computador para uso do *software CometAssay IV* (*TriTek Corp., USA*).

3.8 Análise de morte celular

A análise de morte celular foi realizada com a Anexina V, uma proteína de ligação à fosfatidilserina (PS), a qual interage forte e especificamente com os resíduos deste fosfolipídio os quais são externalizados na membrana das células apoptótica. Nesse ensaio também foi utilizado o corante 7-AAD, um corante de DNA impermeável, que permite a detecção células necróticas. As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4 x 10⁵ células/poço) e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4). Após 24 h as células foram coletadas e centrifugadas a 112g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado de células foi adicionado o *binding buffer*. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado

e as amostras incubadas por 15 min a temperatura ambiente em solução contendo com 100 μL de *binding buffer* com 5 μL de anexina V. Então, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado celular ressuspenso em solução de 100 μL de *binding buffer* com 5 μL de 7-AAD. As amostras foram então analisadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* pelo programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Technologies)*, no qual foram analisados, ao menos, 5000 eventos para cada amostra. Os resultados foram apresentados como porcentagem de células positivas para Anexina (apoptose) e para 7-AAD (necrose).

3.9 Análise de espécies reativas de oxigênio

A geração de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) celular é reconhecida pelo indicador de superóxido *dihidroetídio* – DHE (*Thermo Fisher Scientific*) citosólico, que exibe fluorescência azul em sua forma reduzida, entretanto, uma vez na presença de radicais livres ocorre sua oxidação em etídio, um intercalante de DNA que cora em vermelho fluorescente o núcleo da célula. Já a geração mitocondrial do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é reconhecida pelo reagente *MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific)* que atua permeabilizando as células vivas, atingindo seletivamente as mitocôndrias. É rapidamente oxidado pelo superóxido, sendo que o produto oxidado se torna altamente fluorescente após ligação ao ácido nucleico. Para esse ensaio, as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço), e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . De cada tratamento, foram separadas duas alíquotas de células, ressuspenso em PBS suplementado com SBF (10%), nas quais foi utilizado um dos corantes específicos para análise do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ intracelular e mitocondrial. Os reagentes DHE e *MitoSox Red* foram mantidos em contato com as células na concentração de 1,5 μM por 30 min. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C durante o tempo necessário para a incorporação dos corantes. Foram utilizados o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* e o programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Technologies)* para a detecção dos sinais de fluorescência, bem como para as análises. Na aquisição foram consideradas 5.000 células por amostra.

3.10 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi mensurada por citometria de fluxo, descrito por Scheibye-Knudsen e colaboradores (2012). Esse ensaio se baseia na capacidade das membranas mitocondriais manterem uma diferença no potencial elétrico entre o interior e o exterior da organela, sendo este denominado potencial de membrana. A *tetrametilrhodamina* (TMRM - *Thermo Fisher Scientific*) é um corante vermelho-alaranjado que se acumula nas mitocôndrias que apresentam potencial de membrana normal, gerando um sinal forte. Quando há perda do potencial da membrana mitocondrial, o acúmulo de TMRM cessará e o sinal irá diminuir ou desaparecer. Para proceder esse ensaio, as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço) e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . Ao final desse período, realizou-se a coleta das células e o corante TMRM (40 nM) foi adicionado, permanecendo por 30 min a 37 °C para a análise no citômetro de Fluxo *Guava EasyCyte Mini System* pelo programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Na aquisição foram consideradas 5.000 células por amostra.

3.11 Quantificação de massa mitocondrial

O *MitoTracker Green* (*Thermo Fisher Scientific*) é um marcador mitocondrial verde-fluorescente permeável às células vivas. O mesmo é utilizado para marcar mitocôndrias, localizando-as independentemente do seu potencial de membrana. Deste modo, as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço), e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . Após esse período, realizou-se a coleta das células às quais foi adicionado uma solução de 250 μ L de PBS e o reagente *MitoTracker Green* (50 nM), seguido de incubação por 30 min para análise em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* pelo programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*), sendo contados 5.000 eventos para cada amostra

3.12 Avaliação da expressão proteica por Western Blotting

3.12.1 Extração de proteínas com solução de lise

Para a extração de proteínas, foi utilizado o reagente *RIPA Lysis and Extraction Buffer* (*Thermo Fisher Scientific*). As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (4×10^5 células/poço), e tratadas de acordo com o protocolo experimental (item 3.4), sendo os resultados avaliados 24 h após o tratamento com o H_2O_2 . Brevemente, após os ensaios as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 112g por 5 min e o precipitado ressuspenso em solução de lise gelada ($100 \mu\text{L}/10^6$ células) com a adição de 1% de *Protease Inhibitor Cocktails* (*Thermo Fisher Scientific*). As células foram ressuspenso por agitação rápida durante 10 min em um agitador rotatório de 161g. Após esse processo, as células foram centrifugadas a 14.000g por 15 min a -4°C e o sobrenadante foi transferido para microtubos de centrífuga e armazenados em freezer -80°C . As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro pela comparação com uma curva-padrão obtida por uma proteína controle *Bovine Serum Albumin* (BSA) utilizando o kit BSA (*Pierce*).

3.12.2 Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas foi realizada com a utilização de gel *NuPAGE Bis-Tris Gels* (*Invitrogen*). As amostras foram preparadas com 20 μg de proteínas que foram desnaturadas a 90°C por 5 min e, em seguida, aplicados no gel de eletroforese. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*). A eletroforese foi realizada a 200V por 40 min em cuba (*XCell SureLock™ Mini-cell - Invitrogen*). Após a eletroforese foi realizado a transferência das proteínas para uma membrana *Invitrolon PVDF* (*Invitrogen*) utilizando o sistema *XCell II™ Blot Module* (*Invitrogen*). A voltagem utilizada para a transferência foi de 30V aplicada por cerca de 5 h. Após esse tempo, a membrana foi lavada com água *MilliQ* (ultrapura) e armazenada.

3.12.3 Imunodeteção e visualização de Proteínas

Com a utilização do kit *Western Breeze Chrimigenic* (*Invitrogen*) foi realizada a imunodeteção e visualização das proteínas. Inicialmente foi realizado o bloqueio da

membrana com 10 mL de solução de bloqueio e incubada por 60 min em um agitador rotatório. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 10 mL de água *MilliQ* durante 5 min e incubada com 4 mL do anticorpo primário por 5 h. Logo após, foram realizadas quatro lavagens de 5 min com 10 mL de solução de lavagem *Wash Solution (Invitrogen)* e retirado o excesso da solução com duas lavagens de 10 mL de água *MilliQ* por 5 min. Dando sequência, a membrana foi então incubada com 4 mL de solução de anticorpo secundário anti-rabbit (*invitrogen*) por 30 min, sendo em seguida lavada novamente quatro vezes por 5 min com solução de lavagem e, em seguida, foi retirado o excesso com duas lavagens de 5 min com água *MilliQ*. Por fim, as membranas foram secas em papel filtro e armazenadas. Os anticorpos utilizados neste trabalho foram os seguintes: *anti-rabbit SOD1* (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*), *anti-rabbit β -III-Tubulina* (proporção 1:1000 - *Abcam*) e o endógeno anti-rabbit β -actina (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*), que foi utilizado para o controle de normalização. Para visualização das proteínas, as membranas foram escaneadas utilizando um fotodocumentador *ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences)* e as bandas foram quantificadas utilizando o programa *Image Studio Live Ver 5.0 (Lite Software)*, sendo os valores relativos à quantificação normalizada em relação à proteína endógena.

3.13 Análises estatísticas

Para cada ensaio foram realizados ao menos três ensaios independentes, cujos resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise estatística dos resultados empregou-se os testes *Two-Way ANOVA* ou *One-Way ANOVA*, com pós-teste de *Tukey*, para mais de três grupos experimentais, ou teste-*t* para amostras independentes, as quais foram comparadas ao controle negativo. O *software Prism v. 5.0 (GraphPad software)* foi utilizado para as análises e construção dos gráficos, sendo $p < 0,05$ o valor considerado como significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 A inibição de PARP potencializa os efeitos do H₂O₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas

Após a inibição de PARP1 e indução de danos oxidativos, a viabilidade celular foi avaliada nas células SH-SY5Y indiferenciadas. Em comparação ao controle negativo (DMSO), o tratamento isolado com o H₂O₂ não alterou a viabilidade das células no tempo de 24 h e 120 h. O tratamento com o inibidor de PARP1 (NU1025) apresentou uma viabilidade celular de 131,5%, representando um aumento significativo de 31,5% ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo, e de 29,8% ($p < 0,001$) quando comparado ao H₂O₂, no entanto, esse resultado só foi observado após 24 h de recuperação, não sendo observado no tempo de 120 h. Além disso, após 24 h, o tratamento combinado (NU1025 + H₂O₂) apresentou uma viabilidade celular de 56,6%, sendo esta uma redução de 44% ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo, de 75,5% ($p < 0,001$) quando comparado ao tratamento isolado com NU1025, e de 45,7% ($p < 0,001$) na comparação com o tratamento isolado com H₂O₂. Um resultado muito similar foi observado após 120 h de tratamento. Nesse tempo na combinação de NU1025 e H₂O₂ a viabilidade celular observada foi de 54,6%, o que representou uma redução na viabilidade celular de 45,4% ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo, 36,2% ($p < 0,001$) quando comparado ao tratamento isolado com H₂O₂ e 42,5% na comparação com o tratamento isolado com o inibidor (**figura 3, Tabela 1**).

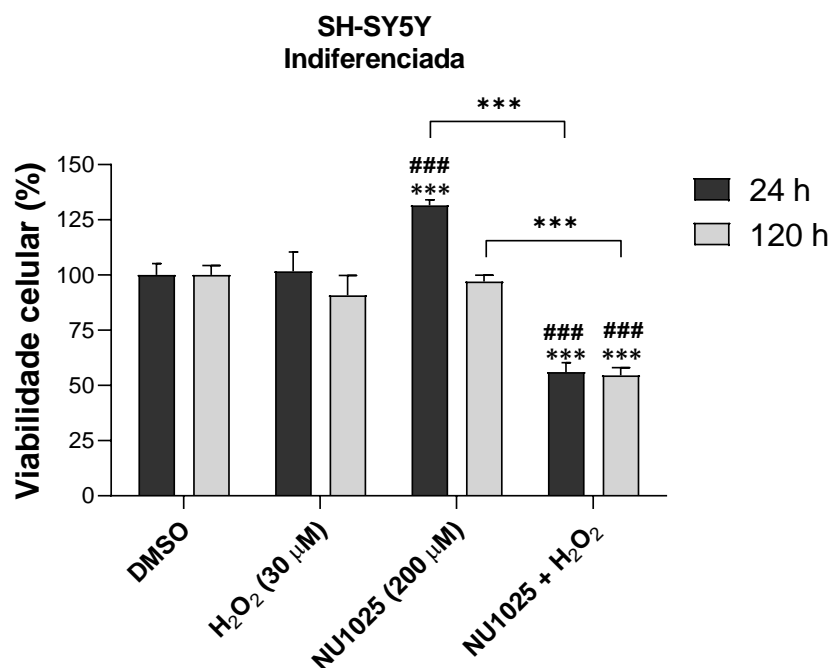


Figura 3. Viabilidade celular das células SH-SY5Y indiferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística: *Two-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. ***p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo; as barras representam a comparação entre os grupos; ###p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao H₂O₂. DMSO 0,2% (controle negativo).

Tabela 1. Porcentagens de viabilidade celular obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h e 120 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Viabilidade celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	Tempo (horas)	
	24	120
DMSO	100 ± 5,2	100 ± 4,3
H ₂ O ₂ (30 µM)	101,7 ± 8,7	90,8 ± 9,0
NU1025 (200 µM)	131,5 ± 2,5 ***###	97,1 ± 2,8
NU1025 + H ₂ O ₂	56 ± 4,3 ***###	54,6 ± 3,5 ***###

***p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo; ###p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.2 A combinação de NU1025 e H₂O₂ promove aumento da fração Sub-G1 nas células SH-SY5Y indiferenciadas

Após os tratamentos, foi avaliado se a inibição de PARP1 e os danos provocados pelo H₂O₂ nas células SH-SY5Y indiferenciadas poderiam alterar a cinética do ciclo celular. As células foram tratadas com NU1025 por 20 min, em seguida com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. O tratamento com o H₂O₂ promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) na proporção G0/G1 de 9,5%, quando comparado ao controle negativo e 8%, quando comparado ao tratamento isolado com o inibidor NU1025. No entanto, esse resultado não foi observado quando o H₂O₂ foi utilizado em conjunto com o inibidor de PARP1 (**figura 4A; Tabela 2**).

Já quando se avaliou a proporção de células em Sub-G1, o tratamento isolado com o H₂O₂ induziu um aumento significativo de 12,3% ($p < 0,05$) da proporção de Sub-G1 quando comparado ao controle negativo. No entanto, o aumento em Sub-G1 promovido pelo H₂O₂ quando combinado à inibição de PARP-1, foi ainda maior, 15,8% ($p < 0,01$); no entanto, apesar desse aumento observado, não houve diferença significativa entre o tratamento combinado (NU1025 + H₂O₂) em comparação ao H₂O₂ isolado (**figura 4B; Tabela 2**). O aumento da proporção de sub-G1 nas células indiferenciadas evidencia os efeitos deletérios do H₂O₂, uma vez que sub-G1 retrata a fragmentação do material genético associada a processos de morte celular.

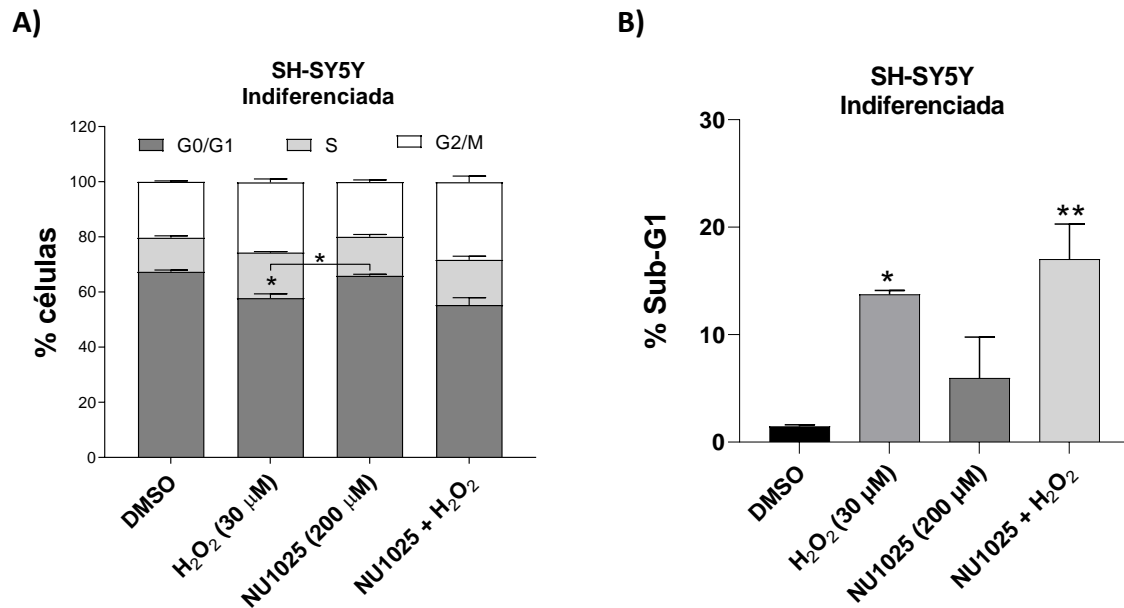


Figura 4. Distribuição das células SH-SY5Y indiferenciadas nas diferentes fases do ciclo celular (A) e Sub-G1 (B). As células foram tratadas com NU1025 por 20 min, em seguida com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *Two-Way ANOVA* (ciclo celular) e *One-Way ANOVA* (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 2. Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way ANOVA* (ciclo celular) e *One-Way ANOVA* (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)			
	Fases do ciclo celular			
	Sub G1	G0/G1	S	G2/M
DMSO	1,4 ± 0,2	67,3 ± 0,6	12,3 ± 0,7	20,3 ± 0,4
H ₂ O ₂ (30 μM)	13,7 ± 0,4*	57,8 ± 1,5*	16,5 ± 0,3	25,4 ± 1,2
NU1025 (200 μM)	5,9 ± 3,8	65,9 ± 0,5#	14,1 ± 0,9	19,9 ± 0,8
NU1025 + H ₂ O ₂	17,0 ± 3,3**	55,3 ± 2,6	16,3 ± 1,3	28,2 ± 2,2

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. # $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.3 A combinação de NU1025 e H₂O₂ induz quebras no DNA em células SH-SY5Y indiferenciadas

Os efeitos da inibição de PARP-1 na indução de danos no DNA foram avaliados quanto a geração de quebras no DNA (SSB e DSB) detectadas pelo ensaio cometa, com a enzima *hOGG1*, a qual permite também detectar quebras geradas pela remoção de bases oxidadas presentes no DNA. O tratamento combinado (NU1025 + H₂O₂) gerou uma taxa de 25% de DNA na cauda, o que significou um aumento significativo de 16% ($p < 0,01$), quando comparado ao controle negativo; 10% ($p < 0,05$), quando comparado ao tratamento isolado com H₂O₂; e 16,5% ($p < 0,01$), na comparação com o tratamento isolado com NU1025 (**figura 5; Tabela 3**). O inibidor testado de forma isolada não causou fragmentação do DNA, da mesma forma como foi observado por meio da avaliação de fração sub-G1, demonstrando que a indução de quebras no DNA promovida pelo H₂O₂ é potencializada pela inibição de PARP em células SH-SY5Y indiferenciadas, apesar de o H₂O₂ isoladamente não produzir um efeito significativo.

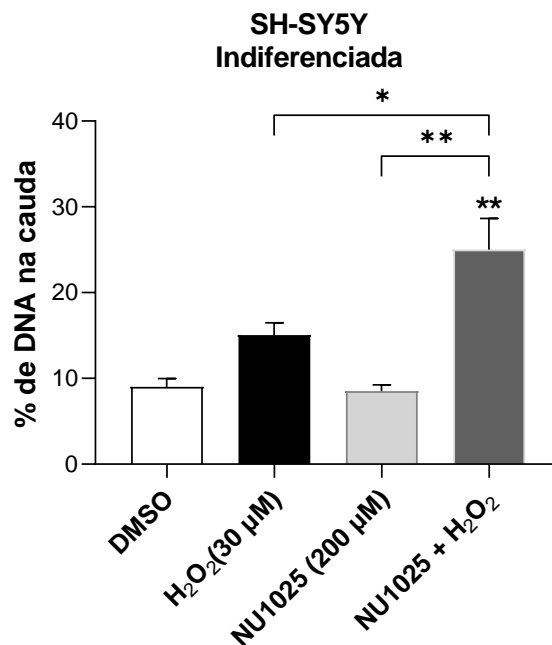


Figura 5. Danos no DNA avaliados pelo ensaio do cometa após tratamento das células com NU1025 por 20 min, em seguida com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os dados foram representados como porcentagens de DNA na cauda. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* com o pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 3. Porcentagens de danos no DNA avaliados pelo ensaio do Cometa após o tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Danos no DNA (%) \pm Erro Padrão da Média (EPM)
DMSO	9,0 \pm 1,0
H ₂ O ₂ (30 μ M)	15,0 \pm 1,4
NU1025 (200 μ M)	8,5 \pm 0,7
NU1025 + H ₂ O ₂	25,0 \pm 3,6 ^{**#}

** $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo.
 # $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.4 A inibição de PARP aumenta as taxas de necrose promovidas pelo H₂O₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas

A indução de morte celular por apoptose e necrose foi avaliada nas células SH-SY5Y indiferenciadas após a inibição de PARP1 e indução de danos oxidativos, isto é, tratamento com NU1025 por 20 min seguido de H₂O₂ por 4 h. Foi observado que o tratamento isolado com H₂O₂ induziu a um aumento significativo nas taxas de necrose de mais de 17% ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo e de 14,2% ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento isolado com o inibidor. Por outro lado, quando combinado à inibição de PARP1, o aumento nas taxas de necrose promovidos pelo H₂O₂ foi ainda maior, sendo observado um aumento de 39,7 % ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo, 22,6% ($p < 0,001$) quando comparado ao tratamento isolado com H₂O₂ e 36,8% ($p < 0,001$) na comparação com o tratamento isolado com o inibidor. Não foram observados aumentos significativos nas taxas de morte celular no tratamento isolado com o inibidor de PARP (**figura 6; Tabela 4**). De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de apoptose, em nenhum dos tratamentos realizados. Dessa forma, foi possível observar que a inibição de PARP duplicou as taxas de morte celular por necrose promovidas pelo H₂O₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas, ao contrário do ocorrido quanto à apoptose.

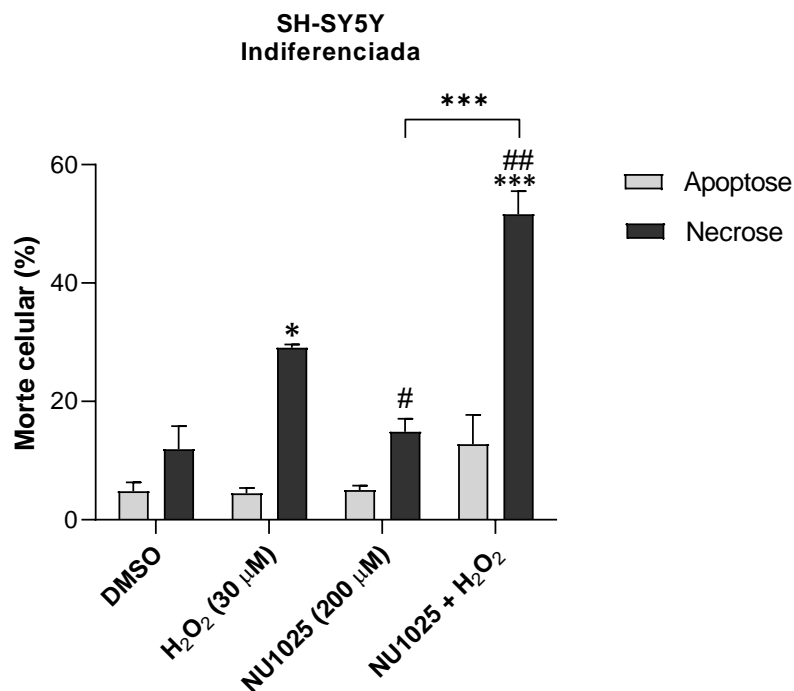


Figura 6. Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*), por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. **p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e a barra indica as comparações entre os grupos; #*p*<0,05; ##*p*<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 4. Porcentagens de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*), por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Morte celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	Apoptose	Necrose
DMSO	4,8 ± 1,5	11,9 ± 3,9
H ₂ O ₂ (30 µM)	4,5 ± 0,9	29,1 ± 0,6*
NU1025 (200 µM)	5,0 ± 0,7	14,9 ± 2,2#
NU1025 + H ₂ O ₂	12,8 ± 5,0	51,6 ± 3,9***##

* <0,05; ****p*<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. #*p*<0,05; ##*p*<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.5 Aumento nos níveis de superóxido intracelular e mitocondrial após inibição de PARP e indução de estresse oxidativo em células SH-SY5Y indiferenciadas

Foram avaliados os efeitos da inibição de PARP-1 em resposta à indução de danos oxidativos, quanto à produção de $O_2^{\bullet-}$ intracelular e nas mitocôndrias. O tratamento combinado do H_2O_2 com o inibidor NU1025, aumentou significativamente os níveis intracelulares desse radical em 66,7% ($p < 0,001$), quando comparado ao controle negativo; 62,8% ($p < 0,001$) quando comparado ao H_2O_2 e 84,5% ($p < 0,001$) na comparação com o tratamento isolado com o inibidor. Os tratamentos isolados, não promoveram alterações significativas nos níveis intracelulares de $O_2^{\bullet-}$ (**figura 7A; Tabela 5**).

Quanto aos níveis de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, foi observado que, quando comparados ao controle negativo, todos os tratamentos empregados elevaram significativamente a sua produção, sendo esse aumento de 20,8% ($p < 0,01$) para o tratamento isolado com H_2O_2 , 33,8% ($p < 0,001$) para o tratamento isolado com NU1025 e 40,4% ($p < 0,001$) para o tratamento combinado. Um aumento significativo também foi observado na comparação do tratamento combinado com o tratamento isolado com H_2O_2 (19,6%; $p < 0,001$) (**figura 7B; Tabela 5**).

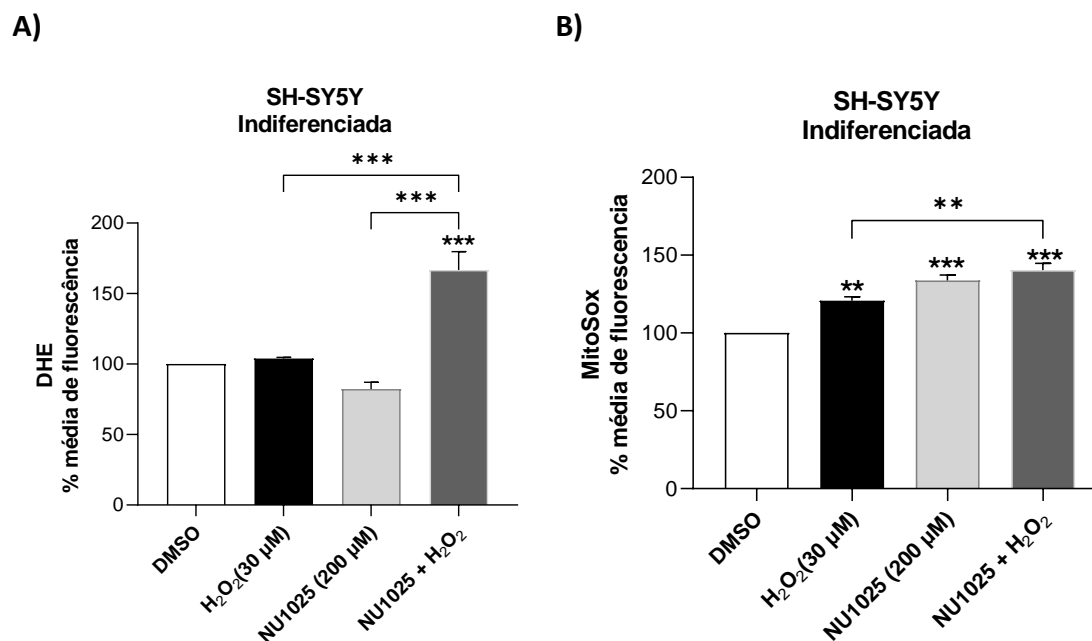


Figura 7. Quantificação de ROS após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. (A) ROS intracelular mensurado pela marcação com o corante *Dihydroethidium* (DHE - 1,5 μM). (B) ROS mitocondrial mensurado pela marcação com o corante *MitoSox red* (1,5 μM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística One-Way ANOVA e pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 5. Intensidade média de fluorescência para quantificação de ROS após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. ROS intracelular mensurado pela marcação com o corante *Dihydroethidium* (DHE - 1,5 μM) e ROS mitocondrial mensurado pela marcação com o corante *MitoSox Red* (1,5 μM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Intensidade média de fluorescência (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	DHE	MitoSox Red
DMSO	100 ± 0,0	100 ± 0,0
H ₂ O ₂ (30 μM)	103,9 ± 0,8	121 ± 2,5**
NU1025 (200 μM)	82,2 ± 5,0	134 ± 3,5***
NU1025 + H ₂ O ₂	166,7 ± 13,1***###	140 ± 4,4***##

** p<0,01; ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. ## p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.6 A inibição de PARP potencializa a redução do potencial de membrana mitocondrial promovida pelo H₂O₂ em células SH-SY5Y indiferenciadas

Também foram avaliados os efeitos da inibição de PARP-1 quanto a alterações no potencial de membrana mitocondrial (marcação com TMRM) e alterações na massa mitocondrial (marcação com o corante *MitoTracker Green*); as células foram tratadas com NU1025 por 20 min, seguido de H₂O₂ por 4 h. Foi observado que o tratamento isolado com H₂O₂ provocou uma redução no potencial de membrana mitocondrial de 34,5% (p<0,01) quando comparado ao controle negativo e 39,5% (p<0,01) quando comparado ao tratamento isolado com o inibidor. O mesmo efeito foi observado quando o H₂O₂ foi utilizado em conjunto com o inibidor, sendo observado neste tratamento uma redução de 25,9% (p<0,05) comparado ao controle negativo e de 30,9 % comparado ao tratamento isolado com o inibidor. Porém, não foram observadas diferenças significativas quando comparado o tratamento combinado (NU1025 + H₂O₂) com o H₂O₂ isolado (**figura 8A; Tabela 6**).

Em relação à massa mitocondrial, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos quando comparados ao controle negativo. No entanto, na combinação de NU1025 + H₂O₂, observou-se um leve aumento na massa mitocondrial que, apesar de não significativo quando comparado ao controle, foi significativo quando comparado aos tratamentos isolados. Esse aumento foi de 12,2% (p<0,01) quando comparado ao tratamento isolado com H₂O₂ e de 14,5% (p<0,01) quando comparado ao tratamento isolado com o inibidor (**figura 8B; Tabela 6**).

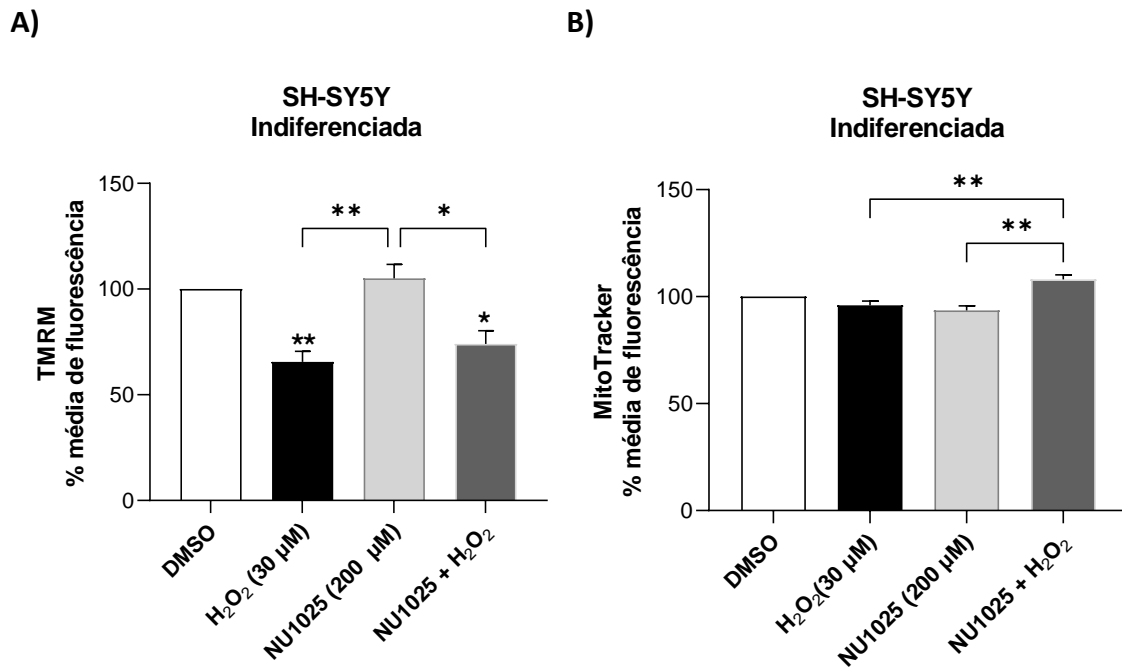


Figura 8. Análises de parâmetros mitocondriais após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. (A) Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante *Tetramethylrhodamine* (TMRM – 40 nM). (B) Massa mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoTracker Green* (50 µM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. *p<0,05; ** p<0,01; indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 6. Intensidade média de fluorescência de alterações mitocondriais das células SH-SY5Y indiferenciadas após tratamento com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Potencial de membrana mitocondrial avaliado pela marcação com o corante *Tetramethylrhodamine* (TMRM – 40 nM) e massa mitocondrial mensurada pela marcação com o corante *MitoTracker Green* (50 µM). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Intensidade média de fluorescência (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	TMRM	MitoTracker Green
DMSO	100 ± 0	100 ± 0
H ₂ O ₂ (30 µM)	65,5 ± 5,0**	95,9 ± 2,1
NU1025 (200 µM)	105 ± 6,6##	93,6 ± 2,1
NU1025 + H ₂ O ₂	74,1 ± 6,2*	108 ± 2,1###

*p<0,05; ** p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. ###p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.7 A inibição de PARP afeta o sistema antioxidante em células SH-SY5Y indiferenciadas

O status do sistema antioxidante foi avaliado por meio da expressão da proteína SOD1. Foi observado que o tratamento isolado com H₂O₂ promoveu um aumento significativo na expressão de SOD1 sendo este 25,2 vezes maior ($p < 0,01$) em comparação ao controle negativo, 3,3 vezes maior ($p < 0,01$) na comparação com o tratamento isolado com NU1025 e 3 vezes maior ($p < 0,01$) em comparação ao tratamento combinado. Os tratamentos com NU1025, isolado ou em combinação com H₂O₂, não promoveram aumento na expressão de SOD1, em comparação ao controle (figura 9, Tabela 7).

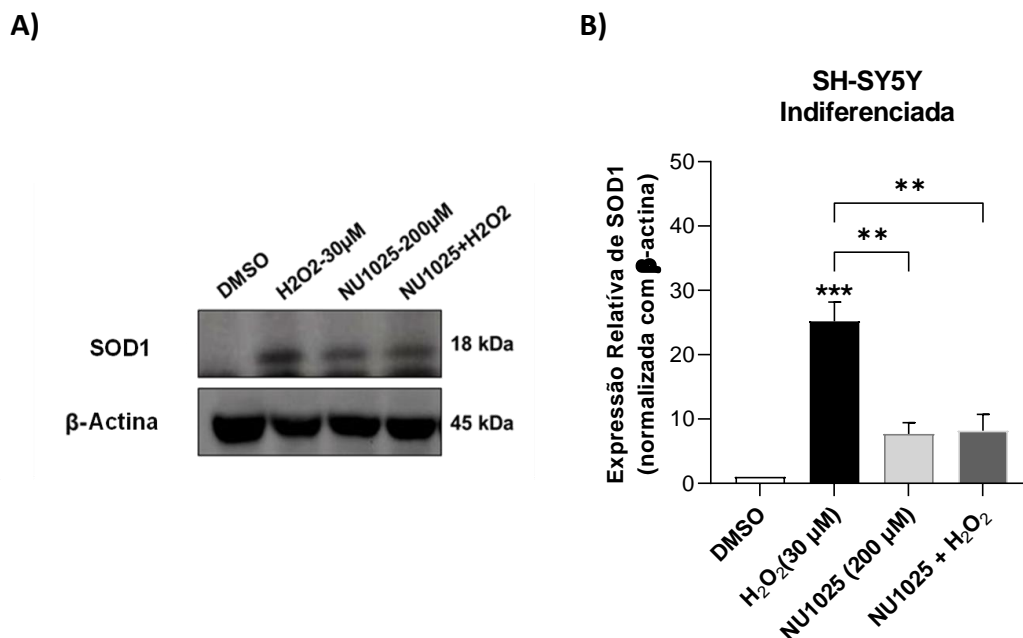


Figura 9. Análise expressão da proteína SOD1 após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. (A) Expressão de proteínas SOD1 (~18 kDa) e β -actina (~45 kDa) analisadas por *Western blotting*. (B) Os níveis de expressão de SOD1 após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo e as barras indicam as comparações entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 7. Níveis de expressão da proteína SOD1 após tratamento das células SH-SY5Y indiferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os níveis de expressão de SOD1 após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β -actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0* (Lite Software). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Tratamentos	Expressão relativa de SOD1 \pm Erro Padrão da Média (EPM)
DMSO	1 \pm 0
H ₂ O ₂ (30 μ M)	25,2 \pm 3 ^{***}
NU1025 (200 μ M)	7,7 \pm 1,7 ^{##}
NU1025 + H ₂ O ₂	8,2 \pm 2,5 ^{##}

^{***}p < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo.
^{##}p < 0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂.
 Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.8 Neurodiferenciação das células SH-SY5Y com AR

4.8.1 Neurodiferenciação e expressão de marcadores neuronais nas células SH-SY5Y

Foram realizados experimentos para avaliar os efeitos da inibição de PARP1 em resposta aos danos oxidativos em neurônios maduros diferenciados a partir das células SH-SY5Y, usando o tratamento com AR (10 μ M). Para comprovar a neurodiferenciação após o tratamento com AR, as células foram marcadas com anticorpos específicos de neurônios maduros (β -III-tubulina, MAP2 e NeuN). Foi observado que após o período de neurodiferenciação as células foram capazes de expressar esses marcadores (**figura 10**), comprovando assim a neurodiferenciação pela presença de marcadores neuroespecíficos.

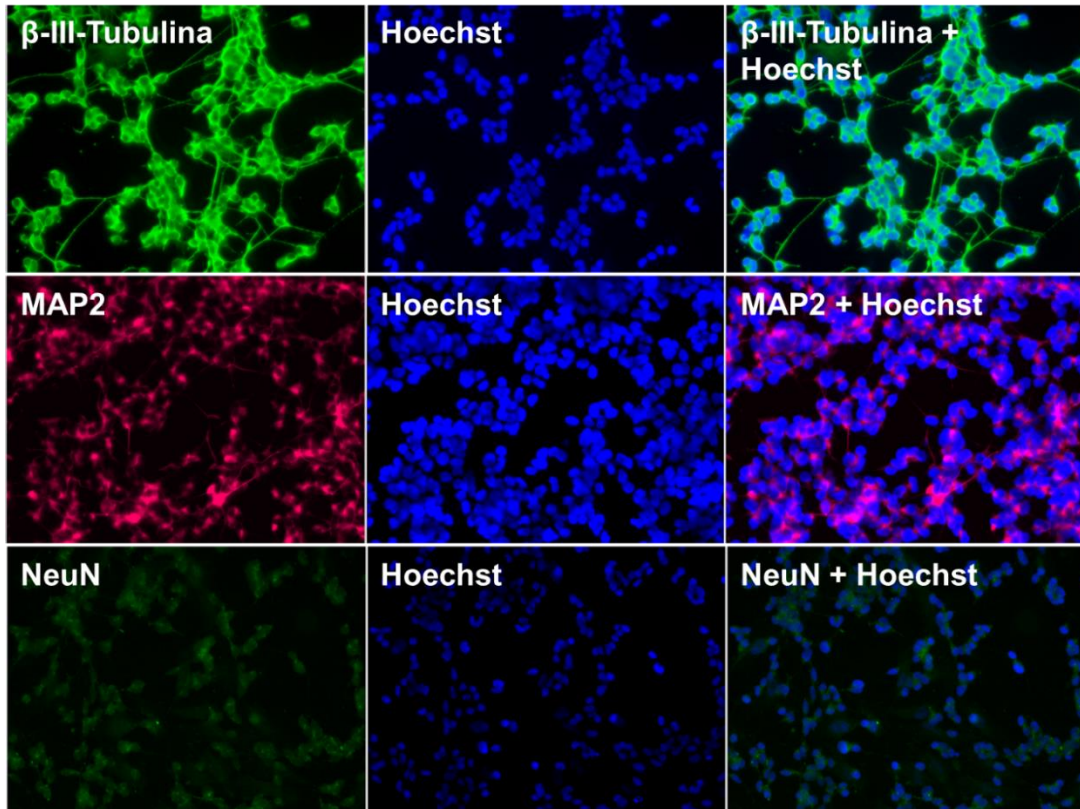


Figura 10. Imunofluorescência das células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios, mostrando à expressão dos marcadores neuronais com os anticorpos anti- β -III-tubulina (1:500), anti-MAP2 (1:500), anti-NeuN (1:500) e coloração Hoechst 33342 nuclear (0,15 μ g/mL). Alterações morfológicas observadas em aumento de 20x usando um microscópio de fluorescência (Zeiss).

4.8.2 Alterações morfológicas nas células SH-SY5Y após diferenciação com AR

Na continuidade dos experimentos anteriores, foram também avaliadas as alterações morfológicas das células após a diferenciação, sendo observadas algumas diferenças morfológicas características de células neuronais adultas, como redução do citoplasma, aumento de neuritos e redução na proliferação das células, além da formação de possíveis pontos de interconexão entre os neurônios (**figura 11**).

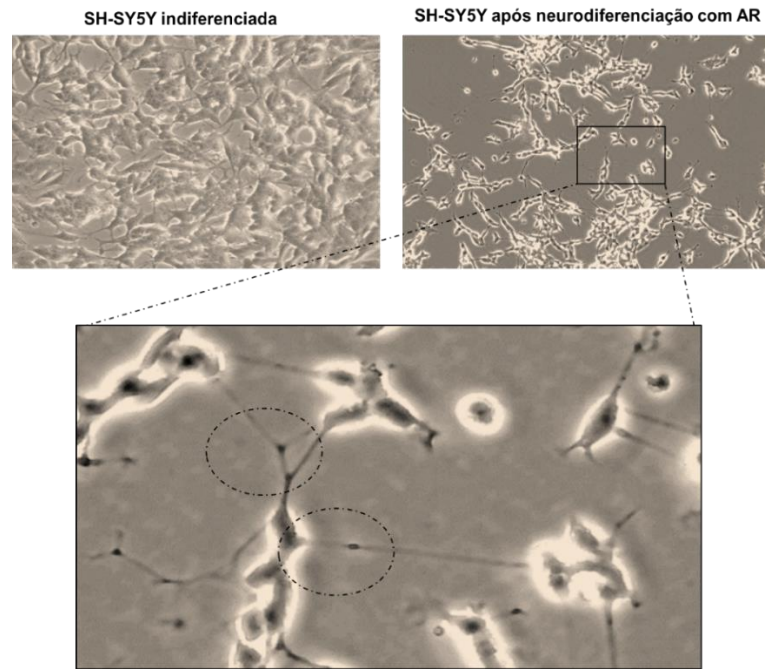


Figura 11. Células da linhagem celular SH-SY5Y após 8 dias de tratamento com AR. As alterações morfológicas e a neurodiferenciação são observadas sob ampliação de 20x utilizando microscópio invertido (Carl Zeiss). Foram observadas redes de interconexões (círculos pontilhados) entre neurônios maduros diferenciados. Dimetilsulfóxido, 0,2% (DMSO, controle negativo); ácido retinoico, 10 μ M (AR, controle positivo).

4.8.3 Aumento na expressão proteica de β -III-tubulina nas células SH-SY5Y após diferenciação com AR

Por fim, para comprovar a neurodiferenciação das células SH-SY5Y, foi realizada a análise da expressão proteica de β -III-tubulina, na qual se observou um aumento significativo (2 vezes) na expressão dessa proteína, após o tratamento com AR (**figura 12; Tabela 8**), confirmando a obtenção de neurônios a partir dessa linhagem.

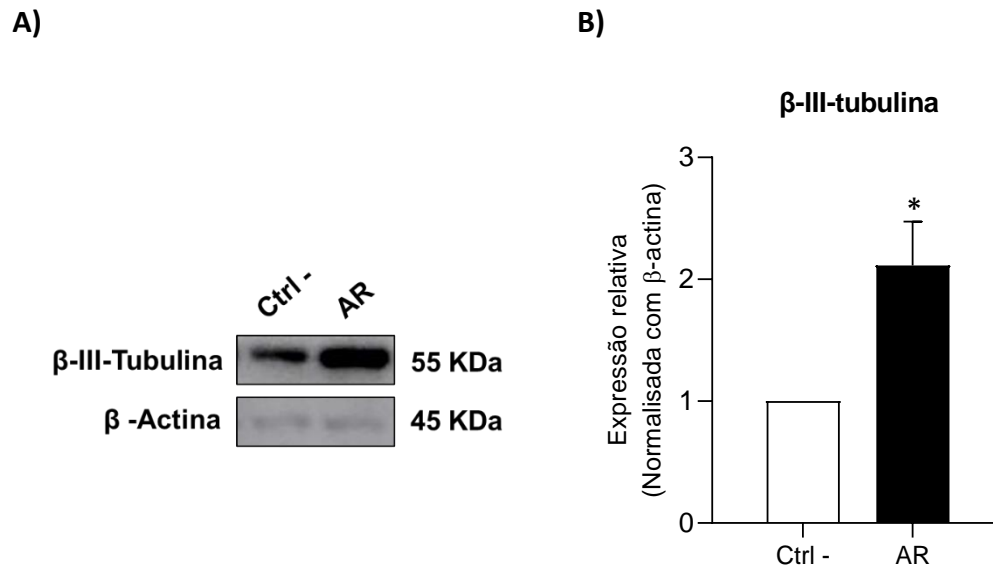


Figura 12. Análise da expressão da proteína β-III-tubulina após tratamento das células SH-SY5Y com AR por 8 dias (**A**) Expressão de proteínas β-III-tubulina (~55 kDa) e β-actina (~45 kDa) analisadas por Western blotting. (**B**) Os níveis de expressão de β-III-tubulina após o tratamento foram calculados pela normalização em relação à expressão da proteína β-actina endógena, utilizando o *software Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo.

Tabela 8. Níveis de expressão da proteína β-III-tubulina após tratamento das células SH-SY5Y com ácido retinóico (AR) por 8 dias.

Tratamentos	Expressão relativa de β-III-tubulina ± Erro Padrão da Média (EPM)
Controle negativo	1 ± 0
AR	2,1 ± 0,4*

* $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. DMEM/F10 (controle negativo).

4.9 A inibição de PARP também potencializa os efeitos do H₂O₂ em neurônios

Após a inibição de PARP1e indução de danos oxidativos, a viabilidade celular foi avaliada nos neurônios diferenciados a partir das células SH-SY5Y. Foi observado que ambos os tratamentos isolados promoveram uma redução na viabilidade celular, quando comparados ao controle, sendo esta de 14,3 % ($p < 0,01$) no tratamento somente com H₂O₂ e de 12,7% ($p < 0,01$) no tratamento somente com o inibidor NU1025. No entanto, quando combinados, (NU1025 + H₂O₂) provocaram uma redução ainda mais drástica na viabilidade celular, sendo esta cerca de 42% ($p < 0,001$), quando comparado

ao controle negativo; 27,7 % ($p < 0,001$) na comparação com o tratamento isolado com o H_2O_2 ; e 29,3% ($p < 0,001$), quando comparado ao tratamento isolado com o inibidor. Esses resultados demonstram que, mesmo em neurônios, a inibição de PARP1 acentua os efeitos do estresse oxidativo, aumentando a morte das células (**figura 13; Tabela 9**).

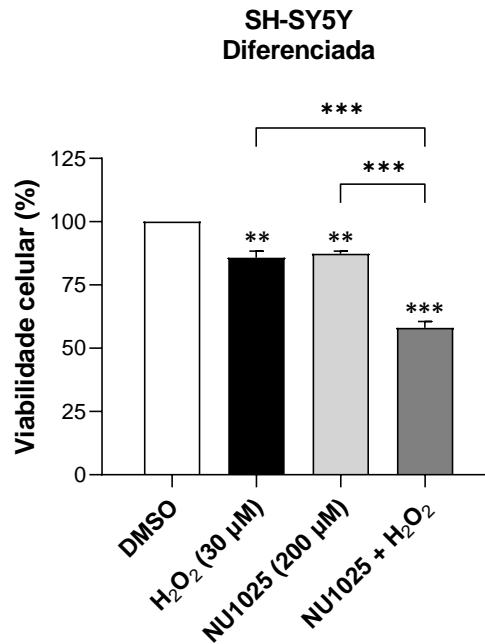


Figura 13. Viabilidade celular das células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. E posteriormente com H_2O_2 por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo e as barras em comparação entre os grupos. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 9. Porcentagens de viabilidade celular obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com NU1025 por 20 min. E posteriormente com H_2O_2 por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tratamentos	Danos no DNA (%) \pm Erro Padrão da Média (EPM)
DMSO	100 \pm 0
H_2O_2 (30 μ M)	85,7 \pm 2,6**
NU1025 (200 μ M)	87,4 \pm 1,1**
NU1025 + H_2O_2	58,1 \pm 2,6***####

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. #### $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H_2O_2 . Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.10 A combinação da inibição de PARP1 e H₂O₂ induz um aumento em Sub-G1 nos neurônios

Após a neurodiferenciação e tratamentos com o inibidor de PARP1 e H₂O₂, foi realizada a análise da cinética do ciclo celular. Não foram observadas alterações significativas nas proporções de células nas fases do ciclo celular, no entanto, quando o H₂O₂ foi combinado à inibição de PARP1, foi observado um aumento na proporção sub-G1 de 30,2% ($p < 0,01$), quando comparado ao controle negativo. Assim, o tratamento com H₂O₂ não alterou a cinética do ciclo celular, mas aumentou a proporção de sub-G1 nas células indiferenciadas, evidenciando os efeitos deletérios da combinação da inibição de PARP1 e danos oxidativos, uma vez que sub-G1 retrata a fragmentação do material genético associada a processos de morte celular (**figura 14; Tabela 10**).

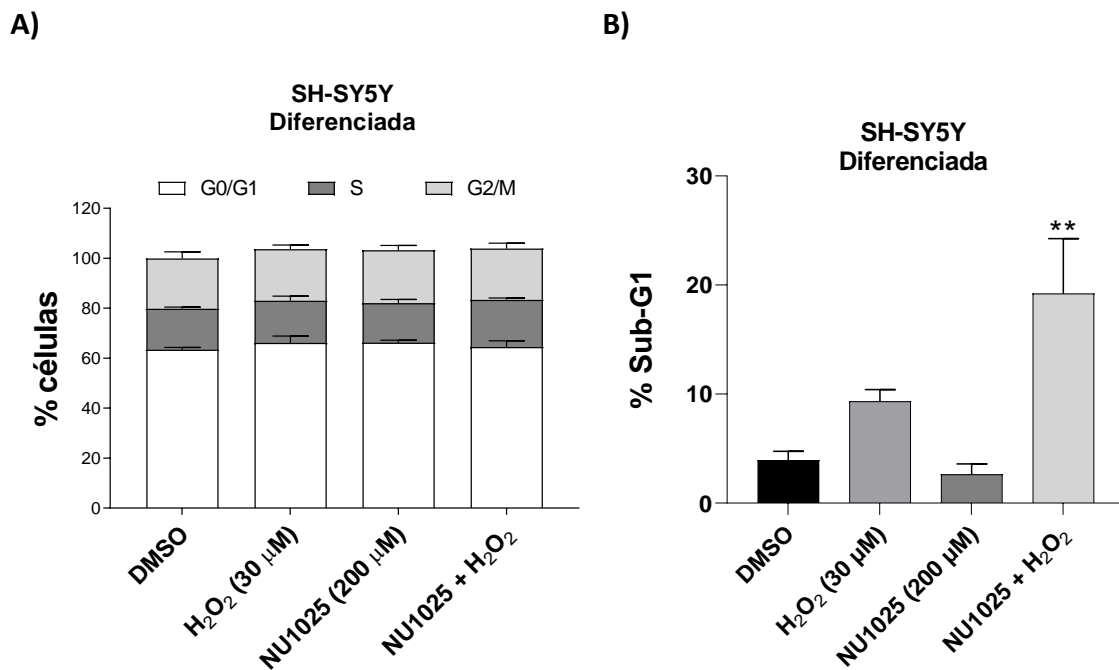


Figura 14. Distribuição das células SH-SY5Y diferenciadas nas diferentes fases do ciclo celular (A) e Sub-G1 (B) após inibição de PARP. As células foram tratadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média \pm EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle negativo. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo); H₂O₂ (30 μ M); NU1025 (200 μ M).

Tabela 10. Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo obtidas após o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. Os resultados expressam diferentes perfis de incorporação de iodeto de propídeo (IP), obtidos pelo sistema *Guava EasyCyte Mini System*. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *Two-Way* ANOVA (ciclo celular) e *One-Way* ANOVA (Sub-G1), para ambas as análises foi utilizado o pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)			
	Fases do ciclo celular			
	Sub G1	G0/G1	S	G2/M
DMSO	3,9 ± 0,8	63,4 ± 0,5	16,4 ± 0,3	20,1 ± 1,5
H ₂ O ₂ (30 µM)	9,3 ± 1,1	66,1 ± 1,6	16,9 ± 1,1	20,7 ± 0,9
NU1025 (200 µM)	2,6 ± 1	66,2 ± 0,6	15,8 ± 0,8	21,2 ± 1,1
NU1025 + H ₂ O ₂	19,2 ± 5,1**	64,5 ± 1,4	18,9 ± 0,4	20,6 ± 1,2

** p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo.
 #p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.11 A combinação da inibição de PARP e H₂O₂ não induz morte celular nos neurônios

A indução de morte celular por apoptose e necrose foi também avaliada nos neurônios após a inibição de PARP1 e indução de danos oxidativos. No entanto, nessas células não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos (figura 15; Tabela 11).

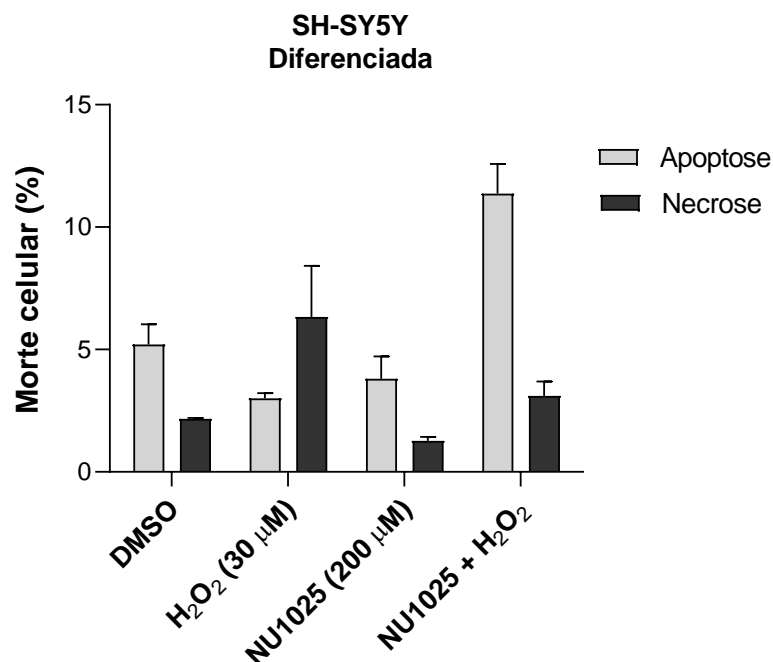


Figura 15. Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas (em neurônios) com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*), por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

Tabela 11. Porcentagens de células apoptóticas e necróticas após tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com NU1025 por 20 min, e com H₂O₂ por 4 h, sendo analisadas após 24 h. Os resultados foram obtidos através do uso do reagente *Guava Nexin* (*Guava Technologies*), por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mini System*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*.

Tratamentos	Morte celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	Apoptose	Necrose
DMSO	5,2 ± 0,8	2,2 ± 0,04
H ₂ O ₂ (30 µM)	3 ± 0,2	6,3 ± 2,1
NU1025 (200 µM)	3,8 ± 0,9	1,3 ± 0,2
NU1025 + H ₂ O ₂	11,4 ± 1,2	3,1 ± 0,6

*p<0,05; ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. #p<0,05; ##p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

4.12 Efeitos da inibição de PARP em resposta ao estresse oxidativo nas células NPC5461 e PC12

Para confirmar se os efeitos observados na linhagem SH-SY5Y seriam reproduzidos em células não transformadas e em outra linhagem neuronal de mamíferos, os mesmos tratamentos foram aplicados nas células progenitoras neurais (NPC5461) provenientes de indivíduos saudáveis e na linhagem PC12.

Nas células NPC5461, foi observado que após a indução de danos pelo H_2O_2 , o tratamento com o inibidor de PARP1 promoveu uma redução na viabilidade celular de 44,7% ($p < 0,001$), quando comparado ao controle negativo; 27,7% ($p < 0,01$), quando comparado ao tratamento isolado com H_2O_2 ; e 36,8% ($p < 0,001$), na comparação com o tratamento isolado com o inibidor. Os tratamentos isolados não promoveram alterações significativas na viabilidade celular (**figura 16A; Tabela 12**). Esses resultados mostram que as células primárias também são sensibilizadas pela inibição da PARP1 previamente à indução de danos promovidos pelo tratamento com H_2O_2 .

A linhagem PC12 mostrou-se mais sensível ao tratamento somente com H_2O_2 , sendo observada uma redução da viabilidade celular de 46% ($p < 0,01$) quando comparado ao controle negativo; e 63% ($p < 0,01$) na comparação com o tratamento somente com o inibidor. Entretanto, a combinação do inibidor NU1025 e H_2O_2 acentuou ainda mais a diminuição na viabilidade das células, sendo essa redução de 71,4% ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo e 88,3% na comparação com o tratamento isolado com NU1025. Portanto, células de mamíferos com características neuronais são sensibilizadas ao dano promovido pelo H_2O_2 sob condições de pré-tratamento com o inibidor de PARP1 (**figura 16B; Tabela 12**).

Esses resultados demonstram que, tanto nas células primárias (não transformadas), quanto nas células de mamíferos com características neuronais, os efeitos promovidos pelo H_2O_2 são potencializados pela inibição de PARP1.

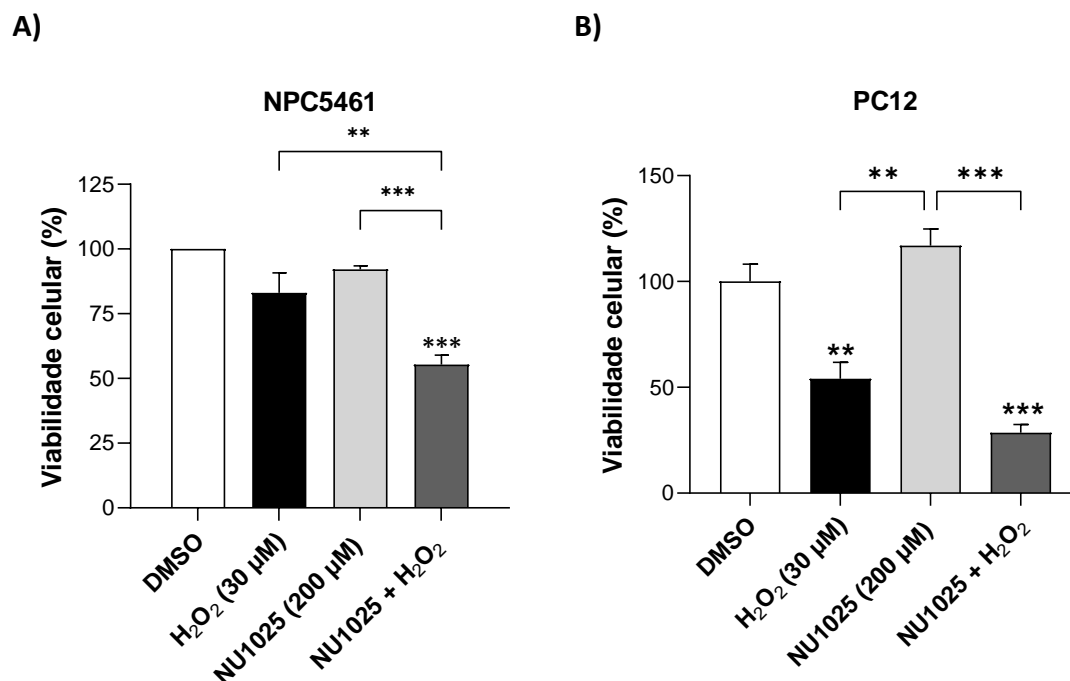


Figura 16. Viabilidade celular das células NPC5461 (A) e PC12 (B) tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± EPM. Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando os resultados foram comparados ao controle negativo e as barras em comparação entre os grupos. DMSO 0,2% (controle negativo).

Tabela 12. Porcentagens de viabilidade celular das células NPC5461 e PC12 tratadas com NU1025 por 20 min. e posteriormente com H₂O₂ por 4 horas, sendo analisadas após 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio do XTT. Os resultados são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise estatística *One-Way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tratamentos	Viabilidade celular (%) ± Erro Padrão da Média (EPM)	
	NPC5461	PC12
DMSO	100 ± 0	100 ± 14,1
H ₂ O ₂ (30 µM)	83,1 ± 7,7	54,0 ± 13,5**
NU1025 (200 µM)	92,2 ± 1,4	116,9 ± 13,8##
NU1025 + H ₂ O ₂	55,3 ± 3,7***##	28,6 ± 6,7***

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. ## $p < 0,01$ indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao H₂O₂. Dimetilsulfóxido, 0,2 % (DMSO, controle negativo).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm relacionado a atividade da enzima PARP1 com a ocorrência de diversas doenças neurodegenerativas. Nestas, a depleção de NAD⁺ ocasionada pela hiperativação de PARP1 (quando ocorrem danos excessivos ao DNA, como durante insultos de estresse oxidativo) tem sido considerada uma das causas da morte dos neurônios. Nesse cenário, muitos autores têm testado a hipótese de que a inibição farmacológica ou a deleção do gene PARP1 poderia retardar a neurodegeneração, prevenindo os danos induzidos pelo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação, sendo estudada como uma possível estratégia para o tratamento dessas doenças (Thapa et al., 2021). No entanto, no presente estudo, no qual foram utilizados três diferentes modelos neurais, um dos quais também foi utilizado após diferenciação em neurônios, a inibição de PARP1 *in vitro* agravou os danos oxidativos em todos esses modelos.

Nos experimentos em que se utilizou um inibidor de PARP1 (NU1025) foi observado, por meio da redução da viabilidade celular, um aumento na sensibilização das células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas, bem como das células NPC5461 e PC12, em face aos danos induzidos pelo H₂O₂, contrastando com as informações presentes na literatura. Em modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia cerebral, por exemplo, Kaundal e colaboradores (2006) observaram que a citotoxicidade provocada pela hiperativação de PARP1 induzida pelo H₂O₂ foi revertida quando as células foram pré-tratadas com NU1025. Uma possível explicação para essa discrepância pode ser encontrada nos resultados relatados por Nosseri e colaboradores (1994), os quais analisaram os efeitos da inibição de PARP nos *pools* de NAD⁺ em células da linhagem U937 (leucemia mieloide humana), tratadas com H₂O₂, e observaram que a inibição de PARP pelo composto 3-aminobenzamida (3-ABA), um inibidor específico de PARP, foi capaz de aliviar a queda severa nas concentrações intracelulares de NAD⁺ geradas após os tratamentos com H₂O₂. Por outro lado, a remoção de 3-ABA durante o período de recuperação precoce das células, que ocorre até cerca de 5 h após a indução do estresse, provocou uma queda tardia nos níveis de NAD⁺, a qual pôde ser evitada quando o composto 3-ABA foi mantido nas células durante todo o período de recuperação (Nosseri et al., 1994).

No presente trabalho, o inibidor de PARP1 (NU1025) foi mantido por apenas 4 h nas células e os ensaios foram realizados após 24 h de recuperação. Nesse contexto, provavelmente o inibidor NU1025 preveniu a queda nos *pools* de NAD⁺ durante o período de 4 h em que foi mantido nas células, impedindo a crise energética que levaria à morte das células nesse período; no entanto, no período de recuperação, na ausência do inibidor, pode ter havido uma ativação tardia de PARP que promoveu um retardo na queda dos níveis NAD⁺ que, por sua vez, levaram à redução na viabilidade das células. No trabalho realizado por Kaundal e colaboradores, a viabilidade celular foi verificada após 6h de recuperação, o que pode ter sido insuficiente para que esse efeito tardio fosse observado.

Nos estudos realizados nas células SH-SY5Y indiferenciadas, o tratamento isolado com o H₂O₂ promoveu uma redução significativa na proporção G0/G1. Já é bem relatado que, em baixas concentrações o H₂O₂ pode ser um indutor de proliferação celular, o que poderia explicar a diminuição na proporção G0/G1 observada (Burdon et al., 2009; Polytarchou et al., 2005). Por outro lado, o mesmo resultado não foi observado nos neurônios. No entanto, os neurônios terminalmente diferenciados perdem a sua capacidade proliferativa e, portanto, a redução da proporção em G0/G1 não seria observada, a menos que as células fossem submetidas a danos mais drásticos. Segundo Frade e Ovejero-Benito (2015), quando submetidos a insultos agudos, incluindo danos ao DNA e estresse oxidativo, os neurônios podem passar por uma tentativa de reativação do ciclo celular; no entanto, nessas condições, geralmente podem sofrer morte ao passarem pelo *checkpoint* G1/S, antes que qualquer sinal de síntese de DNA possa ser observado. De maneira muito interessante, nossos resultados mostraram que a potencialização dos efeitos do H₂O₂ pela inibição de PARP-1 levou a um aumento da proporção Sub-G1, tanto nas células SH-SY5Y indiferenciadas, quanto nos neurônios. A fase sub-G1 do ciclo celular retrata a fragmentação do DNA, que tem sido associada a processos apoptóticos e necróticos de morte celular (Kajstura et al., 2007). Assim, os resultados obtidos sugerem que, na concentração utilizada, o H₂O₂ 30 μM pode ter induzida as células SH-SY5Y indiferenciadas a uma reentrada no ciclo celular, a qual não foi possível nos neurônios, porém, a inibição de PARP1 provocou um agravamento dos efeitos do H₂O₂, o que provocou o aumento na fração Sub-G1, tanto nas células

indiferenciadas quanto nos neurônios. O aumento em sub-G1 observado nos neurônios e nas células indiferenciadas, portanto, indica uma proporção de células que sofreram morte celular.

Nesse contexto, foi avaliada a indução de danos no DNA na linhagem SH-SY5Y indiferenciada, utilizando o ensaio cometa com a enzima *hOGG1*, a qual detecta primordialmente danos oxidativos gerados por lesões de 8-oxo-dG, às quais são clivadas pela enzima deixando um sítio abásico que promove quebras no DNA, sendo estas visualizadas por meio de fragmentos no ensaio Cometa (VALAVANIDIS et al., 2009). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que apenas o tratamento combinado (inibidor de PARP1 e H_2O_2), levou a um aumento na geração de quebras no DNA. Lesões oxidativas geram SSB no DNA que são reparadas pela via de reparo por excisão de bases (BER/SSB), reparo por recombinação homóloga (HR) e reparo alternativo por junção não homóloga (Alt-NHEJ) (Andrabi et al., 2006; Chiruvella et al., 2013; Dean et al., 2012; Love et al., 1999; Wei; Yu, 2016). Dessa forma, a intervenção em uma proteína importante para a sinalização do reparo poderia levar ao acúmulo de danos no DNA, os quais, não fosse a inibição de PARP1, poderiam ter sido corrigidos. Assim, os resultados obtidos indicam que no tratamento isolado com o H_2O_2 , a atividade de PARP1 permitiu o reparo dos danos, amenizando os efeitos do H_2O_2 no DNA. Por outro lado, no tratamento combinado, o H_2O_2 gerou lesões oxidativas no DNA, as quais não puderam ser reparadas devido à inibição da PARP1 pelo inibidor NU1025, gerando acúmulo de danos no DNA, o que provavelmente refletiu na redução da viabilidade celular, observada nos experimentos realizados.

Em seguida, foram conduzidos ensaios para a detecção de morte celular. Um resultado interessante obtido no presente estudo foi que, embora nas células SH-SY5Y indiferenciadas o tratamento com o H_2O_2 tenha promovido morte celular necrótica, a qual foi intensificada após a inibição de PARP, nos neurônios, os tratamentos não induziram morte celular. Já é bem descrito que o H_2O_2 em excesso induz um aumento da oxidação que leva à morte das células, sendo relatado que a apoptose é frequentemente o resultado final do dano oxidativo (Ismail et al., 2014). No entanto, foi demonstrado que, embora concentrações moderadas de H_2O_2 desencadeiem a apoptose, concentrações elevadas promovem a morte celular por necrose, sendo que

as concentrações necessárias para induzir um ou outro tipo de morte celular são também dependentes da linhagem celular utilizada (Gardner et al., 1997; Troyano et al., 2003). Células não proliferativas, como neurônios, são frequentemente consideradas mais resistentes a estímulos citotóxicos do que as células proliferativas, uma vez que essas células devem ser capazes de sobreviver a diversos tipos de insultos para fornecer circuitos neuronais por toda a vida de um organismo (Kole et al., 2013; Kudo et al., 2014). Para combater ROS e erradicar macromoléculas danificadas, os neurônios utilizam defesas antioxidantes altamente eficazes e mecanismos eficientes de reparo (Garbarino et al., 2015). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as diferenças observadas nas células SH-SY5Y e nos neurônios podem ser decorrentes da resistência natural típica dos neurônios, que são células terminalmente diferenciadas, em contraste às células SH-SY5Y indiferenciadas, que foram mais suscetíveis aos tratamentos empregados.

No tratamento combinado de H_2O_2 e NU1025, foi observado um aumento significativo nos níveis intracelulares do radical $O_2^{\bullet-}$ na linhagem SH-SY5Y indiferenciada. O radical $O_2^{\bullet-}$ bem como o H_2O_2 , têm sido indicados como potentes mediadores do estresse oxidativo neuronal, provocando uma complexa cascata de eventos que podem eventualmente resultar em morte das células, dependendo da gravidade dos danos (Martindale; Holbrook, 2002; Melo et al., 2011). Foi relatado que a inibição de PARP1 pode elevar os níveis de $O_2^{\bullet-}$ ou H_2O_2 por meio da indução das NADPH oxidases 1 e 4 (NOX1 e NOX4) (Hou et al., 2018). Em níveis elevados, o H_2O_2 , na presença dos íons de ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+) endógenos, pode ser diretamente reduzido ao radical $^{\bullet}OH$ (reação de *Fenton*), ou reagir com o radical $O_2^{\bullet-}$, formando $^{\bullet}OH$ (reação de *Haber-Weiss*). O $^{\bullet}OH$ é o radical mais reativo encontrado *in vivo*, sendo capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e também o DNA (Barbosa et al., 2010). Assim, pode-se ponderar que a elevação específica de radicais $O_2^{\bullet-}$ intracelular, que pode ter implicado na redução da viabilidade celular observada, teria sido mediada pelas enzimas NOX1 e NOX4, que seriam reguladas positivamente pela inibição de PARP1. De forma interessante, o tratamento com NU1025 isoladamente reduziu os níveis de $O_2^{\bullet-}$, sugerindo que a inibição de PARP1 (de forma isolada) pode conferir de alguma forma proteção.

Um aumento do radical $O_2^{\bullet-}$ foi também observado nas mitocôndrias das células SH-SY5Y indiferenciadas. Os tratamentos isolados, bem como o tratamento combinado promoveram um aumento significativo desse radical, sendo este mais acentuado no tratamento isolado com o NU1025. Como o tratamento somente com o inibidor de PARP1 não gerou redução significativa da viabilidade celular, supõe-se que o aumento dos radicais $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial não esteja envolvido na redução da viabilidade observada nos tratamentos combinados de NU1025 e H_2O_2 .

Os resultados obtidos mostraram ainda que as células SH-SY5Y indiferenciadas apresentaram uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial em resposta ao tratamento com o H_2O_2 , isolado ou em combinação com NU1025. Sob condições fisiológicas normais, as funções mitocondriais, incluindo a geração de ATP, dependem da diferença de potencial elétrico gerado a partir de um gradiente eletroquímico de prótons, através da membrana interna mitocondrial (Little et al., 2018). Portanto, a redução no potencial de membrana mitocondrial pode ser diretamente relacionada com a capacidade reduzida nas funções mitocondriais (Little et al., 2018). A redução do potencial de membrana mitocondrial é decorrente, principalmente, de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, que podem ser geradas pela interação dos lipídeos da membrana com as ROS (Little et al., 2018). Nesse contexto, os resultados obtidos indicam que o aumento nos níveis do radical $O_2^{\bullet-}$, derivados do tratamento com H_2O_2 , isolado ou em combinação com o NU1025, podem ter promovido as alterações do potencial de membrana mitocondrial observadas em nossos experimentos. No entanto, como o tratamento isolado com o H_2O_2 não reduziu a viabilidade das células, pode-se inferir que essas alterações, sozinhas, não resultaram em consequências drásticas para as células.

Um resultado muito interessante obtido no presente estudo foi referente à expressão proteica da enzima antioxidante SOD1. O tratamento isolado com H_2O_2 promoveu um aumento significativo na expressão de SOD1, porém, quando combinado à inibição de PARP1, não foram observadas diferenças significativas na expressão dessa proteína. As SODs são enzimas universais de organismos que vivem na presença de oxigênio. Através de sua atividade, os níveis de uma variedade de ROS e espécies

reativas de nitrogênio são controlados, limitando assim o potencial de toxicidade dessas moléculas e controlando aspectos amplos da vida celular, os quais são regulados por suas funções de sinalização (Wang et al., 2018). Sob condições fisiológicas normais de oxigênio, PARP1 pode determinar a homeostase redox intracelular por intensificar a transcrição de genes como das enzimas antioxidantes, dentre elas a SOD1. Na ausência de PARP1, a transcrição desses genes é restringida. Assim, os resultados observados indicam que a inibição de PARP1 pode ter afetado a transcrição de SOD1 que seria induzida pelo tratamento com H₂O₂, promovendo, assim, uma redução na resposta antioxidante. No tratamento isolado com H₂O₂, por outro lado, os níveis de expressão da SOD1 foram aumentados, o que pode ter protegido as células contra danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂. Esses resultados se opuseram aos apresentados por Czapski e colaboradores (2018), os quais observaram que a inibição da PARP1 em células PC12 melhorou a transcrição de genes de enzimas antioxidantes *SOD1*, *GPX1*, *GPX4*.

Recentemente, muitos estudos têm relacionado o papel da PARP1 associado a diversas doenças neurodegenerativas (Czapski et al., 2006; D'Avila et al., 2012; Liu et al., 2008; Martire et al., 2015; Pellicciari et al., 2004). Nessas doenças, devido principalmente ao estresse oxidativo, a atividade da PARP é aumentada, levando a um acúmulo de PAR e depleção de NAD⁺. A redução nos níveis de NAD⁺ gera alterações mitocondriais importantes que culminam em crise energética e aumento da produção de ROS, podendo levar à morte celular (Martire et al., 2015). Nesse contexto, seria suposto que a inibição de PARP1 poderia proteger as células por meio da redução da produção de ROS, o que levaria a uma melhora no quadro de estresse oxidativo. De fato, pesquisas envolvendo essa abordagem indicaram que a inibição de PARP1 protegeu as células do cérebro contra danos oxidativos, mostrando-se um alvo potencial para uma estratégia terapêutica (Kaundal et al., 2006; Liu et al., 2016).

No entanto, no presente trabalho, a inibição de PARP1 por NU1025 não protegeu as células contra o estresse oxidativo, mas ao contrário, potencializou os efeitos dos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂, salientando, assim, que PARP1 é uma enzima extremamente importante para os mecanismos de reparo contra danos oxidativos, entre outras funções que ainda necessitam ser elucidadas. Cabe enfatizar que mesmo

nas células SH-SY5Y indiferenciadas e NPC5461, em que o H₂O₂ 30 µM não se mostrou citotóxico quando testado isoladamente (sem o tratamento com o inibidor de PARP1), foi observada uma redução da viabilidade celular no tratamento combinado (NU1025 + H₂O₂), demonstrando o impacto da inibição da PARP1 na sensibilização das células.

Dessa forma, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais, em condições de hiperatividade de PARP1, sua inibição poderia ser neuroprotetora. Assim, nesse cenário, permanece um grande desafio no sentido de explorar como os inibidores de PARP1 poderiam representar uma nova intervenção terapêutica para resgatar o metabolismo energético celular, com a possibilidade de aplicação em estratégias terapêuticas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que a inibição de PARP1 afetou o sistema antioxidante das células, o que promoveu um aumento nos níveis de ROS, os quais foram intensificados pelo tratamento conjunto com o inibidor de PARP1 (NU1025) e o H_2O_2 , resultando em aumento de danos oxidativos no DNA. Muitas das lesões induzidas no DNA pelo H_2O_2 , em consequência da inibição de PARP1, não puderam ser reparadas, resultando na redução significativa da viabilidade celular em todos os modelos celulares utilizados. Além disso, mesmo nas células SH-SY5Y indiferenciadas e NPC5461, em que o H_2O_2 30 μ M não se mostrou citotóxico quando testado isoladamente (sem o tratamento com o inibidor de PARP1), houve redução da viabilidade celular no tratamento combinado (NU1025 + H_2O_2). Assim, esses resultados evidenciam o papel crucial de PARP1 nos mecanismos de reparo do DNA e indução de defesa antioxidante.

Portanto, nas condições testadas, a inibição da PARP1 pelo composto NU1025 sensibilizou as células quanto à indução de danos celulares pelo H_2O_2 , agravando a maior parte das respostas celulares avaliadas no presente trabalho, desta forma restringindo a sua aplicabilidade em estratégias terapêuticas destinadas aos pacientes com doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. BIBLIOGRAFIA

Abeti, R.; Abramov, A. Y.; Duchen, M. R. β -amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. **Brain**, v. 134, n. 6, p. 1658–1672, 2011.

Abramov, A. Y.; Duchen, M. R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 953–964, 2008.

Agholme, L.; Lindström, T.; Kågedal, K.; Marcusson, J.; et al. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1069–1082, 2010.

Alano, C. C.; Garnier, P.; Ying, W.; Higashi, Y.; et al. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 2967–78, 2010.

Amé, J.-C.; Spenlehauer, C.; De Murcia, G. The PARP superfamily. **BioEssays**, v. 26, n. 8, p. 882–893, 2004.

Andrabi, S. A.; Kim, N. S.; Yu, S.-W.; Wang, H.; et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48, p. 18308–13, 2006.

Bahmad, H.; Hadadeh, O.; Chamaa, F.; Cheaito, K.; et al. Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 50, 2017.

Bai, P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. **Molecular Cell**, v. 58, n. 6, p. 947–958, 2015.

Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. de C. G.; De Paula, S. O.; et al. **Oxidative stress: concept, implications and modulating factors** *Rev. Nutr.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13>>. Acesso em: 13 out. 2019.

Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery** 2004 **3:3**, v. 3, n. 3, p. 205–214, 2004.

Burdon, R. H.; Gill, V.; Alliangana, D. Hydrogen Peroxide in Relation to Proliferation and Apoptosis in BHK-21 Hamster Fibroblasts. <http://dx.doi.org/10.3109/10715769609088004>, v. 24, n. 2, p. 81–93, 2009.

Chiruvella, K. K.; Liang, Z.; Wilson, T. E. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 5, 2013.

Cohen, M. S.; Chang, P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. **Nature chemical biology**, v. 14, n. 3, p. 236, 2018.

Curtin, N. J.; Szabo, C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery** 2020 **19:10**, v. 19, n. 10, p. 711–736, 2020.

Czapski, G. A.; Cakala, M.; Gajkowska, B.; Strosznajder, J. B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 8, p. 751–755, 2006.

Czapski, G. A.; Cieřlik, M.; Wencel, P. L.; Wójtowicz, S.; et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters expression of mitochondria-related genes in PC12 cells: relevance to mitochondrial homeostasis in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 2, p. 281–288, 2018.

D'Avila, J. C.; Lam, T. I.; Bingham, D.; Shi, J.; et al. Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, p. 31, 2012.

Darbinian, N. Cultured cell line models of neuronal differentiation: NT2, PC12. **Methods in Molecular Biology**, v. 1078, p. 23–33, 2013.

De Los Rios, C.; Cano-Abad, M. F.; Villarroya, M.; López, M. G. Chromaffin cells as a model to evaluate mechanisms of cell death and neuroprotective compounds. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 470, n. 1, p. 187–198, 2018.

Dean, J. L.; McClendon, A. K.; Knudsen, E. S. Modification of the DNA Damage Response

by Therapeutic CDK4/6 Inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 29075, 2012.

Diefenbach, J.; Bürkle, A. Poly-ADP-ribosylation in health and disease. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 7–8, p. 721–730, 2005.

Dong, X.; Wang, Y.; Qin, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 4, p. 379–387, 2009.

Ebrahimi, M.; Forouzesh, M.; Raoufi, S.; Ramazii, M.; et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into erythroid cells. **Stem Cell Research & Therapy 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

Frade, J. M.; Ovejero-Benito, M. C. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. **Cell Cycle**, v. 14, n. 5, p. 712, 2015.

Garbarino, V. R.; Orr, M. E.; Rodriguez, K. A.; Buffenstein, R. Mechanisms of Oxidative Stress Resistance in The Brain: Lessons Learned From Hypoxia Tolerant Extremophilic Vertebrates. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 576, p. 8, 2015.

Gardner, A. M.; Xu, F. H.; Fady, C.; Jacoby, F. J.; et al. Apoptotic vs. Nonapoptotic Cytotoxicity Induced by Hydrogen Peroxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 1–2, p. 73–83, 1997.

Gibson, B. A.; Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2012 13:7**, v. 13, n. 7, p. 411–424, 2012.

Görlach, A.; Dimova, E. Y.; Petry, A.; Martínez-Ruiz, A.; et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? **Redox biology**, v. 6, p. 372–385, 2015.

Grau, C. M.; Greene, L. A. Use of PC12 Cells and Rat Superior Cervical Ganglion Sympathetic Neurons as Models for Neuroprotective Assays Relevant to Parkinson's Disease. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 846, p. 201, 2012.

Hocsak, E.; Szabo, V.; Kalman, N.; Antus, C.; et al. PARP inhibition protects mitochondria

and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 770–784, 2017.

Hossini, A. M.; Megges, M.; Prigione, A.; Lichtner, B.; et al. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 2015.

Hou, D.; Liu, Z.; Xu, X.; Liu, Q.; et al. Increased oxidative stress mediates the antitumor effect of PARP inhibition in ovarian cancer. **Redox Biology**, v. 17, p. 99–111, 2018.

Jagtap, P.; Szabo, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery 2005 4:5**, v. 4, n. 5, p. 421–440, 2005.

Kajstura, M.; Halicka, H. D.; Pryjma, J.; Darzynkiewicz, Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A**, v. 71A, n. 3, p. 125–131, 2007.

Kang, S.; Chen, X.; Gong, S.; Yu, P.; et al. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

Kaundal, R. K.; Shah, K. K.; Sharma, S. S. Neuroprotective effects of NU1025, a PARP inhibitor in cerebral ischemia are mediated through reduction in NAD depletion and DNA fragmentation. **Life Sciences**, v. 79, n. 24, p. 2293–2302, 2006.

Kogut, I.; Roop, D. R.; Bilousova, G. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into a Keratinocyte Lineage. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1195, p. 1, 2014.

Kole, A. J.; Annis, R. P.; Deshmukh, M. Mature neurons: equipped for survival. **Cell Death & Disease 2013 4:6**, v. 4, n. 6, p. e689–e689, 2013.

Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 9–21, 2013.

Kudo, S.; Suzuki, Y.; Shin-Ei, N.; Mizui, T.; et al. Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain. **Experimental and Therapeutic**

Medicine, v. 8, n. 3, p. 754, 2014.

Kunzler, A.; Zeidán-Chuliá, F.; Gasparotto, J.; Girardi, C. S.; et al. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress.

Molecular Neurobiology, v. 54, n. 9, p. 6903–6916, 2017.

Langelier, M.-F.; Planck, J. L.; Roy, S.; Pascal, J. M. Structural Basis for DNA Damage-Dependent Poly(ADP-ribosyl)ation by Human PARP-1. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 728–732, 2012.

Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525–542, 2010.

Little, D.; Luft, C.; Mosaku, O.; Lorvellec, M.; et al. A single cell high content assay detects mitochondrial dysfunction in iPSC-derived neurons with mutations in SNCA. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9033, 2018.

Liu, F.; Jiang, N.; Xiao, Z.-Y.; Cheng, J.-P.; et al. Effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition on sulfur mustard-induced cutaneous injuries in vitro and in vivo. **PeerJ**, v. 4, p. e1890, 2016.

Liu, S. K.; Coackley, C.; Krause, M.; Jalali, F.; et al. A novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, ABT-888, radiosensitizes malignant human cell lines under hypoxia. **Radiotherapy and Oncology**, v. 88, n. 2, p. 258–268, 2008.

Liu, Z.; Zhou, T.; Ziegler, A. C.; Dimitrion, P.; et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 2525967, 2017.

Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–26, 2010.

Lopes, F. M.; Da Motta, L. L.; De Bastiani, M. A.; Pfaffenseller, B.; et al. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells.

Neurotoxicity Research, v. 31, n. 4, p. 545–559, 2017.

Love, S.; Barber, R.; Wilcock, G. K. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 122, n. 2, p. 247–253, 1999.

Mao, K.; Zhang, G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 8, p. 2013–2024, 2022.

Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, 2002.

Martire, S.; Mosca, L.; D'Erme, M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 146–148, p. 53–64, 2015.

Melo, A.; Monteiro, L.; Lima, R. M. F.; Oliveira, D. M. De; et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2011, p. 467180, 2011.

Montaldi, A. P.; Godoy, P. R. D. V.; Sakamoto-Hojo, E. T. APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 793, p. 19–29, 2015.

Morales, J.; Li, L.; Fattah, F. J.; Dong, Y.; et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 24, n. 1, p. 15–28, 2014.

Nosseri, C.; Coppola, S.; Ghibelli, L. Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress- induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 212, n. 2, p. 367–373, 1994.

Okano, H.; Yamanaka, S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. **Molecular Brain**, v. 7, n. 1, p. 22, 2014.

Pellicciari, R.; Camaioni, E.; Costantino, G. Life or Death Decisions: The Case of Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) as a Therapeutic Target for Brain Ischaemia. **Progress in**

Medicinal Chemistry, v. 42, p. 125–169, 2004.

Pieper, A. A.; Blackshaw, S.; Clements, E. E.; Brat, D. J.; et al. Poly(ADP-ribosyl)ation basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1845–50, 2000.

Polytarchou, C.; Hatziapostolou, M.; Papadimitriou, E. Hydrogen Peroxide Stimulates Proliferation and Migration of Human Prostate Cancer Cells through Activation of Activator Protein-1 and Up-regulation of the Heparin Affin Regulatory Peptide Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40428–40435, 2005.

Prasad, S.; Gupta, S. C.; Tyagi, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95–105, 2017.

Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610–621, 2017.

Rottenberg, H.; Hoek, J. B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. **Aging Cell**, v. 16, n. 5, p. 943, 2017.

Seki, T.; Fukuda, K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 116, 2015.

Shiple, M. M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 108, p. 53193, 2016.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

Tönnies, E.; Trushina, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease.

Journal of Alzheimer's disease : JAD, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

Troyano, A.; Sancho, P.; Fernández, C.; De Blas, E.; et al. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. **Cell Death & Differentiation** **2003 10:8**, v. 10, n. 8, p. 889–898, 2003.

Turunc Bayrakdar, E.; Uyanikgil, Y.; Kanit, L.; Koylu, E.; et al. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1–42)-induced rat model of Alzheimer's disease. **Free Radical Research**, v. 48, n. 2, p. 146–158, 2014.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 27, n. 2, p. 120–139, 2009.

Vessoni, A. T.; Herai, R. H.; Karpiak, J. V.; Leal, A. M. S.; et al. Cockayne syndrome-derived neurons display reduced synapse density and altered neural network synchrony. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 7, p. 1271, 2016.

Wang, W.-L.; Dai, R.; Yan, H.-W.; Han, C.-N.; et al. Current Situation of PC12 Cell Use in Neuronal Injury Study. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 4, p. 61–66, 2015.

Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **The Journal of cell biology**, v. 217, n. 6, p. 1915–1928, 2018.

Wang, Y.; Luo, W.; Wang, Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. **DNA repair**, v. 81, p. 102651, 2019.

Wei, H.; Yu, X. Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 3, p. 131, 2016.

Westerink, R. H. S.; Ewing, A. G. The PC12 cell as model for neurosecretion. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 192, n. 2, p. 273, 2008.

Wiatrak, B.; Kubis-Kubiak, A.; Piwowar, A.; Barg, E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, v. 9, n. 4, 2020.

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, n. 1, p. 10, 2017.

Zeng, Z.; Xu, J.; Zheng, W. Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. **Redox Biology**, v. 12, p. 625, 2017.

Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 4350965, 2016.