

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB

Laboratório Integrado de Biociências Translacionais - LIBT

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO NEUROPROTETOR DO
GLICOSAMINOGLICANO DERMATAM SULFATO DE ASCÍDIAS EM MODELO *in*
vitro

Aluna: Msc. Grazielle Fonseca de Sousa

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cintia Monteiro de Barros - NUPEM/UFRJ-Macaé

Coorientador: Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães – CBB/UENF

Campos dos Goytacazes/RJ

Setembro/2019

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO NEUROPROTETOR DO
GLICOSAMINOGLICANO DERMATAM SULFATO DE ASCÍDIAS EM MODELO *in*
vitro

Graziele Fonseca de Sousa

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cintia Monteiro de Barros

Coorientador: Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães

Campos dos Goytacazes/RJ

Setembro/2019

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO NEUROPROTETOR DO
GLICOSAMINOGLICANO DERMATAM SULFATO DE ASCÍDIAS EM MODELO *in*
vitro

Graziele Fonseca de Sousa

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 26 de setembro de 2019.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão - IBqM Hospital Universitário Clementino
Fraga Filho/UFRJ

Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça – UFRJ/Campus Macaé

Prof. Dr. Renato Augusto da Matta / LBCT-UENF

Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães / LBCT-UENF
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Monteiro de Barros - NUPEM/UFRJ-Macaé

ORIENTADORA

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S725 Sousa, Grazielle Fonseca de.

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO NEUROPROTETOR DO GLICOSAMINOGLICANO DERMATAM SULFATO DE ASCÍDIAS EM MODELO in vitro / Grazielle Fonseca de Sousa. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

206 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientadora: Cintia Monteiro de Barros.
Coorientador: Arthur Giraldi Guimaraes.

1. Dermatam sulfato. 2. ascídias. 3. NEURO-2A. 4. neuroregeneração. 5. antioxidante. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo cuidado e por ter me guiado nesta fase tão importante da minha vida;
- Aos meus pais, por todo apoio e incentivo diante às dificuldades, mesmo distantes;
- Ao meu irmão Samuel e minha irmã Vanessa pela compreensão e incentivo;
- A professora Cintia Monteiro de Barros pelo auxílio relevante na minha formação acadêmica, confiança, amizade e exemplo de profissional e pesquisadora, obrigada de coração;
- Ao professor Arthur Giraldi Guimarães por ter me recebido em seu laboratório e pela colaboração na realização deste trabalho;
- Ao professor Milton Masahiko Kanashiro por abrir as portas da realização de um sonho;
- A professora Celia Yelimar Palmero Quintana por toda amizade, auxílio e incentivo;
- A Professora Layla Janaína Hissa Borges, agradeço a disponibilidade, bem como o tempo dispendido que teve com a revisão desta dissertação, sou grata por sua amizade;
- A república Diazepam, minha pequena família campista que fez os meus dias mais alegres;
- Aos colegas do laboratório LBR, Dona Marina, Jacques, Laura, Paula, Rebeqa, Núbria, Luana, Elaine e Kissila obrigada pelo companheirismo, amizade e momentos de boas risadas;
- Aos colegas do NUPEM Larissa, Jaqueline, Thuany, Nathany, Rebeca, Letícia, Joel, Kênia, Taynan, Emily, Cremilda, Jéssica, Paula, Dani, Andressa, Danilo,

Gesily, Amanda, William, Leonardo, Aline, Adriana e Kellen obrigada pela ajuda indispensável e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho;

- Aos meus queridos alunos do CEDERJ por me mostrar com tanto carinho a razão de fazer o que eu faço;
- Aos meus “filhos” Gabriela, Gabriel, Ana Beatriz, Taiane e Jonatha por me ajudarem sempre no que foi preciso e por me ensinarem que lecionar vai muito além de dar aulas;
- À banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar da defesa deste trabalho;
- A UENF, UFRJ-Macaé, CAPES e CNPq pela estrutura e concessão de bolsa;
- Ao Marcos por todo amor, companheirismo e compreensão;
- As minhas meninas Pudim e Fifi;
- Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, bem como, para minha formação acadêmica.

“Não há impasse quando se está imbuído de desafio. Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho”

Daisaku Ikeda

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. DOENÇA DE PARKINSON	3
2.1.1. Perspectiva Histórica	3
2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.3. PATOGÊNESE DA DOENÇA DE PARKINSON	5
2.4. MODELOS QUÍMICOS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON	8
2.4.1. Modelo de Doença de Parkinson por rotenona	9
2.4.1.1. Complexo I mitocondrial e rotenona.....	12
2.4.2. Modelos celulares para estudar a Doença de Parkinson	13
2.4.2.1. Linhagem de células de neuroblastoma de camundongo (NEURO-2A)...	15
2.5. TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON	16
2.6. ENVOLVIMENTO DOS GLICOSAMINOGLICANOS NA DOENÇA DE PARKINSON	17
2.7. GLICOSAMINOGLICANOS.....	18
2.7.1. Dermatan sulfato	21
2.7.2. Distribuição do DS no sistema nervoso.....	25
2.7.3. Envolvimento do dermatan sulfato na neuritogênese	27
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. OBJETIVO GERAL	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. METODOLOGIA	34
5.1. COLETA DAS ASCÍDIAS.....	34
5.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DERMATAN SULFATO	34
5.3. DOSAGEM DE ÁCIDO HEXURÔNICO (MÉTODO DE CARBAZOL)	35
5.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	36
5.5. LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	37

5.6.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
5.7.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	38
5.8.	AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	39
5.9.	QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO DE NEURITOS.....	40
5.10.	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR.....	40
5.11.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
5.12.	HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
5.13.	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	42
5.14.	DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	43
5.15.	ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	43
5.15.1.	Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	43
5.15.2.	Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) 44	
5.15.3.	Determinação da atividade da catalase.....	44
5.16.	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	45
5.17.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6.	RESULTADOS.....	47
6.1.	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DS DE <i>P. nigra</i>	47
6.1.1.	Extração e purificação dos GAGs totais.....	47
6.1.2.	Análise Eletroforética.....	49
6.2.	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT.....	51
6.3.	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	54
6.4.	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	64
6.4.1.	Análise do sistema antioxidante.....	65
6.5.	AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR POR LPO.....	67
7.	DISCUSSÃO.....	69
8.	CONCLUSÃO.....	77
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10.	ANEXOS.....	116
10.1.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	116
10.2.	ARTIGO DE REVISÃO.....	150

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Produção de ERO em células pela redução do oxigênio molecular em água, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que consiste em quatro complexos multiméricos (I, II, III e IV) e dois portadores de elétrons (Coenzima Q e Citocromo C). SOD (superóxido dismutase), GPx (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato). Modificado de Feitosa et al., (2018)..... 7
- Figura 2 - A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Os neurônios dopaminérgicos da substância negra (setas), projetam (linhas vermelhas sólidas) para o estriado (núcleos caudado e putamen). B) Representação esquemática da mesma via afetada pela DP: degeneração (setas) e acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que projetam para o putamen (linha tracejada), com perda mais modesta dos que projetam para o caudado (linha vermelha fina). C) Imunocitoquímica dos corpos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da substância negra confirma que os mesmos apresentam agregados de α -sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). Modificado de Dauer e Przedborski, (2003). 10
- Figura 3 - Modelos in vitro da DP, mostrados em ordem de menor para a maior dificuldade na produção e manutenção. A) Linhagem celular são derivados de biópsias obtidas a partir de organismos, nos quais uma população de células é selecionada por expansão e imortalizada. B) Em culturas primárias. C) Em culturas organotípicas, in vivo interações celulares e estrutura tridimensional do tecido são mantido. D) Células tronco pluripotente induzidas. Modificado de Lopes et al., (2017). 13
- Figura 4 - Ascídia *Phallusia nigra* em duas fases de sua vida. A) fase larval; B) fase adulta. Retirado de: http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/1193 20
- Figura 5 - Unidades repetidas de dissacarídeos no DS e seus potenciais locais de sulfatação. DS consiste em IdoA e GalNAc. Estas porções de açúcar são esterificadas por sulfato em várias posições como indicado por "S". 2S, 4S e 6S representam 2-O-sulfato, 4-O-sulfato e 6-O-sulfato, respectivamente. Abreviaturas de possíveis unidades dissacarídicas são mostradas no painel. As unidades dissacarídicas do DS correspondentes são indicadas por "i", que representa o IdoA. Sequências específicas compostas por estas unidades fornecem diversidade estrutural, afetando assim uma ampla gama de interações com várias proteínas funcionais. Estruturas químicas foram retiradas do banco de dados de Substâncias e Compostos PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Os identificadores únicos da estrutura química são: 32756 (Dermatan, 4- (sulfato de hidrogênio) -Depositor: ChEMbase)..... 22
- Figura 6 - Representação esquemática da sucessão de etapas que levam da formação do neurito. Rede de filamentos de actina dendrítica (azul) e filopódios radiais contendo filamentos de actina agrupados (vermelho). N = núcleo..... 27
- Figura 7 - Esquema de extração e purificação dos GAGs 35

Figura 8 - Rendimentos por extração dos polissacarídeos totais obtidos nas extrações de GAG da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	47
Figura 9 - Rendimentos por extração das frações de polissacarídeos totais precipitadas em etanol.	48
Figura 10 - Isolamento e caracterização de polissacarídeos totais de <i>P. nigra</i> . (B) Polissacarídeos extraídos antes (-) e após a incubação (+) com condroitinase AC ou ABC e tratamento com ácido nitroso. Tanto em (A) e (B) os polissacarídeos foram aplicados em um gel de agarose a 0,8% em 0,05 M de 1,3-diaminopropano / acetato (pH 9,0), fixados com 0,1% de solução de N-cetil-N, N, N-trimetilamônio após 12 h, e corado (após secagem) com 1% de azul de toluidina. Como padrão foi utilizado uma mistura de glicosaminoglicanos de mamífero de 4-sulfato de condroitina (CS) e heparina (Hep).	50
Figura 11 - Análise da atividade mitocondria pelo método de MTT, na linhagem Neuro-2A plaqueadas na concentração de 10×10^4 céls/poço. A) exposta a 0,12-2,0 μ M de rotenona; B) exposta a 0,75-12 nM de DS de <i>P. nigra</i> e C) exposta a 1,0 μ M de rotenona e 1,5 nM de DS de <i>P. nigra</i> ; pelo período de 72 horas. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).	52
Figura 12 - Determinação da morte celular mediada por rotenona e DS de <i>P. nigra</i> em células de neuroblastoma murino NEURO-2A. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).	53
Figura 13 - Micrografia das células de NEURO-2A. A, C, E e G) Núcleos celulares marcados com DAPI (1:1000) emitindo fluorescência azul. B, D, F e H) por contraste de fase.	55
Figura 14 - Porcentagem de células presentes em culturas de NEURO-2A expostas a Rotenona (1,0 μ M) ao DS (1,5 nM). O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento com DAPI. Foram analisados 4 campos de células por poço. As barras representam o erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).	56
Figura 15 - Micrografia das células NEURO-2A para avaliação da viabilidade celular. A, D, G e J) Histoquímica com DAF; B, E, H e K) Histoquímica com Iodeto de propídeo) C, F, I e L) Sobreposição. Barra de escala: 100 μ m. N=4 amostras.	58
Figura 16 - Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em culturas de células de NEURO-2A expostas a 1 μ M de Rotenona e a 1,5 nM de DS. A) células viáveis	

marcadas com DAF; B) células apoptóticas marcadas com IP. O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento, empregando diferentes corantes IP e DAF. Foram analisados 4 campos de células por poço. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*), grupo DS (&) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 59

Figura 17 - Quantificação de neuritos nas células NEURO-2A marcadas com DAF. A) Relação entre a presença de neuritos por célula; B) Porcentagem de neurônios com prolongamentos; C) Comprimento do prolongamento neurítico. O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento ($n = 3$ experimentos independentes, foram analisados 4 campos de células por poço) utilizando o programa NIH ImageJ, versão 1.47t. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo DS (&) ($p \leq 0,05$). 61

Figura 18 -Eletromicrografia de varredura de células NEURO-2A incubadas com rotenona e DS de *P. nigra* durante 72h. $N=2$ 63

Figura 19 -Efeitos do DS e rotenona isolada ou em conjunto sobre a produção de ROS em células NEURO-2A. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 64

Figura 20 - Atividade de SOD (U/mg de proteína) em células de neuroblastoma murino NEURO-2A tratadas com rotenona e DS de *P. nigra*. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*), grupo DS (&) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 65

Figura 21 - Atividade de CAT (U/mg de proteína) em células de neuroblastoma murino NEURO-2A tratadas com rotenona e DS de *P. nigra*. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 66

Figura 22 -Efeitos do DS e rotenona isolada ou em conjunto sobre a capacidade antioxidante de ROS em células NEURO-2A. As barras representam as médias das

triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 67

Figura 23 -Efeitos do DS de *P. nigra* e rotenona isolada ou em conjunto sobre a peroxidação lipídica. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteoglicanos de dermatam sulfato no cérebro.....	28
Tabela 2 - Detalhamento das frações obtidas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAP – Capacidade antioxidante total contra radicais peróxido

ATP – adenosina trifosfato

CAT – Catalase

cathD - catepsina D

CS – Condroitina sulfato

DAF – diacetato de fluoresceína

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DAT - transportador de dopamina

DMB - azul de dimetilmetileno

DMEM-F12 - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F-12 (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)

DMSO – Dimetilssulfóxido

DP – Doença de Parkinson

DS – Dermatan sulfato

EC₅₀ – Concentração excitatória 50%

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

g – grama ou força da gravidade

GAGs - glicosaminoglicanos

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HA - ácido hialurônico

HeP – Heparina

HNO₂ - Ácido Nitroso

HS – Heparan sulfato

IP – Iodeto de propidium

KS – Queratan sulfato

LPO – Peroxidação lipídica

M - molar

MEC – Matrix extracelular

mg - miligrama

min - minuto

mL – mililitro

mM - milimolar

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

ng – nanograma

ng/mL - nanômetro

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} - Radical Ânion Superóxido

•OH - Radical Hidroxila

PBS - Tampão Salino Fosfato (do inglês, Phosphate Buffer Saline)

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TPA - 2-0-Tetradecanoil-forbol-13-acetato

µg – micrograma

RESUMO

A doença de Parkinson é uma condição incurável, de tratamento complexo, algumas com diagnóstico difícil, especialmente quando raras. Estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando vários modelos animais, vêm demonstrando que a exposição à rotenona reproduz a neuroquímica e a neuropatologia da doença, mimetizando os achados da patologia em humanos. Diversas moléculas têm participação na regeneração do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, e, entre elas, estão carboidratos complexos como os glicosaminoglicanos (GAGs) presentes em abundância nas ascídias. Diferentemente dos vertebrados, as ascídias apresentam alta capacidade regenerativa do SNC em adultos, e já foram isolados diferentes GAGs a partir desses animais, especialmente o dermatam sulfato (DS), os quais têm sido propostos como tendo um papel importante na regeneração neural. O presente estudo teve como objetivo investigar o papel do dermatam sulfato isolado da ascídia *Phallusia nigra* sobre a resposta neuroprotetora em cultura de células de neuroblastoma de camundongo NEURO-2A após lesão química causada pelo pesticida rotenona. A viabilidade neuronal foi analisada com ensaios colorimétricos e morfológicos. Foi observado um aumento notável na atividade mitocondrial das células Neuro-2A, indicando um efeito neuroprotetor de 1,5 nM de dermatam sulfato de *Phallusia nigra* com 1,0 µM de rotenona após 72 h. O comprimento dos neuritos aumentou de 16,25 para 39,23 µm após o uso do dermatam sulfato de *Phallusia nigra*. O dermatam sulfato de *Phallusia nigra* reduziu consideravelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Além disso, as células incubadas com dermatam sulfato de *Phallusia nigra* apresentaram níveis aumentados da capacidade antioxidantes total contra os radicais peroxil (ACAP) e foram capazes de proteger as células dos danos, conforme observado pelos níveis reduzidos na peroxidação lipídica (LPO). Esses dados indicam atividade antioxidante e neuroprotetora do DS de *Phallusia nigra* sob condições neurodegenerativas causadas pela rotenona.

Palavras - chave: Dermatam sulfato, ascídias, NEURO-2A, neuroregeneração.

ABSTRACT

Parkinson's disease is an incurable condition with complex treatment, some with difficult diagnosis, especially when rare. In vitro and in vivo studies using various animal models have shown that exposure to rotenone reproduces the neurochemistry and neuropathology of the disease, mimicking the findings of pathology in humans. Several molecules play a role in the regeneration of the central nervous system (CNS) of mammals, and among them are complex carbohydrates such as glycosaminoglycans (GAGs) present in abundance in ascidians. Unlike vertebrates, ascidians have high CNS regenerative capacity in adults, and different GAGs have been isolated from these animals, especially dermatan sulfate (DS), which have been proposed to play an important role in neural regeneration. The present study aimed to investigate the role of dermatan sulfate isolated from the *Phallusia nigra* ascidia on the neuroprotective response in NEURO-2A mouse neuroblastoma cell culture after chemical damage caused by rotenone pesticide. Neuronal viability was analyzed with colorimetric and morphological assays. It was observed a notable increase in mitochondrial activity of Neuro-2A cells was observed, indicating a 1.5 nM neuroprotective effect of *Phallusia nigra* dermatam sulfate with 1.0 μ M rotenone after 72 h. The length of neurites was increased from 16.25 to 39.23 μ m after the use of *Phallusia nigra* dermatam sulfate. *Phallusia nigra* dermatam sulfate play a role reducing considerable the production of reactive oxygen species (ROS) and increased the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In addition, cells incubated with *Phallusia nigra* dermatam sulfate showed increased levels of total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) levels and protect the cells from damage, as observed by reduced levels of lipid peroxidation (LPO). These data indicate *Phallusia nigra* DS antioxidant and neuroprotective activity under neurodegenerative conditions caused by rotenone.

Keywords: Dermatan sulfate, ascidians, NEURO-2A, neurorregeneration.

1. INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por morte celular seletiva e excessiva em diversas regiões do encéfalo (Thomas e Beal, 2007), tendo a sua incidência aumentada proporcionalmente com o avanço da expectativa de vida da população mundial (Wallace, 2005). Estas desordens estão aumentando em dimensões alarmantes em países industrializados, e, apesar dos avanços científicos, os mecanismos moleculares que levam à morte celular ainda não foram totalmente elucidados (Schapira e Jenner, 2011).

Dentre as doenças neurodegenerativas destaca-se a Doença de Parkinson (DP), desordem que foi descrita inicialmente em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, que fez uma descrição tão rica e precisa em detalhes da doença que hoje leva o seu nome. A enfermidade é caracterizada pela presença de movimentos involuntários tremulantes, com redução da força muscular, tendência para a inclinação frontal do tronco e alteração da marcha, mantendo os sentidos e o intelecto não afetados inicialmente. A evolução da doença é posteriormente caracterizada pelo aumento da intensidade dos tremores e a piora acentuada da marcha (Dauer e Przedborski, 2003; Fernandez, 2012; Guerrero *et al.*, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DP é definida como uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela presença de sintomatologia fundamentalmente no nível motor. A doença está também associada a uma diversidade de sintomas não motores que, juntamente com os sintomas mais tardios da doença (instabilidade postural, quedas, paragens de marcha, dificuldades orais e de deglutição), fazem com que o indivíduo tome o primeiro contato com o médico (Baker e Gershanik, 2006).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer, e a sua prevalência em países industrializados está estimada em 0,3% da população geral, afetando mais de um milhão de pessoas nos Estados Unidos (Samii *et al.*, 2004; Wallace, 2005). Sua incidência aumenta consideravelmente com a idade, de 20/100.000 aos 55 anos até 120/100.000 aos 70 anos de idade (Samii *et al.*, 2004). A causa da doença ainda é desconhecida, no entanto, parece que a maioria dos

casos de DP apresenta etiologias multifatoriais, com a presença de componentes genéticos e ambientais (Sulzer, 2007).

A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados que não possuem causa conhecida, porém, vários fatores de risco já foram descritos e uma importante associação é estabelecida entre a exposição ocupacional a herbicidas e pesticidas com o desenvolvimento da doença (Ascherio *et al.*, 2006; Tanner *et al.*, 2011).

Apesar das diferentes causas possíveis, a patogênese da desordem parece convergir para mecanismos relacionados à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e mau enovelamento proteico (Greenamyre e Hastings, 2004). Desta forma, um modelo estabelecido na literatura para estudo da doença, tanto *in vitro* quanto *in vivo* é a utilização de rotenona, um pesticida derivado de plantas subtropicais pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* ou *Derris elliptica* que tem como mecanismo de ação a morte celular por meio da inibição do complexo I mitocondrial que leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Moore *et al.*, 2005; Radad *et al.*, 2006; Tanner *et al.*, 2011). Processos oxidativos são fatores relevantes na DP, por isso diversas neurotoxinas como os pesticidas têm sido utilizados para elucidar os mecanismos de ação bem como a busca por novos fármacos que possam ser utilizados como terapia (Belarbi *et al.*, 2017).

Baseado nos dados mostrados anteriormente o glicosaminoglicano (GAG) dermatam sulfato (DS) têm se mostrado uma molécula promissora como novo fármaco e vem sendo amplamente estudado na neuroregeneração, modulando positivamente o crescimento de neuritos na formação da cicatriz glial, que é um dos fatores que inibe a regeneração axonal (Pavão *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2013; Sugahara *et al.*, 2003; Hikino *et al.*, 2003).

Neste contexto, buscamos investigar o papel neuroprotetor do DS de *Phallusia nigra*, utilizando a linhagem de neuroblastoma de camundongo NEURO-2A após lesão química causada pelo herbicida rotenona e avaliar a excitotoxicidade do DS de *Phallusia nigra* frente a diferentes paradigmas de estresse oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1. Perspectiva Histórica

Os primeiros relatos de sintomas que hoje são associados ao parkinsonismo datam de 5000 A.C. e são provenientes da Índia. A doença a que os médicos Ayurvédicos designavam de Kampavata, era tratada com *Mucuna pruriens*, uma planta da família das fabáceas e de nome comum “feijão aveludado”. Esta planta é a única fonte natural conhecida de levodopa (L-DOPA), o precursor direto da dopamina (Manyam 1990).

Ao longo dos séculos foram descritos sintomas que incluem tremores involuntários e posturas não convencionais. Desde a antiga Grécia, passando pelo Império Romano, pelos escritos bíblicos e pela *Ilíada* de Homero, até a um passado mais recente, personalidades conhecidas de várias áreas de estudo deram o seu contributo para o conhecimento do parkinsonismo, incluindo Leonardo da Vinci e William Shakespeare. Entre as personalidades mais marcantes da descrição formal dos sintomas ligados às desordens do movimento, destacam-se Franciscus de le Bøe, François de la Croix e Wilhelm von Humboldt. Este último descreve nas suas cartas os seus próprios sintomas e condição clínica, uma descrição muito completa do que são os sintomas da DP (Goetz 2007).

Em 1817, James Parkinson descreve com base em seis observações o primeiro quadro clínico do que viria a ser a DP: “Movimento trémulo involuntário, com força muscular diminuída, mesmo que em repouso ou suportado; com uma propensão para dobrar o tronco para frente, passando de uma marcha normal para um passo acelerado; sem sentidos e intelecto afectados” (Levy e Joaquim, 2003; Goetz 2009).

Foi em 1861/62, que Jean-Martin Charcot juntamente com Alfred Vulpian, descrevem pela primeira vez, de forma exaustiva, os sintomas do parkinsonismo e que a síndrome anteriormente estudada por Parkinson é formalmente reconhecida como uma condição patológica, adquirindo o nome de doença de Parkinson (Goetz 1986).

Ao longo do tempo, Charcot discrimina a diferença entre bradicinesia e rigidez (sintomas mais frequentemente associados à DP), registra a frequência dos tremores, reconhece a micrografia como uma característica comum a todos os doentes, e prescreve os primeiros tratamentos (Goetz 2008).

Só na década de 50 já no século XX são identificadas, por Arvid Carlsson, as primeiras alterações bioquímicas no cérebro que conduzem à doença. Carlsson demonstrou que a dopamina é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) e não só um precursor da noradrenalina, como se pensava anteriormente. Ao usar o fármaco reserpina (que provoca a depleção das vesículas neuronais das catecolaminas) em animais de laboratório, verificou que os níveis de dopamina decrescem significativamente, o que provoca sintomas semelhantes aos da DP, e admite a possibilidade da administração de L-DOPA aos doentes para o controle dos sintomas (Carlsson *et al.*, 1957). Devido ao seu trabalho, Carlsson identificou a primeira causa fisiopatológica da DP, e recebe o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 2000.

2.2. EPIDEMIOLOGIA

Grandes descobertas mudaram profundamente nossa compreensão da DP e suas determinantes (Tysnes e Storstein 2017). Considerando que os estudos genéticos revelaram a heterogeneidade da DP e forneceram *insights* sobre sua patogênese e etiologia, investigações epidemiológicas têm proporcionado evidência de que fatores comportamentais e ambientais têm um papel fundamental na patogênese e progressão da doença (Ascherio e Schwarzschild 2016).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da Doença de Alzheimer, afetando cerca de 1% da população acima de 60 anos (Sprenger e Poewe, 2013). Estima-se a prevalência da doença entre 1 e 2% da população mundial com mais de 65 anos e 3 a 5% dos indivíduos com mais de 85 anos num total de 4 milhões de pessoas em todo o mundo (Dorsey *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008). No Brasil, a prevalência é estimada em cerca de 3,3% em pessoas com idade acima de 65 anos (Barbosa *et al.*, 2006).

Em 2006, a OMS estimava a incidência da DP entre 4,5 a 10 novos casos por 100.000 indivíduos; este valor ajustado para a idade da população em questão varia entre os 9,7 e 13,8. Estimava-se a prevalência da doença entre 72 e 258,8 casos por 100.000 indivíduos (Baker e Gershanik 2006; Mayeux 2003).

Como a prevalência da doença de Parkinson aumenta com a idade, um aumento global dos casos da doença é esperado nas próximas décadas (Feng *et al.*, 2015). Baseado em estudos de prevalência publicados, um importante estudo fez uma projeção para os próximos anos do número de indivíduos com DP nos cinco países mais populosos da Europa Ocidental e nos 10 países mais populosos do mundo, incluindo o Brasil (Chade *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o número de indivíduos com DP acima de 50 anos que nesses países estava em torno de 4,1 e 4,6 milhões em 2005, irá dobrar para números entre 8,7 e 9,3 milhões de pessoas em 2030 (Dorsey *et al.*, 2007).

A Frequência da DP aumenta acentuadamente com a idade. É raro antes dos 50 anos, e sua incidência e prevalência aumentam progressivamente após os 60 anos; com base em uma meta-análise de estudos de incidência, sua prevalência aumenta de 107/100.000 pessoas entre 50 e 59 anos para 1087/100.000 pessoas entre 70 a 79 anos (Elbaz *et al.*, 2015).

2.3. PATOGÊNESE DA DOENÇA DE PARKINSON

A origem da DP e a sua patogênese é ainda desconhecida, coloca-se a hipótese de uma possível susceptibilidade genética, com envolvimento de vários genes cujo funcionamento parece ser transversal aos mecanismos referidos (Sutherland *et al.*, 2007; Henchcliffe e Beal 2008; Puschmann 2017).

Embora a neurodegeneração dopaminérgica seja reconhecida como uma marca patológica da DP, estudos *in vivo* de neuroimagem revelam perda de marcadores colinérgicos cerebrais na DP semelhante ou mais grave do que na doença de alzheimer prototípica (Conti *et al.*, 2018). Os estudos de imagem concordam com as evidências post mortem sugerindo que a degeneração do sistema

colinérgico basal do cérebro aparece no início da DP e piora coincidente com o aparecimento de demência (Thomas *et al.*, 2007; Bohnen e Albin, 2011).

As hipóteses incluem: defeitos conformacionais nas estruturas de proteínas citoplasmáticas, como o corpo de Lewy formado por agregados proteicos compostos majoritariamente por proteínas como a α -sinucleína, ubiquitina e sinfilina-1, entre outras (Zampol 2013; Reichmann 2017) e disfunções mitocondriais com consequente aumento do estresse oxidativo, resultando na morte neuronal (Dauer e Przedborski, 2003; Singh e Dikshi, 2007; Reale *et al.*, 2009; Puspita *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo não só aumenta a carga de proteínas mal dobradas como também leva a um comprometimento na maquinaria celular de degradação de proteínas (Betarbet *et al.*, 2000). Estes processos que consomem energia são ainda mais dificultados pelas limitações no fornecimento de ATP sob estas condições, resultando na remoção inadequada de proteínas mal dobradas (Koopman *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2011; Ganguly *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo foi primeiramente caracterizado por Sies em 1997, como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante em favor de espécies oxidantes, levando a danos potenciais na DP (Murphy 2009). Consiste em uma quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), que é o resultado de um desequilíbrio entre a geração e esgotamento de ERO (Piroschi e Pop 2015).

A produção de ERO como efeito colateral da respiração aeróbica na membrana interna da mitocôndria (Halliwell e Gutteridge, 2007; Milisav *et al.*, 2018) ocorre na cadeia respiratória mitocondrial, que consiste em uma série de complexos ligados à membrana, como o complexo I (NADH-ubiquinona redutase), complexo II (succinato ubiquinona redutase), complexo III (citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (adenosina trifosfato (ATP)) (Figura 1; Raha e Robinson, 2000; Niedzielska *et al.*, 2015). A eficiência da cadeia transportadora de elétrons faz com que sua produção seja pequena. Apenas entre 1% a 2% dos elétrons que atravessam a cadeia transportadora escapa desses complexos e se combina com o oxigênio molecular para formar espécies reativas (Boonstra e Post, 2004; Jensen, 2003; Winyard *et al.*, 2005).

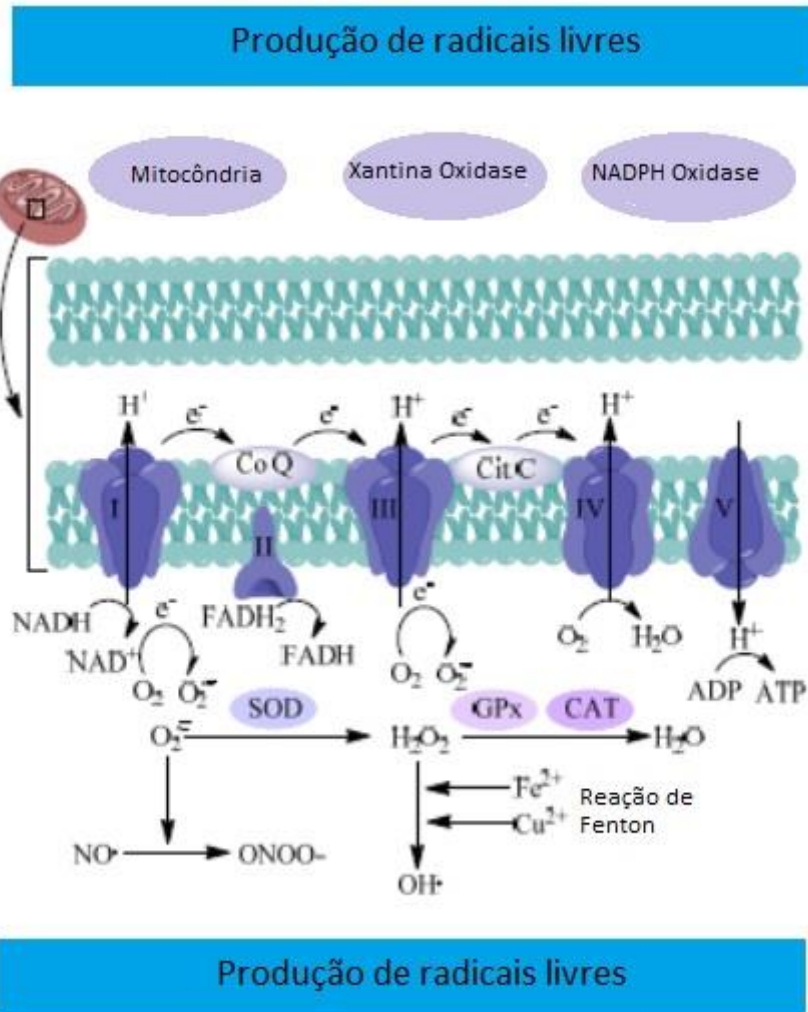


Figura 1 - Produção de ERO em células pela redução do oxigênio molecular em água, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que consiste em quatro complexos multiméricos (I, II, III e IV) e dois portadores de elétrons (Coenzima Q e Citocromo C). SOD (superóxido dismutase), GPx (glutationa peroxidase), CAT (catalase), NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato). Modificado de Feitosa *et al.*, (2018).

A homeostase das EROs é essencial para a sobrevivência celular e sinalização celular normal, evitando que as células sejam danificadas (Halliwell e Gutteridge, 2007). A desintoxicação de ERO é conseguida por antioxidantes não enzimáticos ou enzimáticos, envolvidos na eliminação de diferentes tipos de ERO (Baud *et al.*, 2004). Moléculas não enzimáticas incluem glutatona, flavonóides, vitamina A, C e E. Antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), superóxido redutase, catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase,

peroxirredoxina (PRx) e tiorredoxina (TRx) (Chong *et al.*, 2005; Oyewole *et al.*, 2015; Liguori *et al.*, 2018).

Considera-se que os neurônios dopaminérgicos suportam um estresse oxidativo constante, pois a atividade enzimática implicada na síntese e no catabolismo da dopamina (tirosina hidroxilase e monoamina oxidase, respectivamente) gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como um produto ou subproduto normal, e, além do mais, os neurônios são extremamente sensíveis à disfunção mitocondrial devido à sua considerável demanda de energia e, por essa razão, espera-se que esse defeito contribua para vários distúrbios neurológicos humanos contribuindo para a patogênese da DP (Gomez *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2019).

2.4. MODELOS QUÍMICOS PARA O ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Na generalidade, a utilidade de um modelo para o estudo de uma doença depende da forma como esse modelo reproduz a condição humana. No que toca à DP, apesar de nenhum modelo reproduzir na totalidade as características comportamentais, bioquímicas e histopatológicas da doença, os modelos permitem aprofundar o conhecimento acerca dos mecanismos inerentes ao desenvolvimento da doença e a sua possibilidade de tratamento (Petzinger e Jakowec 2007).

Aproximadamente 85-90% dos casos de DP são esporádicos, isto é, apenas cerca de 10 a 15% dos pacientes relatam história familiar positiva, sugerindo que a exposição a agentes ambientais específicos pode desempenhar um papel na patogênese da DP (Kwakye *et al.*, 2018)

É teorizado que há um "duplo impacto" causado por predisposição genética e fatores ambientais subsequentes que interagem para criar a disfunção que causa a DP (Nandipati e Litvan 2016).

De acordo com alguns autores, fatores não genéticos, como por exemplo, exposição a agentes tóxicos ambientais (pesticidas) estariam envolvidos tanto quanto fatores genéticos na gênese da DP e que até mesmo esses fatores ambientais seriam antecedentes à hereditariedade na etiologia DP (Collins e Neafsey 2002; Dick *et al.*, 2007; Elbaz *et al.*, 2007). A combinação de fatores ambientais e genéticos portanto,

podem contribuir para o aparecimento da doença, havendo um sinergismo (Thiruchelvam, 2000; Sanders *et al.*, 2017).

A descoberta de que fatores ambientais podem estar associados à DP promoveu a criação de modelos de DP induzidos por toxinas destinados a elucidar os mecanismos de neurodegeneração. Entre eles podemos destacar a (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), e também pesticidas como a rotenona (um inseticida) e paraquat (um herbicida). Esses modelos podem apresentar características importantes associadas com a doença humana, incluindo fibrilação de α -sinucleína, perda de células neuronais dopaminérgicas, disfunção mitocondrial, bem como danos oxidativos (Belarbi *et al.*, 2017).

2.4.1. Modelo de Doença de Parkinson por rotenona

A rotenona é um pesticida natural utilizado e preparado a partir das raízes de certas plantas subtropicais pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* ou *Derris elliptica*, utilizado na agricultura biológica e para controlar populações de peixes (Ware, 1989; Patel, 2011). Embora seja orgânico e, portanto, originalmente pensado para ser não-tóxico para os seres humanos, verificou-se que gera neurodegeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos e não dopaminérgicos dependendo da concentração utilizada (Manjunath e Muralidhara, 2015; Nandipati e Litvan 2016; Berstad e Berstad 2018).

Em modelos murino, administração de rotenona por injeção intraperitoneal diária produz bradicinesia, instabilidade postural e rigidez responsiva à dopamina. Estudos post-mortem com ratos descobriram que quase metade dos neurónios da substância negra e do corpo estriado foram perdidos. Além do mais, agregados positivos para α -sinucleína e poliubiquitina foram observados em neurónios dopaminérgicos na substância negra, similar aos corpos de Lewy (Figura 2; Sudati *et al.*, 2013; Fleming 2017) e em outras áreas do encéfalo encontrados na DP (Zweig *et al.*, 1989).

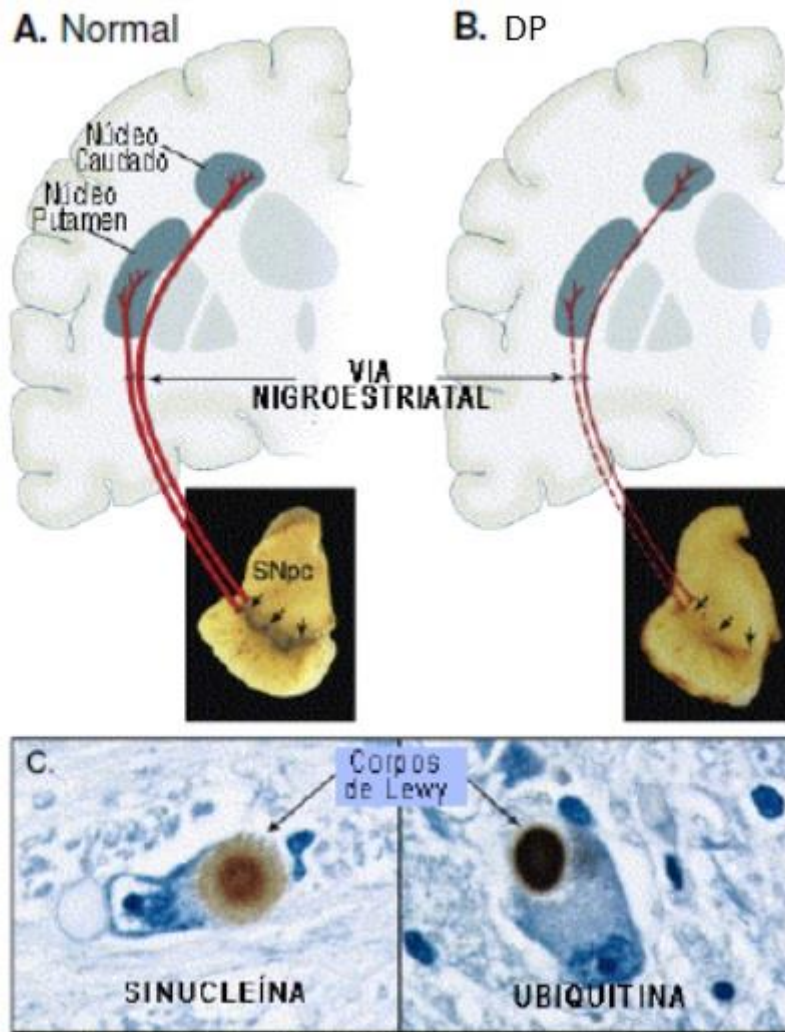


Figura 2 - A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Os neurônios dopaminérgicos da substância negra (setas), projetam (linhas vermelhas sólidas) para o estriado (núcleos caudado e putamen). B) Representação esquemática da mesma via afetada pela doença de parkinson (DP): degeneração (setas) e acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que projetam para o putamen (linha tracejada), com perda mais modesta dos que projetam para o caudado (linha vermelha fina). C) Imunocitoquímica dos corpos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da substância negra confirma que os mesmos apresentam agregados de α -sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). Modificado de Dauer e Przedborski, (2003).

A expressão de α -sinucleína não se limita nos neurônios dopaminérgicos na substância negra; também é expresso em neurônios colinérgicos em numerosos núcleos não dopaminérgicos em todo o sistema nervoso central, locus ceruleus, hipocampo e núcleo accumbens (Solano *et al.*, 2000; Sharrad *et al.*, 2012).

As causas para a morte celular de neurônios dopaminérgicos e neurônios colinérgicos na DP não são conhecidas. São discutidos vários estímulos indutores de morte celular, como estresse oxidativo (Greenamyre e Hastings, 2004), morte celular induzida por glutamato (Blandini *et al.*, 1996), compostos tóxicos (Dauer e Przedborski, 2003), citocinas pró-inflamatórias (Vila *et al.*, 2001) ou estímulos pró-apoptóticos (Honig e Rosenberg, 2000). A rotenona é um desses estímulos indutores de morte celular, que foram discutidos como estando envolvidos na DP (Coulom e Birman, 2004; Tieu, 2011).

O mecanismo de toxicidade da rotenona é mediado principalmente devido a sua lipofilicidade elevada que lhe permite atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e membranas biológicas independentes de qualquer receptor ou transportador (Subramaniam e Chesselet, 2013).

A neurotoxicidade pode estar relacionada com a inibição da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADH), desidrogenase mitocondrial no complexo I mitocondrial (Tamilselvam *et al.*, 2013). A rotenona aumenta a capacidade de gerar ERO e interrompe a fosforilação oxidativa mitocondrial causando uma crise bioenergética, devido à redução nos níveis de ATP e morte celular por apoptose ou necrose (Park *et al.*, 2014; Thakur e Nehru, 2014). Devido à despolarização causada pela grande abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, ocorre à liberação de fatores pró-apoptóticos tais como fator indutor de apoptose, que eventualmente causa a morte neuronal (Li, 2002; Cicchetti *et al.*, 2009; Tieu, 2011; Subramaniam e Chesselet, 2013).

Além da geração de ERO a rotenona também desencadeia a ativação das células gliais e resposta neuroinflamatória (Sherer *et al.*, 2003). Estudo usando culturas primárias enriquecidas com neurônios e neurônios/glia do mesencéfalo de ratos, indicaram que a capacidade neurodegenerativa da rotenona foi atribuída à presença de glia, especialmente microglia, aumentando significativamente sua suscetibilidade à rotenona, estimulando a liberação de superóxido da micróglia que foi atenuado por inibidores da NADPH oxidase. Além disso, a inibição da NADPH oxidase ou a eliminação do superóxido reduziu significativamente a neurotoxicidade induzida pela rotenona (Gao *et al.*, 2002; Kwakye *et al.*, 2018).

2.4.1.1. Complexo I mitocondrial e rotenona

O complexo I mitocondrial é um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, possui atividade oxirredutase e induz a translocação de prótons da matriz para o espaço intermembranas da mitocôndria. Esse complexo contribui para estabelecer o gradiente eletroquímico utilizado para a geração de ATP, e para a formação do potencial de membrana mitocondrial (Pan-Montojo *et al.*, 2010; Nelson e Cox, 2014). Estudos demonstraram seu papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, seja devido a mutações específicas ou por ter sido reconhecido como alvo para algumas toxinas exógenas que afetam a sua função (Hoglinger *et al.*, 2005; Schapira, 2010). Existem toxinas capazes de inibir o complexo I que frequentemente penetram na barreira hematoencefálica através de transportadores específicos e têm o potencial de se acumular no cérebro (Elbaz, 2007; Brown, 2007), outras, como a rotenona, não necessitam de transportadores devido à alta lipofilicidade (Betarbet *et al.*, 2000), favorecendo distúrbios na transferência de elétrons através do complexo I (Perfeito *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014).

Distúrbios na transferência de elétrons através do complexo I levam a um gradiente de prótons comprometido e reduz a geração de ATP. Como consequência da disponibilidade limitada de ATP, a homeostase mitocondrial de Ca^{2+} é perturbado, contribuindo assim para a disfunção mitocondrial (alta demanda de energia de Ca^{2+} ATPases) (Dick, 2007; Cabezas *et al.*, 2013). Paralelamente à redução na geração de ATP, o bloqueio do fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória resulta em uma redução acidental de oxigênio molecular para formar superóxido (Mailloux 2015).

Níveis elevados de ERO promovem dano oxidativo do ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, proteínas e lipídios e desencadeiam fragmentação mitocondrial (Ogawa *et al.*, 2005; Thakur e Nehru, 2014). A perda do potencial transmembrana mitocondrial, geração mitocondrial de ATP comprometida, os distúrbios na homeostase mitocondrial de Ca^{2+} , bem como a produção de níveis nocivos de EROs são aspectos coletivamente referidos como disfunção mitocondrial (Bose e Beal, 2016; Terron *et al.*, 2017).

2.4.2. Modelos celulares para estudar a Doença de Parkinson

As complexidades moleculares da DP têm sido difíceis de abordar, isso se deve ao fato de que nenhum dos modelos é capaz de recapitular totalmente todas as características da doença. Distúrbios multifatoriais, como DP, são particularmente importantes para dissecar os complexos processos patológicos em eventos moleculares mais simples (Astashkina et al., 2012; Miller et al., 2013).

O propósito de qualquer modelo celular é simplificar variáveis experimentais presentes no organismo inteiro, permitindo a manipulação mais precisa de genes e fatores ambientais, evitando, ao mesmo tempo, questões éticas complexas associadas ao uso de modelos de mamíferos ou estudos em seres humanos (Figura 3; Lázaro et al., 2017; Lopes et al., 2017).

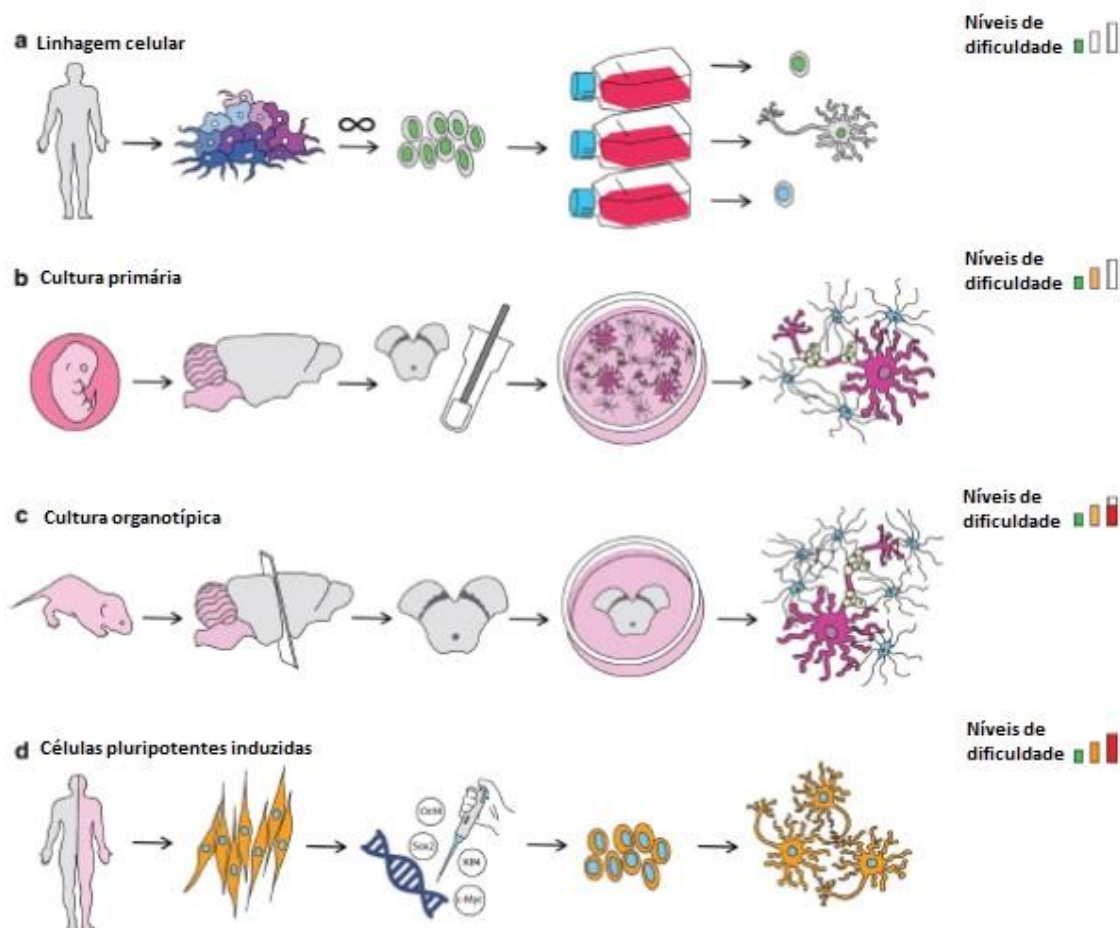


Figura 3 - Modelos *in vitro* da DP, mostrados em ordem de menor para a maior dificuldade na produção e manutenção. A) Linhagem celular são derivados de

biópsias obtidas a partir de organismos, nos quais uma população de células é selecionada por expansão e imortalizada. B) Em culturas primárias. C) Em culturas organotípicas, *in vivo* interações celulares e estrutura tridimensional do tecido são mantidos. D) Células tronco pluripotente induzidas. Modificado de Lopes *et al.*, 2017.

Dentre as metodologias destacadas na figura 3, a cultura primária e organotípica são adequadas para estudar a sobrevivência de células dopaminérgicas, retração de neurites e regeneração (Schlachetzki *et al.*, 2013); Apesar de tais vantagens, os modelos também apresentam desvantagens, dentre elas, as seguintes: população celular heterogênea (cultura mista), variação entre diferentes preparações da cultura (Zhang *et al.*, 2014), difícil manutenção (Xicoy *et al.*, 2017), o procedimento de dissecação pode introduzir variabilidade experimental (Xicoy *et al.*, 2017), baixa concentração da enzima tirosina hidroxilase e possuem problemas éticos (Falkenburger e Schulz, 2006).

Além do modelo retratado acima, um outro modelo *in vitro* para DP são as células pluripotentes induzidas, que destacam-se por serem livres de questões éticas (Singh *et al.*, 2015) e podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos (Soldner *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017); porém apesar das vantagens destacadas possuem baixo nível de reparo após danos no DNA (Zhang *et al.*, 2012) e as células inerentemente são imaturas (Avior *et al.*, 2016). Sendo assim, o uso de linhagem celular se destaca não só pela facilidade de manutenção, mas pela proliferação indefinida permitindo alto rendimento de experimentação usando uma ampla variedade de técnicas (Scholz *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2013).

Dentre as linhagens utilizadas para estudar a DP destacam-se: A linhagens H4 (células de glioma humano) que apesar de ser de fácil cultivo, não possui fenótipo dopaminérgico; A linhagem HEK (células de rim embrionário humano) adequadas para estudar a agregação de α -sinucleína (Lazaro *et al.*, 2014b; McLean *et al.*, 2001; Outeiro *et al.*, 2008); porém o número excessivo de passagens pode levar a alterações genéticas e epigenéticas (Falkenburger e Schulz, 2006); A linhagem SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) que após diferenciação com ácido retinóide e 2-0-Tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), expressam receptores de dopamina D2 e D3, da enzima tirosina hidroxilase, transportador de dopamina (DAT) e transportador de monoamina vesicular (Presgraves *et al.*, 2004); porém sua

resposta pode ser inconsistente dependendo do tratamento utilizado para diferenciação (Wang *et al.*, 2007; Xicoy *et al.*, 2017); A linhagem PC12 (célula de feocromocitoma de rato) é um bom modelo para estudar neurosecreção (Westerink e Ewing, 2008); porém por ser derivado de um tumor neural, pode ter vias de sinalização alteradas. A linhagem LUHMES (células humanas mesencefálicas) também é um bom modelo, que apresentam características dopaminérgicas após diferenciação (Lotharius *et al.*, 2005); porém após diferenciação as células exibem uma expressão heterogênea da enzima tirosina hidroxilase (Zhang *et al.*, 2014).

2.4.2.1. Linhagem de células de neuroblastoma de camundongo (NEURO-2A).

As células NEURO-2A são originalmente derivadas do cérebro de camundongo albino (*Mus musculus*), um animal suscetível à toxicidade química induzidas por estresse oxidativo (Bradbury *et al.*, 1986). Além disso, as células NEURO-2A exibem verdadeira morfologia neuronal, diferentemente das células de neuroblastoma imortal comumente usadas que exibem caracteres epiteliais ou fibroblásticos (Mazzio e Soliman, 2003; Soliman *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). As células NEURO-2A também possuem uma alta afinidade pela captação de rotenona e exibem uma vulnerabilidade à toxina que excede a de outras linhagens celulares (Amazzal *et al.*, 2007).

As células NEURO-2A foram clonadas a partir de uma linhagem de tumor de camundongos albinos (*Mus musculus*) (Klebe e Ruddle, 1969), são células colinérgicas capazes de se diferenciar em células colinérgicas ou dopaminérgicas, dependendo das condições de cultura (Namsi *et al.*, 2018). Olmsted e colaboradores (1970), ao utilizarem vimblastina, substância que inibe a formação do fuso mitótico e interrompe a divisão celular em mitose, encontraram grande quantidade de microtúbulos nessas células (Zhou *et al.*, 2010), que são de suma importância para utilização como modelo neuronal, uma vez que os neurofilamentos são abundantes nos neurônios e seu acúmulo está presente em diversas doenças neurodegenerativas (Miller *et al.*, 2002).

Estudos anteriores mostraram que as células NEURO-2A expressam o receptor PAC1, que é um membro da superfamília do receptor acoplado à proteína

G, que desencadeia a ativação de várias proteína-quinase, como ERK1/2 (Tremblay *et al.*, 2010). Sendo assim, as células NEURO-2A constituem um modelo adequado para estudar a diferenciação neuronal e identificar as vias de sinalização associadas a DP (Tremblay *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2017; Namsi *et al.*, 2018).

2.5. TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

Em relação ao tratamento da DP, é importante lembrar e compreender que atualmente não existe cura para a doença, porém, ela pode e deve ser tratada, não apenas combatendo os sintomas, como também retardando o seu progresso (Jadiya *et al.*, 2011), e cirurgias também podem ser bastante benéficas para determinados pacientes (Perfeito e Rego 2012).

As cirurgias consistem em lesões no núcleo pálido interno (Palidotomia) ou do tálamo ventro-lateral (Talamotomia), que estão envolvidos no mecanismo da rigidez e tremor (Li *et al.*, 2013). Porém, a lentidão de movimentos responde melhor a terapia medicamentosa de reposição de dopamina através do uso do precursor L-DOPA que vêm sendo utilizada desde a década de 60, porém, não é muito efetiva no tratamento do tremor de repouso. Por outro lado, há um grande interesse em tratamentos não dopaminérgicos para a melhora das funções motoras sem o risco das complicações associadas com a L-DOPA, assim como compostos bioativos que sejam isentos de efeitos adversos e que sejam capazes de alterar o curso da morte neuronal, para o tratamento da DP, bem como de outras doenças neurodegenerativas (Fernandez 2012; Pickrell e Youle 2015; Conti *et al.*, 2018)

Alguns trabalhos vêm investigando o papel dos GAGs para futura terapia em DP por estarem presentes na maioria dos agregados proteicos intra e extracelulares que se acumulam em doenças neurodegenerativas, incluindo aquelas feitas de A β (Castillo *et al.* 1997), tau (Goedert *et al.* 1996), e α -sinucleína (Cohlberg *et al.* 2002; Diaz-Nido *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2013; Motamedi-Shad *et al.*, 2009).

2.6. ENVOLVIMENTO DOS GLICOSAMINOGLICANOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Avila *et al.*, (2014; 2017) relatou que GAGs sulfatados, como a heparina e heparan sulfato, são capazes de desencadear gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) uma enzima multifuncional associada a doenças neurodegenerativas (Tsuchiya *et al.*, 2005; Torres-Bugeau *et al.*, 2012). As espécies de GAPDH induzidas por heparina formaram-se durante o início das etapas do processo de agregação e são capazes de acelerar a agregação α -sinucleína (Cremades *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2017).

Embora essas observações sugiram a possível participação do heparan sulfato no processo de agregação intracelular de α -sinucleína na DP, também foi relatado que o condroitim sulfato e Dermatan sulfato inibe a formação de fibrilas β -amilóides, encurta as fibrilas amilóides pré-formadas (McLaughlin *et al.*, 2006; Torres-Bugeau *et al.*, 2011) e atenua a neurotoxicidade induzida por β -amilóides *in vitro* e *in vivo* (Woods *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2015).

Uma outra via envolvida na agregação de α -sinucleína é a via da catepsina D, a principal protease lisossômica responsável pela degradação da α -sinucleína, foi descrita como sendo regulada positivamente no modelo de DP. Como os GAGs regulam a atividade da cathD e recentemente foram sugeridos para participar da fisiopatologia da DP (Lehri-Boufala *et al.*, 2015; Ihse *et al.*, 2017).

Além disso, os GAGs e seus miméticos sintéticos podem modular efetivamente a atividade da catepsina D, proteger mitocôndrias e inibir o estresse oxidativo induzido pela apoptose, sugerindo seu papel potencial nas patologias em que esses processos ocorrem (Yue *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que o envolvimento de GAGs não se limita ao processo de agregação clássico, mas é necessário na captação e propagação celular para tauopatia e sinucleinopatia (Holmes *et al.*, 2013). Tau e α -sinucleína entram nas células via macropinocitose, na qual os GAGs servem como receptor primário (Nakase *et al.*, 2007; Mehra *et al.*, 2018). No entanto as pesquisas nessa área ainda são limitadas e o número de grupos capazes de combinar abordagens glicobiológicas

para o estudo dos mecanismos gerais que operam na DP permanece escassa (Nussbaum 2017; Maïza *et al.*, 2018).

2.7. GLICOSAMINOGLICANOS

Os GAGs são polissacarídeos longos, não ramificados, compostos por repetições de regiões dissacarídicas de ácido urônico (ácido D-glucorônico ou IdoA) e um açúcar amino (D-galactosamina ou D-glucosamina) ou galactose (Hook *et al.*, 1984). Eles são distinguidos um do outro pelo tipo de unidade de hexose, hexosamina ou ácido hexurônico presente e pela geometria da ligação glicosídica entre as unidades repetidas (Allen, 2013).

Com base na diferença de repetições de unidades dissacarídicas compreendendo GAGs, elas podem ser categorizadas em seis grupos principais: heparina (Hep), heparam sulfato(HS), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratan sulfato (KS) e ácido hialurônico (HA) (Gallo, 2000; Yamada *et al.*, 2011).

Os GAGs são considerados uma fração dos glicoconjugados nas membranas celulares, na matriz extracelular e em alguns grânulos celulares de todos os tecidos. A capacidade de conectar interações proteína-proteína é identificada como um importante determinante da resposta celular no desenvolvimento, homeostase e doença (Oohira *et al.*, 1991; Soleman *et al.*, 2013). Pode atuar como uma barreira física e bioquímica, criando microambientes específicos ao redor das células. Eles constroem barreiras seletivas de tamanho que são permeáveis apenas por pequenas entidades, como Ca^{2+} e Na^{+} , que podem se difundir livremente e promover a homeostase catiônica extracelular (Costa *et al.*, 2017).

A biossíntese de GAG envolve várias enzimas que reúnem o esqueleto de GAG e subsequentemente adicionam sulfato em seu dissacarídeo em posições específicas, exceto HA que é um GAG não sulfatado (Li *et al.*, 2016). As cadeias são sintetizadas pela ligação de um ligante tetrassacarídeo que é covalente ligado ao núcleo da proteína. Após a ligação do ligante ao núcleo da proteína, a cadeia de glucosamina, galactosamina ou galactose é transferida, determinando se o tipo de GAG é produzido (Li *et al.*, 2008; Yamada e Sugahara, 2008). Posteriormente, as

cadeias de açúcar são estendidas pela adição de dois monossacarídeos alternados, N-acetilgalactosamina/ácido glucurônico em sulfato de CS/DS ou N-acetilglucosamina/ácido glucurônico em Hep/HP no ligante de tetra sacarídeos (Imberty *et al.*, 2007; Gandhi e Mancera, 2008).

Estas cadeias de GAG são modificadas por sulfatação em várias posições do grupo hidroxil e também pela epimerização de resíduos de ácido urônico durante o processo biossintético, dando origem a diversidade estrutural, que desempenha um papel importante em uma ampla gama de papéis biológicos, incluindo proliferação celular, morfogênese tecidual, infecções por vírus e interações com fatores de crescimento, citocinas, morfogênicos e neuritogênese (Mizumoto e Sugahara, 2012; Venkatachalam, 2003).

São encontrados onipresentes na árvore filogenética no reino animal tanto em vertebrados quanto em invertebrados como no gastrópode *Nodipecten nodosus*, no camarão e nas ascídias, onde já foi verificada a presença de GAGs em suas vísceras (Hoopes *et al.*, 2010); já nas bactérias, são apenas encontradas cadeias não sulfatadas de GAGs. Outro fato interessante é que o aparecimento de CS e HS no reino animal coincide com o surgimento dos metazoa, que são animais que exibem tecidos organizados em camadas germinativas e que produzem neurônios (Yamada *et al.*, 2011).

Estudos relatam que os GAGs podem atuar no crescimento e invasão tumoral, na plasticidade de neurônios e em processos relacionados às principais doenças do sistema nervoso central (SNC) incluindo, epilepsia, esquizofrenia, esclerose múltipla, DP e doença de Alzheimer (Berezin *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2016).

O DS vem sendo amplamente estudado na neuroregeneração, modulando positivamente o crescimento de neuritos na formação da cicatriz glial, que é um dos fatores que inibe a regeneração axonal (Li *et al.*, 2013). Porém, o DS encontrado na ascídia *Phallusia nigra* (Figura 4) é diferente dos demais por apresentar maior quantidade de sulfatações, e seu padrão de sulfatação também é diferente do DS no SNC de mamíferos adultos. Enquanto o DS de mamíferos adultos apresenta sulfatação no carbono 4 da N-acetil-galactosamina ou no carbono 6 da N-acetil-galactosamina, o DS da *Phallusia nigra* é mais sulfatado e apresenta ~90% do padrão

de sulfatação nos carbonos 2 do ácido idurônico e 6 da N-acetil-galactosamina e ~10% de sulfatação no carbono 6 da N-acetil-galactosamina (Pavão *et al.*, 1995). Com isso, verificou-se a importância da sulfatação no carbono 4 da N-acetil-galactosamina como sendo inibidor (Hikino *et al.*, 2003), e que o DS com o mesmo padrão de sulfatação da *Phallusia nigra*, em experimentos realizados com camundongos na fase embrionária, apresenta a capacidade de promover crescimento de neuritos em neurônios do hipocampo “*in vitro*” (Bao *et al.*, 2005; Sugahara *et al.*, (2003).

Os principais GAGs encontrados nos nichos neurogênicos de mamíferos são CS e HS. DS e KS são encontrados em pequenas quantidades no sistema nervoso adulto, mas o DS tem uma produção variável durante o desenvolvimento, e é encontrada em grandes quantidades em embriões, com o mesmo padrão de sulfatação da *Phallusia nigra* (Sugahara *et al.*, 2007; Kleene e Schachner, 2004).

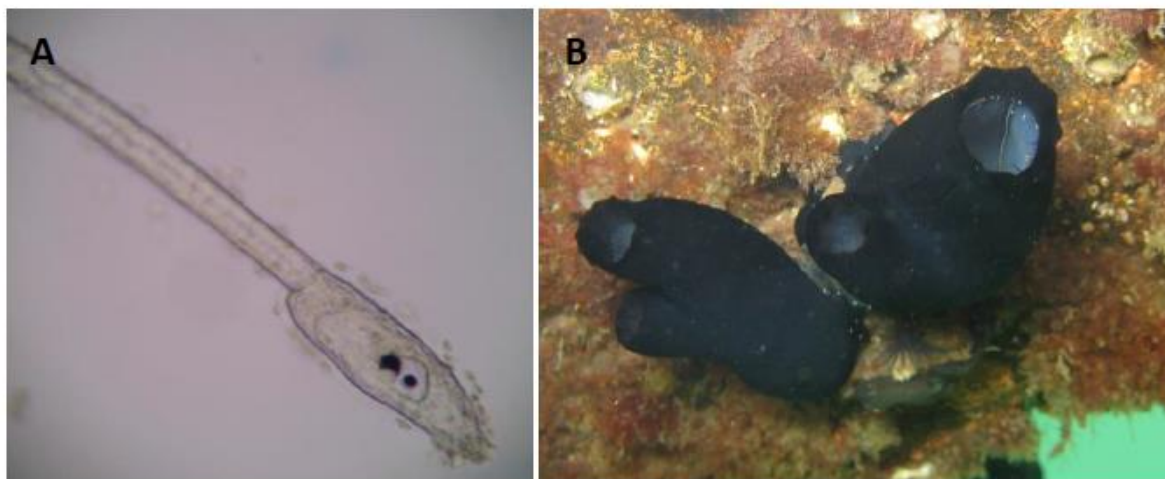


Figura 4 - Ascídia *Phallusia nigra* em duas fases de sua vida. A) fase larval; B) fase adulta. Retirado de: http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/1193

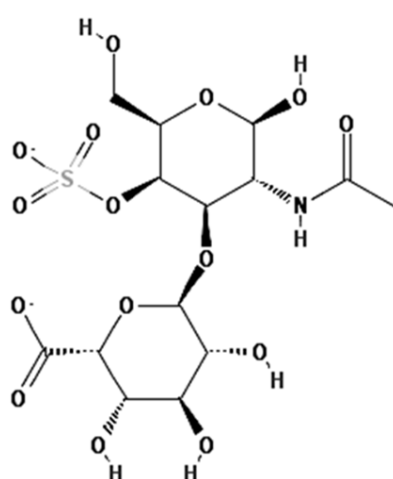
Evidências anteriores revelaram o efeito antioxidante e anti-inflamatório do CS (Egea *et al.*, 2010), quitosana (Manigandan *et al.*, 2018) e da heparina de baixo peso molecular (enoxaparina; Stewart *et al.*, 2002), protegendo os neurônios contra a toxicidade *in vitro* e *in vivo*, graças a sua ação neuroprotetora contra o estresse

oxidativo potencialmente envolvido na neurodegeneração (Stutzmann *et al.*, 2006; Župan *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012).

2.7.1. Dermatom sulfato

A síntese de DS ocorre pela adição de resíduos de IdoA e GalNAc alternadamente a um núcleo proteico. Muitos dos resíduos de GlcA tornam-se epimerizados em C-5 para produzir IdoA. Subsequentemente, a O-sulfatação pode ocorrer nas posições C-4 D4ST ou C-6 por D6ST de GalNAc ou na posição C-2 de IdoA (reação catalisada pela DS 2-O-sulfotransferase (DS2ST)). Devido às reações de epimerização e sulfatação, a estrutura de DS é heterogênea (Penc *et al.*, 1998; Lyon *et al.*, 1998; Anders *et al.*, 2012).

A variedade na estrutura DS é responsável por dar estes subtipos de dissacarídeos: IdoUA-GalNAc (iO), IdoUA-GalNAc (4S) (iA), IdoUA-GalNAc (6S) (iC), IdoUA (2S) -GalNAc (4S) (iB), IdoUA (2S) -GalNAc (6S) (iD) e IdoUA-GalNAc (4S, 6S) (iE ou H) (Figura 5). Estas moléculas compreendem a faixa de peso molecular de 12 a 45 kDa com uma média de cerca de 25 kDa (Jiang *et al.*, 2005; Sant *et al.*, 2010; Xu e Esko 2014).



[$-4\text{IdoUA}\alpha 1-3\text{GalNAc}\beta 1-$]

SÍMBOLO	SEQUÊNCIA
Unidade iO	IdoUA-GalNAc
Unidade iA	IdoUA-GalNAc(4S)
Unidade iC	IdoUA-GalNAc(6S)
Unidade iB	IdoUA(2S)-GalNAc(4S)
Unidade iD	IdoUA(2S)-GalNAc(6S)
Unidade iE	IdoUA-GalNAc(4S,6S)

Figura 5 - Unidades repetidas de dissacarídeos no DS e seus potenciais locais de sulfatação. DS consiste em IdoA e GalNAc. Estas porções de açúcar são esterificadas por sulfato em várias posições como indicado por "S". 2S, 4S e 6S representam 2-O-sulfato, 4-O-sulfato e 6-O-sulfato, respectivamente. Abreviaturas de possíveis unidades dissacarídicas são mostradas no painel. As unidades dissacarídicas do DS correspondentes são indicadas por "i", que representa o IdoA. Sequências específicas compostas por estas unidades fornecem diversidade estrutural, afetando assim uma ampla gama de interações com várias proteínas funcionais. Estruturas químicas foram retiradas do banco de dados de Substâncias e Compostos PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Os identificadores únicos da estrutura química são: 32756 (Dermatan, 4- (sulfato de hidrogênio) -Depositor: ChEMBL).

Durante o desenvolvimento, estruturas contendo IdoA (iA, iB, iE e iD) são onipresentes em diferentes partes do cérebro (Mitsunaga *et al.*, 2006), embora em baixas concentrações. De fato, DS em cérebros de camundongos recém-nascidos contém apenas 2% de ácido idurônico (Crespo *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2010; Bartolini *et al.*, 2012). A maquinaria bioenzimática de DS é cuidadosamente regulada durante o desenvolvimento do cérebro, resultando em uma grande variação de estruturas contendo IdoA. Por exemplo, no cerebelo, o iD diminui e o iB aumenta do recém-nascido para a idade adulta (Akatsu *et al.*, 2011). Curiosamente, o DS derivado de embrião apresenta uma maior ligação de FGFs (FGF-2, 10 e 18), pleiotrofina, midkine, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) do que DS dos cérebros de animais adultos (Sugahara e Mikami *et al.*, 2007; Thelin *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que as raras unidades dissacarídicas supersulfatadas presentes nas cadeias embrionárias de derivados de cérebro de porco são elementos críticos para a neuritogênese (Sugahara e Yamada 2000; Sugahara *et al.*, 2003). Além disso, a unidade iE isolada da notocorda do peixe-bruxa tem uma estrutura superestimulada única, caracterizada por um dissacarídeo principal. Além disso, a iE exógena exibiu uma apreciável atividade inibidora na adesão de células neuronais mediada por midkine (Anno *et al.*, 1971; Ueoka *et al.*, 1999). Contudo, a presente estrutura sobre-sulfatadas no cérebro de mamífero não foi rigorosamente caracterizada (Cole e McCabe 1991; Bovolenta *et al.*, 1993).

A proporção de IdoUA para GlcUA varia dependendo da fonte de tecido ou espécie animal em que a molécula foi obtida (Linhardt *et al.*, 1991a; Hikino *et al.*,

2003; Nadanaka *et al.*, 1998; Faissner *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1992), estágio de desenvolvimento (Herndon e Lander, 1990; Fernaud-Espinosa *et al.*, 1996; Grumet *et al.*, 1996; Hacker *et al.*, 1997), bem como o método de purificação (Allen *et al.*, 2012). O teor de IdoUA de polímeros de DS pode variar de 1 a mais de 90%, mesmo em muitos tecidos de diferentes animais e metodologias utilizadas (Kresse *et al.*, 1993; Bourin e Lindahl, 1993).

Este padrão de sulfatação é responsável por uma ampla gama de eventos biológicos envolvendo DS, tais como a montagem de matrizes extracelulares, a transdução de sinais através da ligação a fatores de crescimento, cicatrização de feridas, anticoagulação e estudos mostraram um efeito estimulatório no crescimento de neuritos. Outra característica importante da estrutura do DS é o conteúdo de IdoA, que pode variar dependendo de cada órgão, estágio de desenvolvimento, espécies animais usadas para obter a molécula, entre outros (Trowbridge e Gallo, 2002; Litwack *et al.*, 1998; Li *et al.* (2013; Miyake *et al.*, 2010; Theocharis *et al.*, 2015; Malavaki *et al.*, 2008).

DS derivado de pele de porco (Sakai *et al.*, 2003), moluscos marinhos (Volpi e Maccari 2009), ascídia (Peacock *et al.*, 1995; Peacock *et al.*, 1998), notocorda de peixe-bruxa (Anno *et al.*, 1971) e ouriço-do-mar (Vilela-Silva *et al.*, 2001) são compostos de repetidas unidades dissacarídicas com um alto teor de IdoA (mais de 80%) e o DS tendo atividades anticoagulantes e de neurite (Hikino *et al.*, 2003). Em contraste, DS isolado de cavalo de aorta (Fransson e Havsmark 1970), cérebro de porco embrionário (Bao *et al.*, 2005), cérebro de rato (Bao *et al.*, 2005), pele de rato (Maccarana *et al.*, 2009) e HEK293 células (Laremore *et al.*, 2010) que têm um baixo teor de IdoA, e podem se associar com fatores de crescimento, como pleiotrofina e midkine. Estas diferenças no conteúdo de IdoA das cadeias de DS são atribuíveis aos níveis de epimerases de DS (DS-epi1 e -epi2) no aparelho de Golgi das células (Malmstrom *et al.*, 2012; Karamanou *et al.*, 2017).

Uma interação de ligação do DS particularmente bem estudada ocorre com o cofactor de heparina II (HCII). Este homólogo de serpin de antitrombina III atua inibindo o efeito procoagulativo da trombina (Kozlowski *et al.*, 2011). Este efeito é aumentado em 1000 vezes na presença de DS, que são caracterizados pelas

unidades dissacarídicas dissulfatadas predominantes de iB e mostraram exercer forte atividade anticoagulante (Pavão *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 2005).

De fato, a atividade antiinflamatória está entre as propriedades mais amplamente estudadas de glicosaminoglicanos de DS (Volpi 2010; Ben Mansour *et al.*, 2010; Krichen *et al.*, 2017a). Além disso, a cadeia de DS sulfatada de fontes marinhas possui outras atividades farmacológicas importantes, como antivirais, antiproliferativas, reparo tecidual e atividades antitumorais (Rani *et al.*, 2017; Krichen *et al.*, 2016; Krichen *et al.*, 2017b). Estas funções são atribuídas à importância do tamanho molecular e algumas características estruturais necessárias para atividades biológicas, especialmente aglomerados de sulfato para assegurar interações com proteínas catiônicas (Mulloy 2005, Trowbridge *et al.*, 2002; Pomin 2015; Krichen *et al.*, 2018).

Portanto, vários polissacarídeos de base marinha foram avaliados quanto à sua atividade antiinflamatória (Cumashi *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2009), pois eliminam os desafios e riscos associados a moléculas provenientes de mamíferos (Klajnert *et al.*, 2006).

O DS de mamíferos tem sido sugerido como uma alternativa potencial à heparina, uma vez que exibe menor atividade anticoagulante do que a heparina e, portanto, seu uso apresenta menor risco de hemorragia (Fernandez, 1986).

DS com uma variedade de graus e padrões de sulfatação foram identificados no passado em Ascídias, mas alguns desses polissacarídeos mostraram também ter atividades anticoagulantes (Pavão *et al.*, 1995; Pavão *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2016).

As funções relatadas de cadeias cerebrais de DS na neuritogênese são controversas. Os DS atuam como moléculas neuritogênicas e modulam a regeneração axonal (inibição ou estimulação) do crescimento no SNC lesado. Essas funções aparentemente contraditórias são provavelmente atribuídas à diversidade estrutural das cadeias de DS (Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

Os DS parecem modular o desenvolvimento da polaridade neuronal *in vitro*, favorecendo o crescimento de axônios ou dendritos dos neurônios mesencefálicos

(Lafont *et al.*, 1992). No cérebro adulto, o DS está presente em pequenas quantidades. Essas mudanças na composição foram postuladas para influenciar eventos de desenvolvimento, tais como o alongamento axonal (Walicke 1988; Sugahara 2003; Li *et al.*, 2013).

Devido ao papel importante da DS no SNC, a investigação dos mecanismos moleculares nos quais esta molécula está envolvida, pode levar ao desenvolvimento futuro da terapêutica em muitas doenças neurodegenerativas.

2.7.2. Distribuição do DS no sistema nervoso

O DS desempenha um papel crucial em vários eventos biológicos, tais como: desenvolvimento do SNC (Sugahara e Mikami, 2007), cicatrização de feridas (Penc *et al.*, 1998; Trowbridge *et al.*, 2002), sinalização do fator de crescimento (Nandini e Sugahara, 2006; Yamada e Sugahara 2008), e proliferação de um progenitor de células-tronco neurais (Von Holst *et al.*, 2006). Entre esses eventos, o envolvimento da DS no desenvolvimento do SNC tem atraído a atenção do ponto de vista terapêutico para a potencial aplicação da DS à regeneração nervosa (Kerever *et al.*, 2015). Vários estudos mostraram que o padrão de sulfatação da DS no cérebro altera durante o desenvolvimento, caracterizado por um aumento na 4-O-sulfatação e uma diminuição na 6-O-sulfatação (Kitagawa *et al.*, 1997; Akita *et al.*, 2008). Bartley *et al.*, 2005, Pevny e Nicolis, 2009). Além disso, tanto o aumento dos dissacarídeos de 6-O-sulfatação quanto a presença de IdoA têm se mostrado fatores cruciais para a atividade promotora de crescimento de neuritos (Nadanaka *et al.*, 1998; Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2005). Este tipo de DS é encontrado em grandes quantidades durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, sintetizado por neurônios e células gliais (oligodendrócitos, astrócitos e microgliócitos) e é crucial para o seu desenvolvimento bem como para sua homeostase (Dietrich 1983, Esko 1991, Rowlands *et al.*, 2013).

A importância do DS no desenvolvimento do SNC foi melhor elucidada com os resultados de uma análise de camundongos deficientes em DS-epi2 (Ida *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2011). Intrigantemente, a perda de epimerase C5 usando o modelo de camundongo deficiente em DS-epi2 apresenta principalmente um fenótipo cerebral

normal, mas mostrou uma redução drástica nos níveis de IdoA em comparação com os camundongos do tipo selvagem. Análises posteriores revelaram uma diminuição significativa no 4-O-sulfato e um aumento na expressão do 6-O-sulfato (Verna *et al.*, 1989; Akyuz *et al.*, 2013; Kadomatsu e Sakamoto, 2014). O fenótipo normal aparente do cérebro que foi observado nos animais adultos com deficiência de DS-epi2 sugere um possível mecanismo compensatório, possivelmente através da expressão de DS-epi1. Esses resultados suportam a hipótese de que existem redundâncias funcionais no papel da DS na MEC (Bartolini *et al.*, 2012).

A maquinaria bioenzimática de DS é cuidadosamente regulada durante o desenvolvimento do cérebro, resultando em uma grande variação de estruturas contendo IdoA. A proporção encontrada de unidades iE foi pequena comparada com a de unidades iB ou iD de DS nas regiões do cérebro pós-natal. No entanto, diferentemente no cerebelo, a iD diminui e a iB aumenta no cérebro do recém-nascido para a idade adulta (Basappa *et al.*, 2009; Akatsu *et al.*, 2011), mas na estrutura adulta do cérebro ainda é observada no córtex, tálamo, cerebelo e proeminente no hipocampo, região de neuritogênese constante (Bao *et al.*, 2006; Mitsunaga *et al.*, 2006; Akatsu *et al.*, 2011).

Um aumento de 10 vezes na proporção de iB ocorre durante o desenvolvimento e, em contraste, iD e iE diminuíram para 50 e 30%, respectivamente, no cerebelo em desenvolvimento. Estes resultados sugerem que as unidades iA e iB contendo IdoUA, juntamente com as unidades iD e iE no DS, desempenham papéis importantes na formação da rede neural cerebelar durante o desenvolvimento cerebral pós-natal (Galtrey e Fawcett, 2007; Carulli *et al.*, 2010).

Portanto, cadeias de DS funcionais podem estar distribuídas no parênquima cerebral, onde a rede neural se forma durante o desenvolvimento. No entanto, a distribuição espaço-temporal de tais estruturas de DS contendo IdoUA no cérebro permanece em grande parte desconhecida devido a dificuldades analíticas (Mitsunaga *et al.*, 2006).

2.7.3. Envolvimento do dermatam sulfato na neuritogênese

A neurogênese é um evento precoce no desenvolvimento neuronal no qual os neurônios recém-nascidos formam primeiro os cones de crescimento, como um pré-requisito para a formação de axônios e dendritos. Os cones de crescimento emergem das regiões segmentadas do lamelipódio dos neurônios embrionários e se afastam do corpo celular deixando para trás um neurito que eventualmente se polarizará em um axônio ou dendrito (Dityate *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2011). Os cones de crescimento também funcionam para navegar rotas precisas através do embrião para localizar um parceiro sináptico apropriado (Gordon-Weeks, 2017). Interações dinâmicas entre dois componentes do citoesqueleto neuronal, filamentos de actina e microtúbulos, são conhecidas por serem essenciais para a formação do cone de crescimento e, conseqüentemente, para a neuritogênese (Figura 6). Os mecanismos moleculares que coordenam as interações entre os filamentos de actina e os microtúbulos dinâmicos durante a neuritogênese estão começando a ser compreendidos (Coles e Bradke 2015; Miyata e Kitagawa 2017).

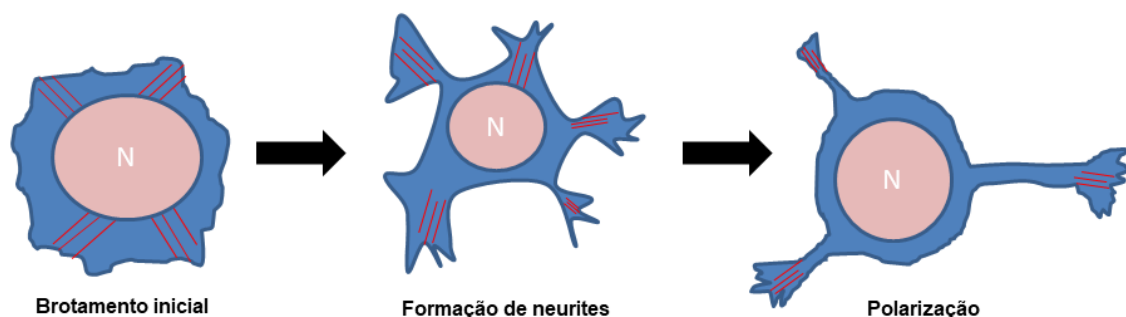


Figura 6 - Representação esquemática da sucessão de etapas que levam da formação do neurito. Rede de filamentos de actina dendrítica (azul) e filopódios radiais contendo filamentos de actina agrupados (vermelho). N = núcleo.

Embora a capacidade regenerativa do SNC seja limitada na idade adulta, o SNC é uma fonte rica e complexa de DS, inclusive durante o desenvolvimento e sob condições patológicas (Perosa *et al.*, 2002; Purushothaman *et al.*, 2012). A heterogeneidade da estrutura do DS pode ser promissora como reguladores de

proteínas bioativas interagindo com moléculas solúveis e associadas a membranas (Valcarcel *et al.*, 2017). O potencial observado da DS em promover a neuritogênese *in vitro*, utilizando culturas primárias de neurônios ou linhagem celular como modelos (Tabela 1), é importante não apenas para mostrar seu papel nos estudos mecanísticos sobre a DS no processo natural de desenvolvimento do SNC ou papel nas doenças neurais, mas também dão suporte para estimular futuros estudos com o objetivo de testar diretamente o efeito terapêutico da DS em delineamentos experimentais usando modelos animais de lesões neurais. Assim, seria possível avaliar o real efeito benéfico do DS no mecanismos reparo do SNC, o que poderia ser de grande interesse para a medicina regenerativa (Volpi e Maccari 2009; Li *et al.*, 2013; Anthony e James 2018).

Tabela 1 - Proteoglicanos de dermatam sulfato no cérebro.

TIPO DE CADEIAS DE GAG	TIMING	REGIÃO	CORPO DE CÉLULA NEURONAL	FENÓTIPO KNOCKOUT	REF.
unidades iD	Neurônios do hipocampo do rato E16	<i>Ascidia P. nigra</i>	Soma	Crescimento de neuritos	Hikino <i>et al.</i> , 2003
unidades iD	Neurônios do hipocampo do rato embrionário	Cérebro de porco embrionário	Soma	Fator de crescimento	Bao <i>et al.</i> , 2005
unidades iD	Neurônios do hipocampo do rato E16	Pele de tubarão	Soma	Atividade neuritogênica	Nandini <i>et al.</i> , 2005
unidades iD	Neurônios mesencefálicos de rato E14 e neurônios do hipocampo de rato E18	cérebro de rato pós-natal	Soma	Crescimento de neuritos	Faissner <i>et al.</i> , 1994

unidades iD	Neurônios mesencefálicos pós-mitóticos de ratos E14	Mucosa bovina	Soma	Crescimento de neuritos	Lafont <i>et al.</i> , 1992
unidades iE	Neurônios do hipocampo de rato E16	Ouriço do mar embrionário	Soma	Crescimento de neuritos	Hikino <i>et al.</i> , 2003
unidades iB	Neurônios do hipocampo de rato E16	<i>Ascidia S. plicata</i>	Soma	Crescimento de neuritos	Hikino <i>et al.</i> , 2003
unidades iB	Neurônios do hipocampo de rato E16	Pele de porco	Soma	Crescimento de neuritos	Hikino <i>et al.</i> , 2003
unidades iE	Neurônios do hipocampo de rato E16	Notocorda de Lampreia	Soma	Crescimento de neuritos	Hikino <i>et al.</i> , 2003
CS-DS	Neurônios do hipocampo de rato E16	<i>Isurus, oxyrinchus e Prionace glauca</i>	Soma	Crescimento de neuritos	Higashi <i>et al.</i> , 2015
CS-DS	Neurônios do hipocampo de rato E18	Notocorda de Lampreia	Soma	Crescimento de neuritos	Nandini <i>et al.</i> , 2004
DS	Camundongos deficientes em Chst14	-	Axon	Crescimento axonal	Akyüz <i>et al.</i> , 2013
DS	Peixe-zebra deficiente em Chst14	-	Axon	Crescimento axonal	Sahu <i>et al.</i> , 2019

Muitos animais marinhos mostraram grandes quantidades de DS com uma estrutura diferente. Por exemplo, a estrutura iE é um dissacarídeo importante encontrado na DS de notocorda de peixe-bruxa (68%) e ouriço-do-mar embrionário (74%), enquanto uma unidade significativa de iD é encontrada na *Ascidia P. nigra* (>

90%) (Pavão *et al.*, 1995; 2014). Curiosamente, uma alta quantidade de dissacarídeo iB também é encontrada na ascídia *Styela plicata* (66%). Além disso, já foi descrito DS obtido das espécies de elasmobrânquios *Isurus oxyrinchus* e *Prionace glauca* que contém níveis de dissacarídeos IdoA e unidade iB, iC e iD (Higashi *et al.*, 2015). Essas diferentes estruturas de DS foram utilizadas para melhor compreender a atividade da neuritogênese e a função da DS no cérebro, e todas mostraram essa atividade, mas com alguma peculiaridade (Tabela 1).

A atividade neurogênica foi observada usando DS da ascídia *S.plicata*, que contém pequena proporção (5%) de unidades de iD com peixe-bruxa (lampreia) que compreende (68%) (Hikino *et al.*, 2003). Entretanto, em uma comparação entre DS de *S. plicata* e *P. nigra*, foi observada uma atividade promotora de crescimento de neuritos significativa usando *P. nigra*, que resultou em características morfológicas específicas. O DS de *P. nigra* que contém uma grande quantidade de estrutura iD (60%), induziu a soma de células neuronais achatadas e neurites mistas semelhantes a dendritos. Por outro lado, o DS de *S. plicata* exibiu apenas uma modesta atividade promotora de crescimento de neuritos (Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2005; Pavão, 2014).

O ouriço-do-mar embrionário, que possui 74% da unidade iE de DS, induziu os prolongamentos de neuritos mais longos na cultura neuronal do hipocampo em comparação com os DS das ascídias. No entanto, os efeitos sobre a área de soma e número de neurites/células primárias foram melhor observados pelo DS de *P. nigra* (Tabela 1; Hikino *et al.*, 2003).

Muitos estudos sugerem que o DS é responsável pelo efeito sobre os neurônios e este aspecto parece ser dependente da interação do DS com um fenótipo particular de neurônio. Múltiplas unidades de DS exibiram a promoção do crescimento de neuritos de natureza axônica e dendrítica nos cérebros embrionários cultivados (Lafont *et al.*, 1992; Faissner *et al.*, 1994; Nandini *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 2011).

No SNC, sabe-se que o DS interage com fatores de crescimento e fatores neurotróficos no processo neural, orientação axonal e crescimento de neuritos (Sugahara e Mikami, 2007), promovendo o crescimento axônico (Bradbury *et al.*, 2002), migração neural e neuritogênese (Sugahara *et al.*, 2003), aparentemente

regulando a diferenciação e proliferação de células neuronais. Nesse processo, os padrões de sulfatação das cadeias de DS parecem influenciar diretamente a ligação das proteínas ativas (Yamada e Sugahara, 2008; Berezin *et al.*, 2016).

Tem sido relatado que dermatam 4-O-sulfotransferase 1 (Chst14 *-/-*), uma enzima chave na síntese de IdoA encontrados no DS, mas não condroitina 4-O-sulfotransferase-1 (Chst11) específico para CS, regula a proliferação e neurogênese de células-tronco neurais (NSCs), indicando que CS e DS desempenham papéis distintos no self -renovialização e diferenciação de NSCs (Akyüz *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Dados da Organização Mundial da Saúde (Who, 2011) prevê que, embora hoje a população mundial com mais de 65 anos seja estimada em 8,5%, esse número chegará a 17% em 2050. Nesse contexto, a solução de doenças neurodegenerativas atuais associadas principalmente ao envelhecimento se tornam mais premente do que nunca (He *et al.*, 2016). Em 2017, comemoramos um sombrio 200º aniversário desde a primeira descrição da doença de Parkinson (DP) e sua sintomatologia relacionada. Dois séculos depois que essa doença debilitante foi identificada pela primeira vez, encontrar uma cura continua sendo uma meta esperançosa, e não um objetivo atingível no horizonte (Rizzie e Tan, 2017).

As terapias atualmente disponíveis para a DP não conseguem impedir a progressão da doença. As opções de tratamento hoje utilizadas na clínica são capazes de controlar os sintomas motores através do aumento dos níveis de dopamina no cérebro ou imitando os efeitos da dopamina (Singh *et al.*, 2007). A terapia mais utilizada é com a levedopa, sendo altamente efetiva durante os primeiros estágios do tratamento, no entanto, com o tratamento prolongado, os pacientes tendem a desenvolver complicações motoras levando a discinesia (Nagatsu *et al.*, 2009). Outra opção terapêutica que está sendo muito investigada seria os agentes neuroprotetores, cuja importância está nas suas propriedades antioxidantes, estes poderiam ser capazes de mudar o curso da doença, barrando a neurodegeneração. Muitos agentes potencialmente neuroprotetores tem sido identificado e requerem testes clínicos (Hart *et al.*, 2009).

Entendemos que este estudo se justifica pela possibilidade de compreensão das alterações neuroquímicas (viabilidade celular) induzidos por modelo de lesão neurológica química pela administração *in vitro* da rotenona em cultura de células de neuroblastoma murino NEURO-2A, que é um importante modelo das patologias neurológicas. O presente estudo também se propõe a avaliar a efetividade neuroprotetora e antioxidante do tratamento com o DS de *P. nigra*, contribuindo assim para pesquisas na área de investigação pré-clínica de doenças neurodegenerativas, possibilitando a maior compreensão entre a associação de respostas regenerativas e protetivas com mecanismos celulares envolvidos nesse processo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar o papel neuroprotetor e antioxidante do DS isolado da ascídias da espécie *P. nigra* em cultura de células de neuroblastoma murino NEURO-2A, após lesão química pelo pesticida rotenona.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração, purificação e identificação do DS de *P. nigra*;
- Avaliação da atividade mitocondrial das células da linhagem de neuroblastoma NEURO-2A após incubação com a rotenona e com o DS de *P. nigra*;
- Análise morfológicas e da viabilidade celular das células NEURO-2A após incubação com rotenona e DS de *P. nigra*;
- Análise ultraestrutural das células NEURO-2A após incubação com a rotenona e DS de *P. nigra*;
- Análise da produção de espécies reativas de oxigênio das células NEURO-2A após incubação com a rotenona e o DS de *P. nigra*;
- Análise do sistema antioxidante das células NEURO-2A após incubação com a rotenona e o DS de *P. nigra*;
- Análise do dano celular, através da peroxidação lipídica.

5. METODOLOGIA

5.1. COLETA DAS ASCÍDIAS

Espécies adultas da ascídia *P. nigra*, foram coletadas no Porto do Forno, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. A coleta de ascídias foi aprovada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), nº. 60330-1.

5.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DERMATAM SULFATO

As vísceras das ascídias *P. nigra* foram retiradas e deslipidadas em acetona a 4 °C, por 24 h. Em seguida, o conteúdo foi levado a estufa (60°C) até que toda acetona se evapore e obtivessemos o peso seco, denominado pó cetônico. Depois, para extração proteolítica, foi adicionado papaína na proporção de 10% do peso do pó cetônico obtido, e tampão digestão pH 5,5 (0,1 M acetato de sódio, 5mM de EDTA, e 5mM de cisteína) utilizando o volume de 10 vezes o peso do pó cetônico. Em seguida as amostras foram levadas para banho-maria a 60°C por 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram centrifugados a 9000 rpm por 10min e foi retirado e separado o sobrenadante. O precipitado foi submetido à nova incubação com papaína, sob as mesmas condições descritas anteriormente por mais duas vezes.

Ao sobrenadante que continham, os polissacarídeos foram adicionados uma solução de cloreto de cetilpiridina (concentração final 0,5%), seguido de 2 volumes de etanol 95%, e mantido a 4°C por 24h para a precipitação. Após, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com CPC 0,05% por 7x, e ao pellet foi adicionado solução de 2,0M NaCl e etanol absoluto (100:15, v/v). Nessa amostra, ainda foram adicionados dois volumes de etanol absoluto. Depois, ela foi deixada em repouso por 24h a 4°C. Seguiu-se centrifugação, descarte do sobrenadante e lavagem do pellet duas vezes com etanol 80%. Seguiu-se nova centrifugação e secagem do pellet por 24h. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em água deionizada e adicionado quantidades crescentes de etanol absoluto, (50% v/v, 75% v/v e 100% v/v) e levadas a 4°C por 1 dia para completa precipitação dos GAGs. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante com etanol foi descartado obtendo-se as frações

de GAGs. As frações foram dialisadas extensivamente contra água deionizada durante 24 h e posteriormente liofilizadas (Labconco FreeZone 4.5L) para a secagem do resíduo a 5 °C sobre P205 no vácuo (Figura 7).

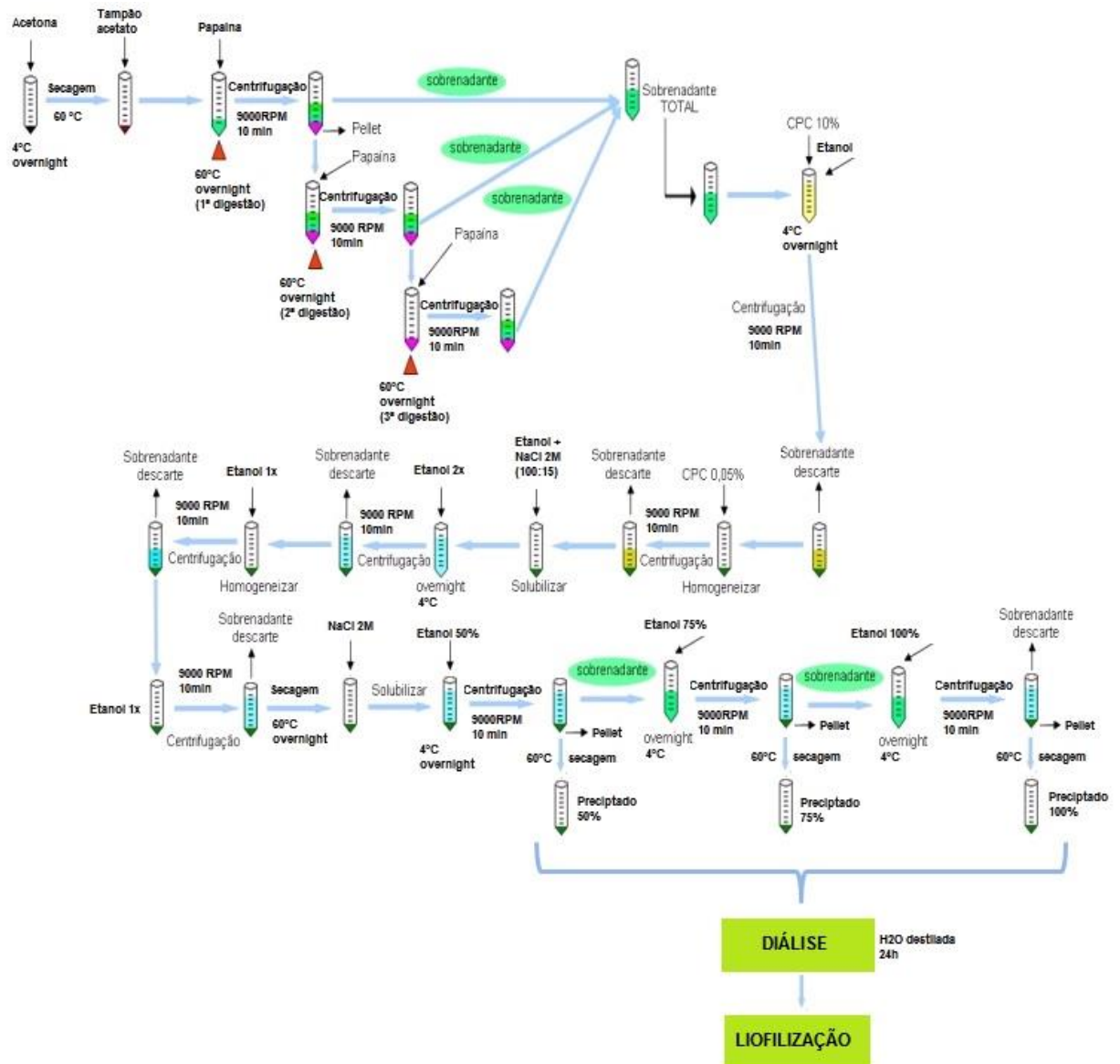


Figura 7 - Esquema de extração e purificação dos GAGs

5.3. DOSAGEM DE ÁCIDO HEXURÔNICO (MÉTODO DE CARBAZOL)

Os GAGs totais das amostras de *P. nigra* após o processo de extração foram quantificados pela dosagem de ácido hexurônico, utilizando a técnica de reação com carbazol (Dische, 1946). Esse método baseia-se no desenvolvimento de cor pela

ação de compostos orgânicos como o reagente Carbazol. A dosagem de ácido hexurônico foi realizada com 10µL de amostra, aos quais se adicionou 190µL água deionizada e 1,0mL de ácido sulfúrico com borato (tetraborato de sódio 0,4%). Depois disso, a amostra foi aquecida por 10min a 100°C e resfriada à banho de gelo e adicionou-se 40µL de carbazol (0,1% em etanol). Logo depois, ela foi aquecida novamente por 12min a 100°C e resfriada à banho de gelo. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) em comprimento de onda à 525nm. A concentração do GAG foi determinada por meio de uma curva-padrão de glicuronolactona (0,5mg/mL) (Swann 1968).

5.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a identificação do DS dentre os demais GAGs obtidos durante o processo de extração foi realizado a eletroforese em gel de agarose com as amostras intactas e previamente incubadas com enzimas ou realizado tratamento químico utilizadas para identificação dos GAGs.

Assim para identificar o CS e o DS foi usado o tratamento enzimático com condroitinase AC (Sigma-C2262) e ABC (Sigma-C3667) e para identificar o HS foi feito tratamento químico com ácido nitroso.

A enzima Condroitinase ABC catalisa a degradação eliminativa de polissacarídeos contendo as ligações 1,4-β-D-hexosaminil e 1,3-β-D-glucuronosil ou ligações 1,3-α-L-iduronosil de dissacarídeos que contenham o grupo 4-deoxi-β-Dgluc-4-enuronosil. Sendo assim, atua sobre o C4S, C6S e DS.

Para a reação de deaminação a solução a ser utilizada foi de ácido nitroso preparado na proporção de 1:1 v/v de ácido Sulfúrico 0,5M e nitrito de sódio 1M. O ácido nitroso faz uma clivagem deaminativa que causa a despolimerização das cadeias de heparina e HS (Norgard-Sumnicht e Varki,1995). Dessa maneira a clivagem ocorre entre uma galactosamina N-sulfatada e uma galactosamina N acetilada, e/ou entre uma galactosamina N-sulfatada e um ácido idurônico. Como esta é uma reação deaminativa, a clivagem independe da presença das sulfatações

fazendo com que esta seja específica para heparina e HS, não agindo sobre CS e DS (Shively e Conrad 1976).

As amostras obtidas foram ressuspensas em água deionizada e foram incubados com condroitinase ABC ou condroitinase AC (em tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0, contendo 5mM de EDTA e 15mM de acetato de sódio) e incubadas a 37°C overnight, ou incubadas em solução de ácido nitroso à temperatura ambiente por 90 minutos. Após período de incubação as amostras foram aplicadas (~15ug) em 0,8% de gel de agarose, em seguida, foi realizada a eletroforese (BioRad/ Power PacTM Basic 041BR93482). Uma mistura de GAGs padrão, contendo CS e Hep foram aplicadas em um gel por 1h a 100mV. Após a eletroforese, os GAGs foram fixados no gel com uma solução aquosa de brometo de cetilmetilamônio 0,1% (CETAVLON) e corados com 0,1% azul de toluidina em solução de ácido acético: etanol: água (0,1:5:5, v/v/v).

5.5. LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Utilizamos neste estudo a linhagem celular NEURO-2A (ATCC; Richmond, VA, USA) que é um clone derivado de neuroblastoma espontâneo de camundongo (Klebe e Ruddle, 1969), gentilmente cedida pela professora Dr^a Célia Yelimar Palmero Quintana da UFRJ-Macaé. Essas células produzem grandes quantidades de proteínas microtubulares, que participam do fluxo axoplasmático e da enzima de degradação da acetilcolina e a acetilcolinesterase (Jordan *et al.*, 2005). Essa linhagem tem sido muito utilizada como modelo neuronal *in vitro* em estudos com diversos agentes indutores de toxicidade e de morte celular, inclusive os gerados pelo estresse oxidativo (Calderón *et al.*, 1999).

As células foram cultivadas em meio Dulbecco MEM-F12 (DMEM/F12; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 U.I./mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 10% de SFB, 2 mM de glutamina e 5,6 mM de glicose, em uma incubadora com atmosfera umidificada à 37 °C de 5% de CO₂ por 2 dias antes dos tratamentos.

5.6. DESENHO EXPERIMENTAL

Primeiramente as células foram mantidas em cultura por três dias para que houvesse adesão, recuperação do procedimento de isolamento e reorganização parcial das células. Após três dias em cultura, boa parte das células mortas e/ou não aderidas foi removida por lavagem suave das garrafas de cultura com PBS. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes ($n = 3$) e em triplicata por grupo estudado, e para tais os respectivos grupos foram estabelecidos: I) Controle; II) controle do solvente empregado, DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma- M81802); III) Rotenona; IV) DS de *P. nigra*; V) Rotenona + DS de *P. nigra*. A exposição das células de NEURO-2A foi realizada através da substituição do meio de cultura por novo meio contendo as mesmas suplementações durante 72 horas em placas de 3,5 cm de diâmetro. A densidade das células NEURO-2A de 10×10^4 células por poço, em meio DMEM/F12 suplementado com 10 U.I./ml de penicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 10% de SFB, 2 mM de glutamina e 5,6 mM de glicose.

Grupo I: Controle;

Grupo II: Controle (somente DMSO);

Grupo III – Rotenona: As células NEURO-2A foram incubadas com rotenona na concentração de 0,12, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 μM , a fim de encontrar o EC_{50} .

Grupo IV – DS de *P. nigra*: As células de NEURO-2A foram incubadas com DS de *P. nigra* na concentração de 0,75, 1,5, 3,0, 6,0 e 12,0 nM, a fim de encontrar o EC_{50} .

Grupo V – Rotenona + DS de *P. nigra*: As células NEURO-2A foram incubadas com o valor de EC_{50} encontrado para a rotenona e para a melhor dose resposta do DS de *P. nigra*, respectivamente.

5.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O potencial danoso da rotenona e neuroprotetor do DS de *P. nigra* foi avaliado através de microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difenil brometo de tetrazólio;Sigma-M2128). É um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (Liu *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1994), este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Mosmann 1983). As células foram mantidas em estufa à 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada por 72h. Em seguida, foram adicionados em cada poço 10µL de MTT (5 mg/mL) para cada 100µL de cultivo. As placas foram mantidas em estufa por mais 2 horas para a metabolização do MTT. Após esse período o sobrenadante foi retirado de cada poço e depois adicionados 200µL de DMSO, homogeneizando bem para permitir a solubilização dos cristais de formazana. A leitura dos valores da absorbância da placa de 96 poços foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) em comprimento de onda à 570nm. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes (n = 3) e em em triplicata por grupo estudado.

Como controles negativos as células foram incubadas com o meio de cultura e com meio e DMSO, na mesma concentração em que o composto foi diluído na solução estoque.

5.8. AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS POR MICROSCOPIA DE LUZ

A morfologia celular foi analisada por microscopia de luz em objetiva de contraste de fase, onde foram observadas a presença dos prolongamentos neuríticos, corpos apoptóticos e o formato celular, após os diferentes tratamentos correspondentes aos grupos experimentais. Na sequência foi realizada a captura de imagem com câmera digital acoplada a microscópio invertido (Leica-CTR4000) com aumento de até 400x. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes (n = 3) e em em triplicata por grupo estudado.

5.9. QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO DE NEURITOS

Após tratamento por 72h com DS de *P. nigra* e rotenona, quatro imagens de contraste de fase das células com ampliação de 200x foram obtidas aleatoriamente de cada poço. Os comprimentos dos neuritos foram medidos usando o software NIH ImageJ, versão 1.47t. O número de neuritos emergentes do soma e a soma de todas as medições de neuritos por neurônio por imagem foram analisados. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes (n = 3) e em triplicata por grupo estudado.

5.10. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR

Para a visualização de características apoptóticas nas células, três corantes fluorescentes foram empregados: o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) fluoróforo marcador de viabilidade celular, pois ao se ligar a dupla fita de DNA nos permite inferir sobre a sobrevivência da célula (Kapuscinski, 1995); iodeto de propídeo (IP) que penetra células com membrana celular rompida (Rosenberg *et al.*, 2019) e diacetato de fluoresceína (DAF) que é absorvido pelas células, que convertem o DAF não fluorescente no metabolito verde fluorescente. O sinal medido serve como indicador para células viáveis, pois a conversão é dependente de esterase (Boyd *et al.*, 2008). Todos os corantes foram adquiridos da Sigma (DAPI- D9542, IP- P4170 e DAF-F7378, respectivamente).

As células tratadas foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada por 72h e foram incubadas em meio DMEM/F12 com, IP (12 µg/mL) e DAF (6 µg/mL) por 30 minutos à 37° C. E para marcação de DAPI as células foram previamente fixadas com PFA 4% por 15 min e coradas com DAPI (10000 µg/mL) por 3min.

Para visualização das células foi utilizado microscópio de fluorescência invertido (Leica-CTR4000) equipado com filtro triplo para DAPI, FITC e Rodamina e analisados 4 campos aleatórios por poço sendo discriminadas as células normais,

apoptóticas e necróticas que apresentaram coloração diferenciada. Imagens de fluorescência das células com ampliação de 200x foram obtidas aleatoriamente de cada poço. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes (n = 3) e em triplicata por grupo estudado.

5.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliação da ultraestrutura celular, as células NEURO-2A foram plaqueadas em volume de 0,5 mL/poço (10×10^4 cels/mL) em placas de cultivo celular de 24 poços. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL/poço da rotenona e/ou DS de *P. nigra* nas concentrações finais de 1,0 μ M e 1,5 nM respectivamente, incubadas por 72h em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Após o período de incubação dos grupos experimentais, as células lavadas 2x com Tampão fosfato Salino (PBS, pH 7,2). O sobrenadante foi desprezado e as células foram fixadas por 15 minutos a 25°C com 2,5% glutaraldeído em 0,1M tampão cacodilato de sódio pH 7,2. Após a fixação as células foram lavadas 2x no mesmo tampão, durante 5 minutos cada etapa. Em seguida as células foram, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% 20 min a 25°C e lavadas 3x com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de álcool: 30%, 50%, 70%, 90% e a 100% 3x (durante 20 minutos cada etapa). As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico Bal-Tec CPD 030 *Critical Point Dryer*, montadas em *stubs*, pulverizadas com ouro (20 nm) no aparelho Sputter Coater DSC050 e observadas no Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, no Pavilhão Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

5.12. HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram colocadas em gelo, submetidas ao ultrassom por 2 min em gelo, após acréscimo do tampão de homogeneização (20 mM Tris base, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, KCl 150 mM e Sacarose 250 mM, pH 7,6). O Tris é um composto orgânico com fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, conhecido como tris(hidroximetil)aminometano, e utilizado como substância tamponante. O EDTA,

ácido etilenodiamino tetra-acético é um composto orgânico que age como agente quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, entre eles magnésio e cálcio, em valores de pH acima de 7, como é o caso do tampão utilizado neste trabalho. Este composto inibe assim a ação de proteases cálcio dependentes. DTT, ditioneitol, é um agente redutor que quebra pontes dissulfureto, entre aminoácidos como cisteína e metionina, reduzindo esta ligação. A sacarose tem a capacidade de precipitar proteínas e manter as condições ótimas de pH. Cloreto de potássio (KCl) é utilizado para promover o equilíbrio ácido-base na solução (Adler e Fraley 1977).

Após homogeneização das amostras dos grupos experimentais descritos acima as mesmas foram centrifugadas a 9.000 x g por 30 min a 4°C. Foi utilizada a proporção de 1:5 de amostra e tampão v/v; ou seja, o volume da amostra vezes 5 que então fornecia o volume de tampão a ser adicionado. Depois de homogeneizado e centrifugado, foi retirado o sobrenadante que foi dividido em cinco alíquotas para posterior análise de proteínas totais, superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), espécies reativas de oxigênio (EROs) e capacidade antioxidante total contra os radicais peroxil (ACAP).

5.13. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi necessária a quantificação de proteínas totais nas amostras. Durante os ensaios reservaram-se 100 µL das amostras para quantificação de proteínas. Em microplaca, adicionou-se 10 µL do sobrenadante das amostras (triplicatas) seguidos de 200 µL do reativo de Bradford ("Coomassie brilliant blue" BG-250) e procederam-se as leituras de absorbância à 595 nm. Como branco utilizou-se água deionizada adicionado de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com àqueles provenientes de curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg de BSA por mL de volume final de solução (Bradford, 1976). A curva-padrão e os grupos experimentais foram feitos em triplicata por concentração de BSA.

5.14. DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os níveis de EROs intracelulares foram analisados através do reagente H₂DCFDA (Sigma-D6883). Ao H₂DCFDA entrar na célula é clivado pelas enzimas esterases e, então, oxidado na presença de ERO gerando fluorocromo, que é detectado utilizando-se comprimentos de onda de 488 e 525 nm para a excitação e emissão, respectivamente. Para tanto, utilizamos alíquotas das células dos grupos experimentais recém-lisadas. Os reagentes utilizados foram tampão de reação, composto por 30M de ácido etanosulfônico 4.2-hidroxietil piperazina-1 (HEPES), 200mM de KCl, 1mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) dissolvidos em água deionizada com pH ajustado em 7,2. Ao momento da dosagem foi preparada uma solução estoque de 16µM de H₂DCFDA dissolvido em etanol 100%. Foi preparada também uma solução de 4mM de 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP; Sigma - 440914), dissolvido em água deionizada. Para o ensaio, em cada poço adicionou-se 127,5 µL de tampão de reação, 7,5 µL de extrato de células, 10 µL de água deionizada para as amostras sem ABAP ou 10 µL de solução de ABAP, por este ser um gerador de radicais peróxil. Imediatamente antes de iniciada as leituras de fluorescência foi colocado 1 µL de solução de H₂DCFDA. A seguir foi efetuada uma leitura imediata (leitura tempo zero) e logo a cada 5 minutos até completar 120 minutos em fluorímetro de placas (Victor 2, Perkin Elmer). As leituras foram realizadas à 37 °C para promover a geração de peroxi-radicais através da termólise do ABAP.

5.15. ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

5.15.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina, quando ocorre a oxidação da adrenalina, um adrenocromo é formado, e este é detectado pelo espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) à 480nm com tempo total de 2 minutos e intervalo de tempo de 30 segundos. Uma unidade de SOD equivale a quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de oxidação da adrenalina (Beauchamp e Fridovich, 1971). Os reagentes utilizados foram tampão de reação (carbonato de sódio 0,05M; EDTA anidro 0,04M; dissolvido em água deionizada, pH 10,2) e 0,3 M

de adrenalina (Epinefrina tratate – C₁₂H₁₉NO₉) diluída em água deionizada. Após a calibração do equipamento com 995µL tampão de reação e 5µL de adrenalina 0,3 M em uma cubeta de quartzo, foi acrescentado 985µL de tampão de reação, 10 µL de amostra, 5µL de adrenalina 0,3 M. Os experimentos foram feitos em triplicata de cada grupo experimental.

5.15.2. Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

Este método quantifica a capacidade que a célula após exposição com rotenona e DS de *P. nigra* terá em neutralizar as ERO geradas pela decomposição do ABAP (gerador de radicais peroxil), incluindo as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não enzimáticas, através do cálculo da área relativa. Os reagentes utilizados foram tampão de reação, composto por 30M de HEPES, 200mM de KCl, 1mM de MgCl₂ dissolvidos em água deionizada com pH ajustado em 7,2. Ao momento da dosagem foi preparada uma solução estoque de 16µM de H₂DCFDA dissolvido em etanol 100%. Foi preparada também uma solução de 4mM de ABAP, dissolvendo em de água deionizada. Para o ensaio, em cada poço adiciona-se 120 µL de tampão de reação, 15 µL de extrato de células, 10 µL de água deionizada para as amostras sem ABAP ou 10 µL de solução de ABAP, por este ser um gerador de radicais peroxil. Imediatamente antes de iniciada as leituras de fluorescência foi colocado 2 µL de solução de H₂DCFDA. A seguir foi efetuada uma leitura imediata (leitura tempo zero) e logo a cada 5 minutos até completar 120 minutos em fluorímetro de placas (Víctor 2, Perkin Elmer). As leituras foram realizadas a 37 °C para promover a geração de peroxi-radicaís através da termólise do ABAP (Amado *et al.*, 2009).

5.15.3. Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a 240 ng/mL absorvância de, representada por U/mg de proteína (Aebi, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão de reação (Tris base 1M, EDTA 5mM; 25°C; pH 8,0) preparada e titulada no dia da análise. Após a calibração do equipamento em uma

cubeta de quartzo, foram colocados 990µL da solução de H₂O₂ e 10 µL de amostra, a reação foi detectada pelo espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) à 240ng/mL com tempo total de 60 segundos e intervalo de tempo de 15 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.16. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method). Esse método tem por princípio a rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (Jiang *et al.*, 1991, 1992). As amostras foram colocadas em gelo, submetidas ao ultrassom por 2 min, após acréscimo de metanol PA (200 µL) e centrifugadas a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, 20 µL do sobrenadante da amostra mais 180 µL de meio de reação [(laranja de xilenol a 1 mM, H₂SO₄ a 0,25 M, FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) a 1mM (acrescentados na sequência descrita em metanol a 90%)] e água deionizada suficiente para obter 350µL de volume final foram adicionados em microplaca. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente em microplacas tampadas, para reduzir a evaporação do metanol, foi adicionado 1 mM hidroperóxido de cumeno (CHP, sigma), procedeu-se a medida de absorbância a 580 nm. O branco foi preparado pela substituição do extrato de células por água. e a absorbância lida à 580 nm. Os níveis de lipoperoxidação serão expressos em termos de equivalentes de hidroperóxido de cumeno de acordo com Monserrat *et al.*, (2003).

5.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados brutos foram coletados a partir de uma série de ensaios independentes. Dados que descrevem os efeitos neuroprotetores e antioxidantes do DS de *P. nigra* analisados por atividade mitocondrial, produção morfométrica, ROS e LPO, sistema antioxidante, foram aplicados a Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das distribuições. Posteriormente, os resultados dos grupos controlem e

experimental foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA seguido pelo teste pos-hoc Tukey de comparação múltipla. Os resultados são expressos como a média \pm erro, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$. As análises foram feitas com o uso do GraphPad Prism versão 7.00 da GraphPad Software, Inc.

6. RESULTADOS

6.1. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DS DE *P. nigra*

6.1.1. Extração e purificação dos GAGs totais

No total, foram realizadas três extrações (1, 2 e 3). Os rendimentos foram decrescentes no decorrer das extrações, totalizando 1,2% (1^a), 0,3% (2^a) e 0,2% (3^a) (Figura 8).

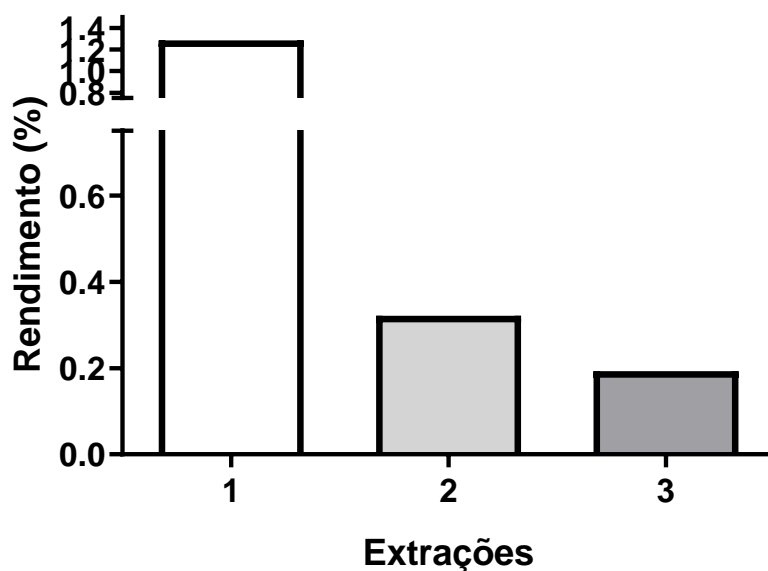


Figura 8 - Rendimentos por extração dos polissacarídeos totais obtidos nas extrações de GAG da ascídia *Phallusia nigra*.

A purificação dos polissacarídeos por precipitação seriada em etanol resultou na separação de três diferentes frações (50%, 75% e 100%) (Figura 9). A maior metacromasia foi obtida para a fração 75% da 1^a e 3^a extração.

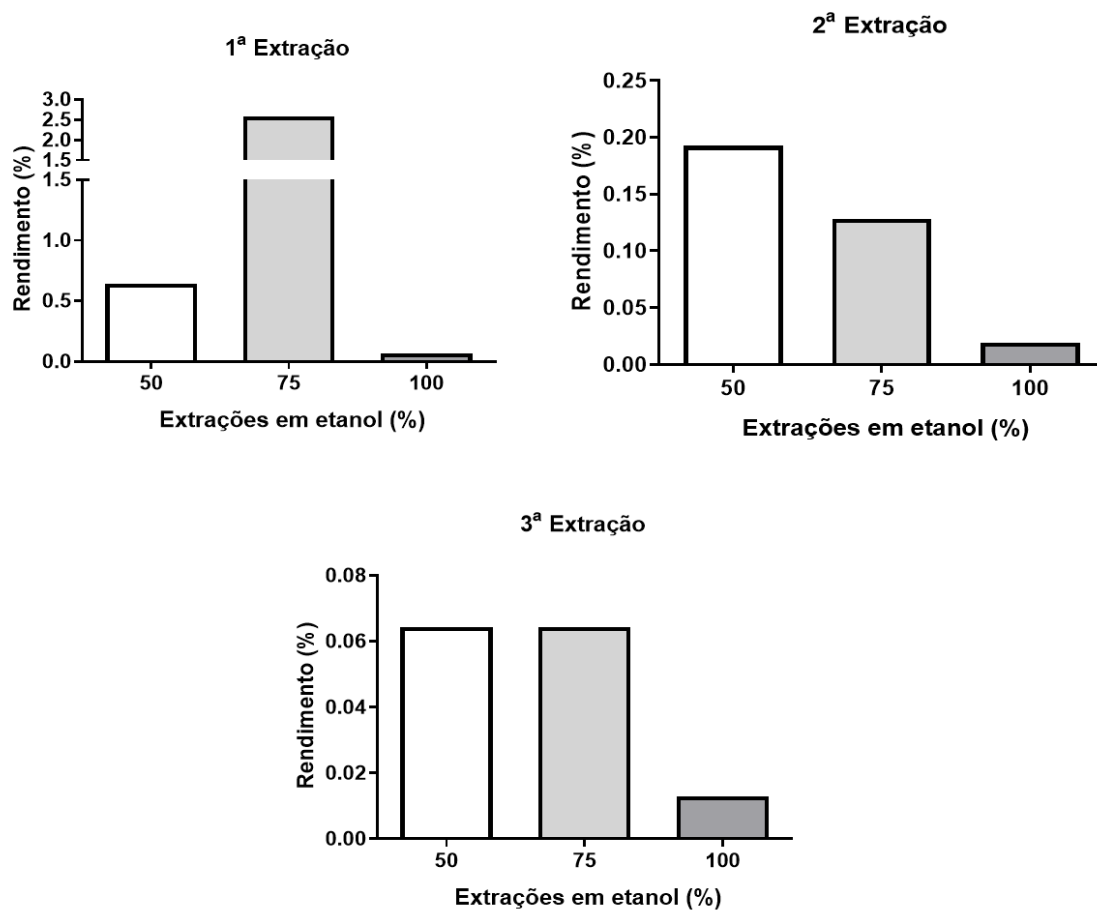


Figura 9 - Rendimentos por extração das frações de polissacarídeos totais precipitadas em etanol.

A utilização da enzima papaína durante o processo de extração e o CPC na etapa de precipitação dos polissacarídeos totais, presentes nas vísceras da *P. nigra* resultou em 2,711 mg. O maior rendimento (2,76%) foi obtido na fração de 75% quando comparada as demais frações obtidas (Tabela 2).

Tabela 2 - Detalhamento das frações obtidas.

Fração	Proteína total (ug)	GAG (μg)	Tecido seco (mg)	GAG/tecido seco ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Rendimento (%)
50%	0,00	159,77	15570	0,01	0,9
75%	0,00	758,45	15570	0,05	2,76
100%	0,00	1793,45	15570	0,12	0,1
Total	0,00	2711,67	15570	0,17	3,75

6.1.2. Análise Eletroforética

As frações de 50%, 75% e 100% foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%), como apresentados na Figura 10a. O procedimento eletroforético das frações de DS de *P. nigra* mostrou um perfil migratório similar ao padrão de DS.

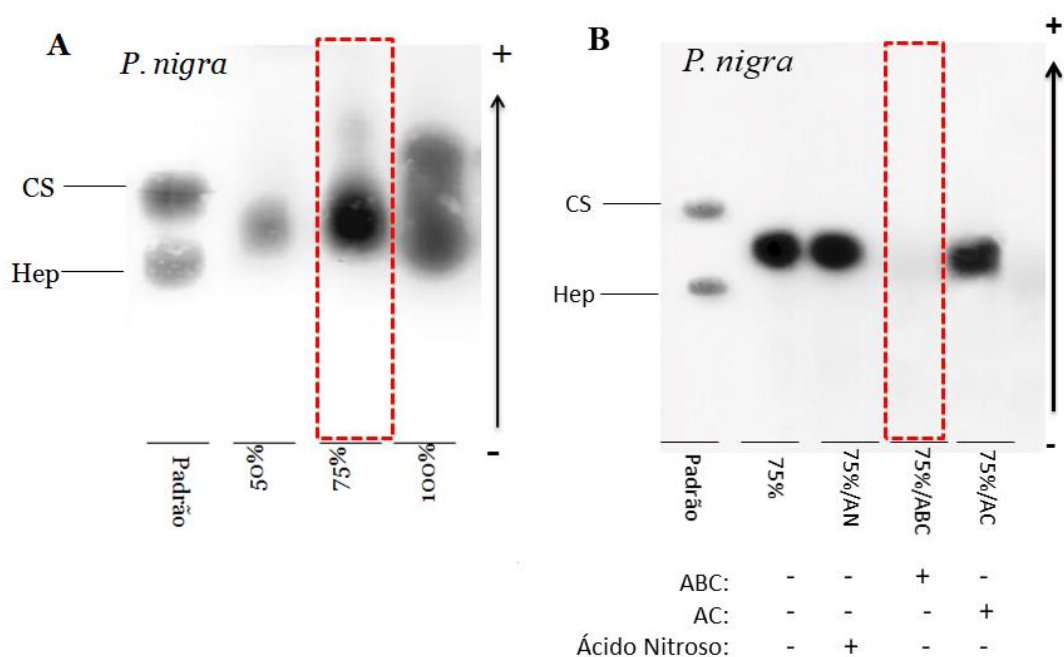


Figura 10 - Isolamento e caracterização de polissacarídeos totais de *P. nigra*. (B) Polissacarídeos extraídos antes (-) e após a incubação (+) com condroitinase AC ou ABC e tratamento com ácido nitroso. Tanto em (A) e (B) os polissacarídeos foram aplicados em um gel de agarose a 0,8% em 0,05 M de 1,3-diaminopropano / acetato (pH 9,0), fixados com 0,1% de solução de N-cetil-N, N, N-trimetilamônio após 12 h, e corado (após secagem) com 1% de azul de toluidina. Como padrão foi utilizada uma mistura de glicosaminoglicanos de mamífero de 4-sulfato de condroitina (CS) e heparina (Hep).

A fração de 75% revelou uma banda com intensa metacromasia quando comparada a banda de 50% e 100%, sugerindo, a estas, uma menor presença de grupos sulfatados na estrutura química desse polissacarídeo.

A fração de 75% foi submetida ao tratamento enzimático com condroitinase ABC, que cliva as cadeias de DS, com condroitinase AC que cliva as cadeias do CS e DS, e com o ácido nitroso que cliva Hep/HS por apresentar ligação glicosídica de glucosamina N-sulfatada.

Após os tratamentos, a amostra foi submetida à análise por eletroforese em gel de agarose. Uma banda metacromática que migra como DS, foi degradada pelo tratamento químico com a condroitinase ABC, mas não foi degradada pela

condroitinase AC nem pelo ácido nitroso, indicando a presença de DS purificado na fração (Figura 10b). O polímero DS foi previamente caracterizado por Pavão *et al.* 1995.

6.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT

Em uma etapa inicial as células foram expostas a concentração de 0,12-2,0 μM de rotenona e 0,75-12 nM de DS de *P. nigra*, e, após foram avaliadas quanto a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, após 72 horas. Nossos resultados com esses períodos de exposição à rotenona mostraram uma resposta dose-dependente quanto a atividade mitocondrial. O grupo rotenona apresentou EC_{50} de 1,0 μM após 72 horas de incubação, com diminuição significativa da viabilidade celular em 28%, quando comparado ao grupo controle (Figura 11a). Já para o grupo DS de *P. nigra* nossos resultados mostraram uma resposta dose-dependente na atividade mitocondrial. A melhor dose observada foi de EC_{50} de 1,5 nM que apresentou 45% de viabilidade em relação ao controle (Figura 11b).

Baseado nos resultados obtidos, definimos as concentrações para o grupo conjugado de rotenona e DS de *P. nigra*: as células foram incubadas com 1,0 μM de rotenona + 1,5 nM de DS de *P. nigra* por 72 horas e avaliadas quanto a atividade mitocondrial por MTT (Figura 11c). Houve diminuição da atividade mitocondrial quando comparada ao grupo controle.

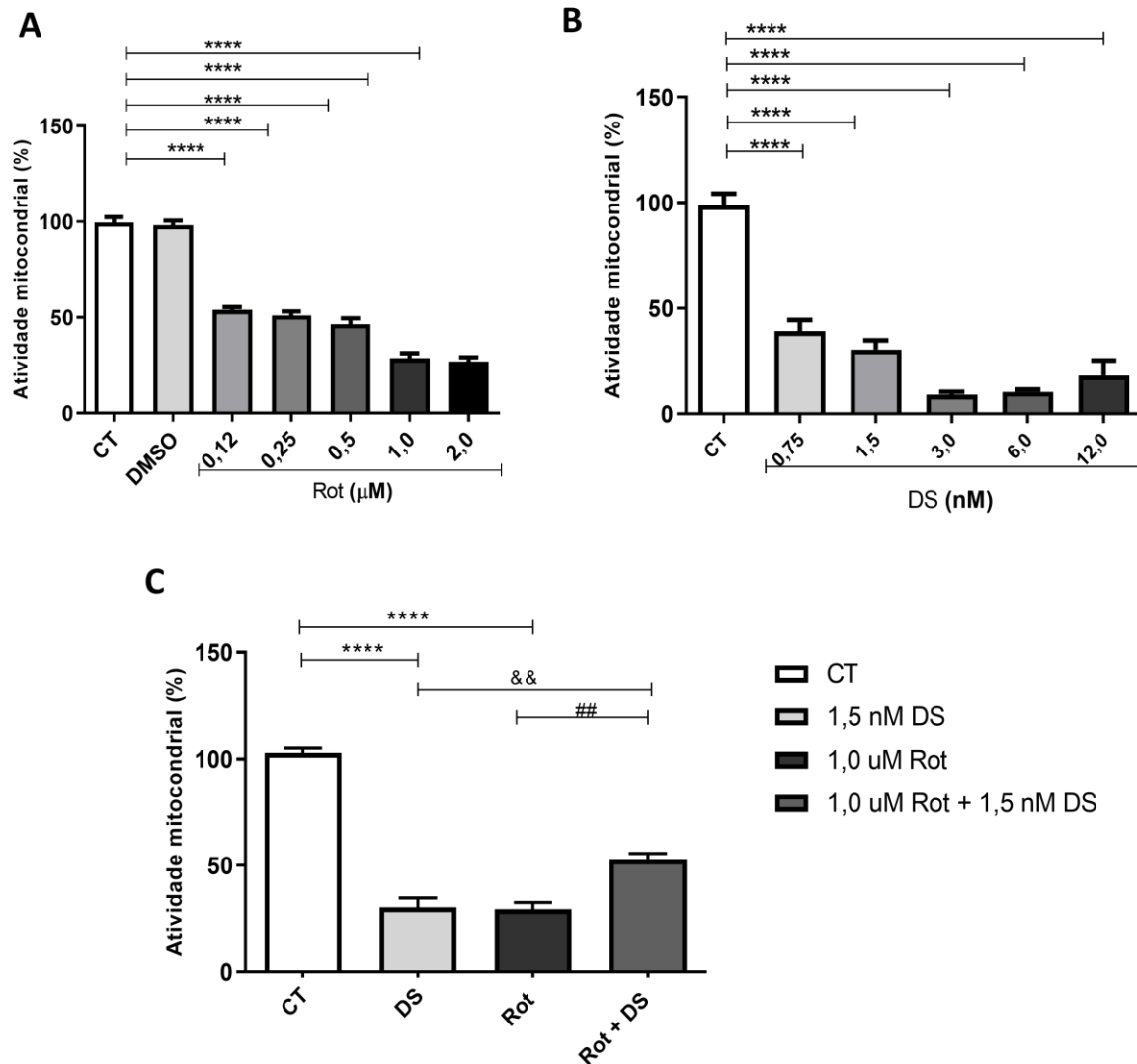


Figura 11 - Análise da atividade mitocondria pelo método de MTT, na linhagem Neuro-2A plaqueadas na concentração de 10×10^4 céls/poço. A) exposta a 0,12-2,0 μM de rotenona; B) exposta a 0,75-12 nM de DS de *P. nigra* e C) exposta a 1,0 μM de rotenona e 1,5 nM de DS de *P. nigra*; pelo período de 72 horas. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

O efeito do DS de *P. nigra* e da rotenona isolado ou em associação sobre a atividade mitocondrial foi avaliado em diferentes tempos de incubação (0-72horas) (Figura 12). As células NEURO-2A foram expostas a concentrações pré-estabelecidas com base no valor de EC_{50} (como abordado acima), por quatro

períodos de tempo distintos. Verificou-se que houve uma redução da atividade mitocondrial das culturas expostas à rotenona (tanto o grupo rotenona quanto o grupo rotenona + DS) em relação ao grupo controle durante o tempo de exposição (Figura 12), embora este efeito não tenha se mostrado estatisticamente significativo em relação ao grupo DS quando comparado aos demais grupos.

O grupo DS manteve sua viabilidade durante o período de incubação (0-72hs) assim como o grupo rotenona + DS de *P. nigra*. Não havendo diferenças estatísticas quando comparado entre si.

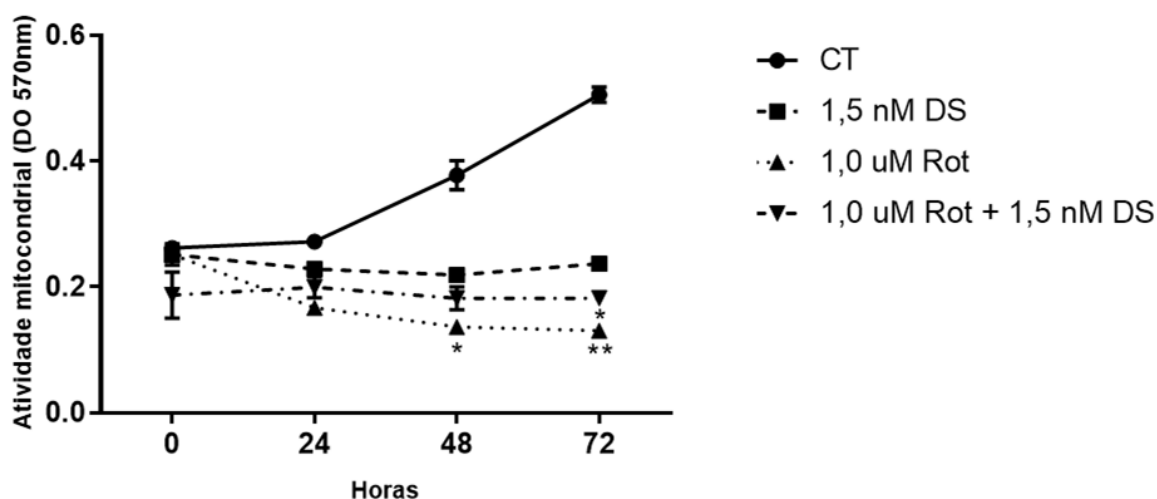


Figura 12 - Determinação da viabilidade mitocondrial mediada por rotenona e DS de *P. nigra* em células de neuroblastoma murino NEURO-2A. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

O tratamento das células com rotenona e DS no tempo inicial de 0 horas não apresentaram mudanças significativas na porcentagem de atividade mitocondrial quando comparado ao controle, porém a partir desse tempo a porcentagem de atividade mitocondrial diminuiu de forma acentuada para as amostras que foram incubadas com 1,0 μM de rotenona. Como pode ser observado no tempo de 24 horas

a porcentagem de atividade mitocondrial na presença de 1,0 μM de rotenona isolada foi de aproximadamente 39% comparado com o controle, regredindo de maneira crescente até o tempo de 72 horas. O grupo rotenona + DS no tempo 72 horas mostrou diferença significativa da atividade mitocondrial das células quando comparados ao grupo controle, diferentemente do grupo rotenona que mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle após 48 horas de tratamento.

6.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Após observar o decréscimo na atividade mitocondrial fomos verificar se esse decréscimo era referente a diminuição da proliferação celular ou devido a diminuição da viabilidade celular. Para isso, utilizamos a microscopia por contraste de fase e a técnica de fluorescência utilizando o marcador de núcleo celular DAPI a fim de quantificar o número total de células em cultura (Figura 13 e 14). A quantificação desses dados nos indicou que aproximadamente 95% das células controle e com DS de *P. nigra* foram marcadas com DAPI, o que nos indica que as células presentes na cultura são em sua maioria viáveis. Porém observamos um menor número de células nas culturas incubadas com DS de *P. nigra* ($136 \pm 5,1$ por campo de maior aumento (200x); Figura 13E), rotenona ($56 \pm 1,5$ por campo de maior aumento (200x); Figura 13C) e em conjunto (67 ± 4 por campo de maior aumento (200x); Figura 13G).

A morfologia das células Neuro-2A mudou após a incubação com Rotenona 1,0 μM e/ou DS de *P. nigra* 1,5 nM (Figura 13). As células sob ação da rotenona mostraram aspecto arredondado e não ramificado e, aparentemente, houve uma redução considerável no número de células na cultura (Figura 13C, D). As células incubadas apenas com DS de *P. nigra* apresentaram aumento da morfologia dos ramos nos neurônios, induzindo o crescimento, no entanto, reduziu o número de células na cultura (Figura 13E, F). A rotenona e o DS de *P. nigra* em conjunto melhoram o aspecto das células, com a maioria delas apresentando aparência arredondada e as outras células com a morfologia ramificada de neurônio preservado, menos células na cultura também foram observadas (Figura 13G, H).

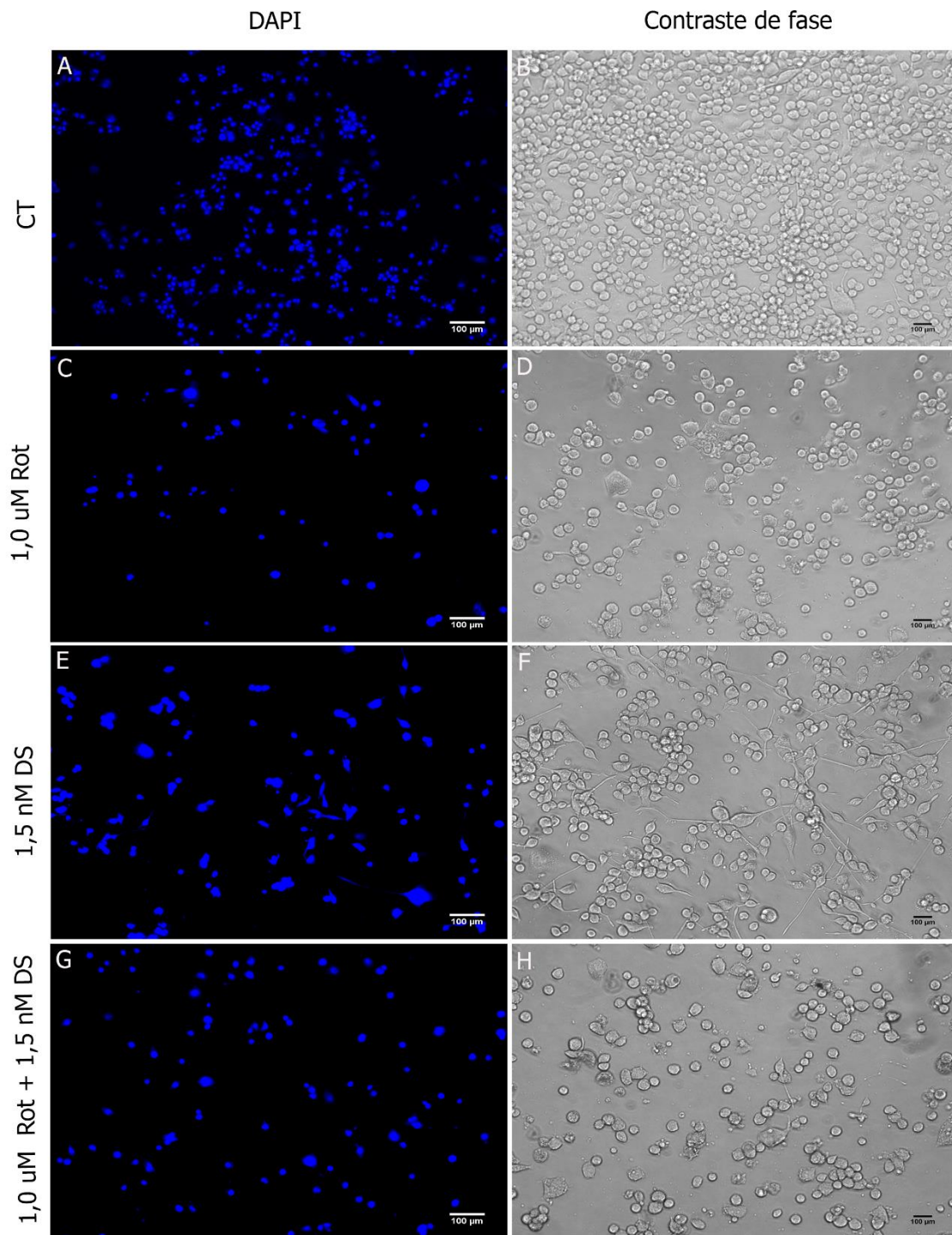


Figura 13 - Micrografia das células de NEURO-2A. A, C, E e G) Núcleos celulares marcados com DAPI (1:1000) emitindo fluorescência azul. B, D, F e H) por contraste de fase.

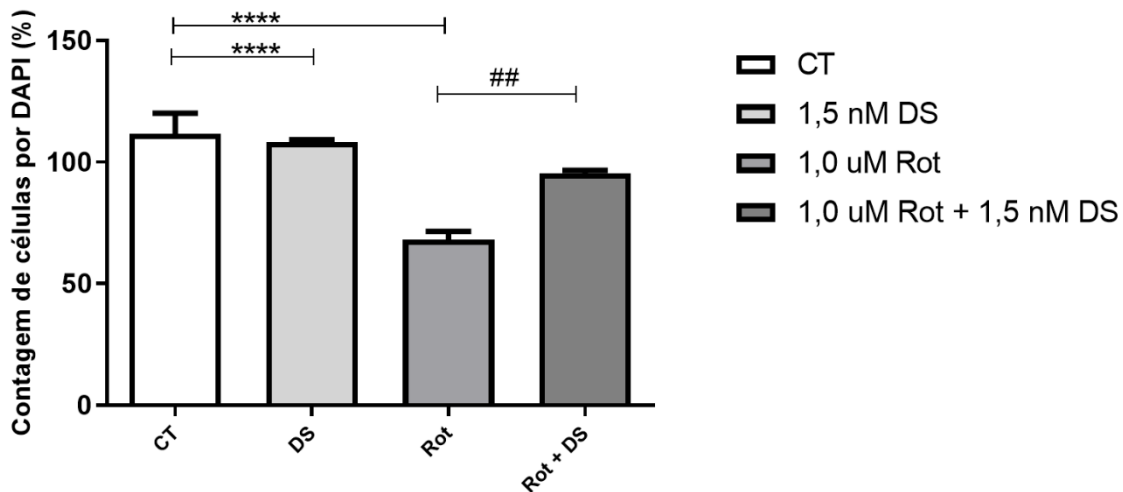


Figura 14 - Porcentagem de células presentes em culturas de NEURO-2A expostas a Rotenona (1,0 μ M) ao DS (1,5 nM). O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento com DAPI. Foram analisados 4 campos de células por poço. As barras representam o erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

Dados da contagem de células e morfologia celular revelaram uma diminuição no número de células; portanto, para elucidar se a redução do número de células está diretamente correlacionada com a morte celular, usamos corantes fluorescentes DAF para colorir células viáveis e IP para células com membrana celular comprometidas. A maioria das células no controle (Figura 15A, B, C) e, apenas no DS de *P. nigra*, são viáveis e algumas delas foram coradas por PI (Figura 15G, H, I). Por outro lado, menos células foram coradas pelo DAF e a maioria delas foi corada pelo IP após a incubação com rotenona e, em comparação, com o controle (Figura 15D, E, F). A co-incubação de DS de *P. nigra* com rotenona revelou uma diminuição na coloração de IP com mais células viáveis em comparação com células incubadas apenas com rotenona (Figura 15J, K, L). Para confirmar os dados obtidos pelas imagens, foi realizada a análise morfométrica, uma quantificação de células positivas para DAF e IP. Dados do DAF revelaram que a rotenona diminuiu as células viáveis de 100% nos

controles para 60% na rotenona. O DS de *P. nigra* incubado com rotenona (95,32%) preservou mais células viáveis semelhantes aos controles (Figura 16A). Além disso, as células com membrana comprometidas coradas com IP foram altas em torno de 103,57%, como esperado, no grupo experimental de rotenona em comparação ao controle, que foi de 58,92%. O DS de *P. nigra* isolado/ou em uma co-incubação com rotenona, diminuiu notavelmente as células com membrana comprometida para 19,40% apenas no DS de *P. nigra* e para 44,64% na co-incubação de rotenona/DS de *P. nigra*, melhor do que o observado no controle (Figura 16B).

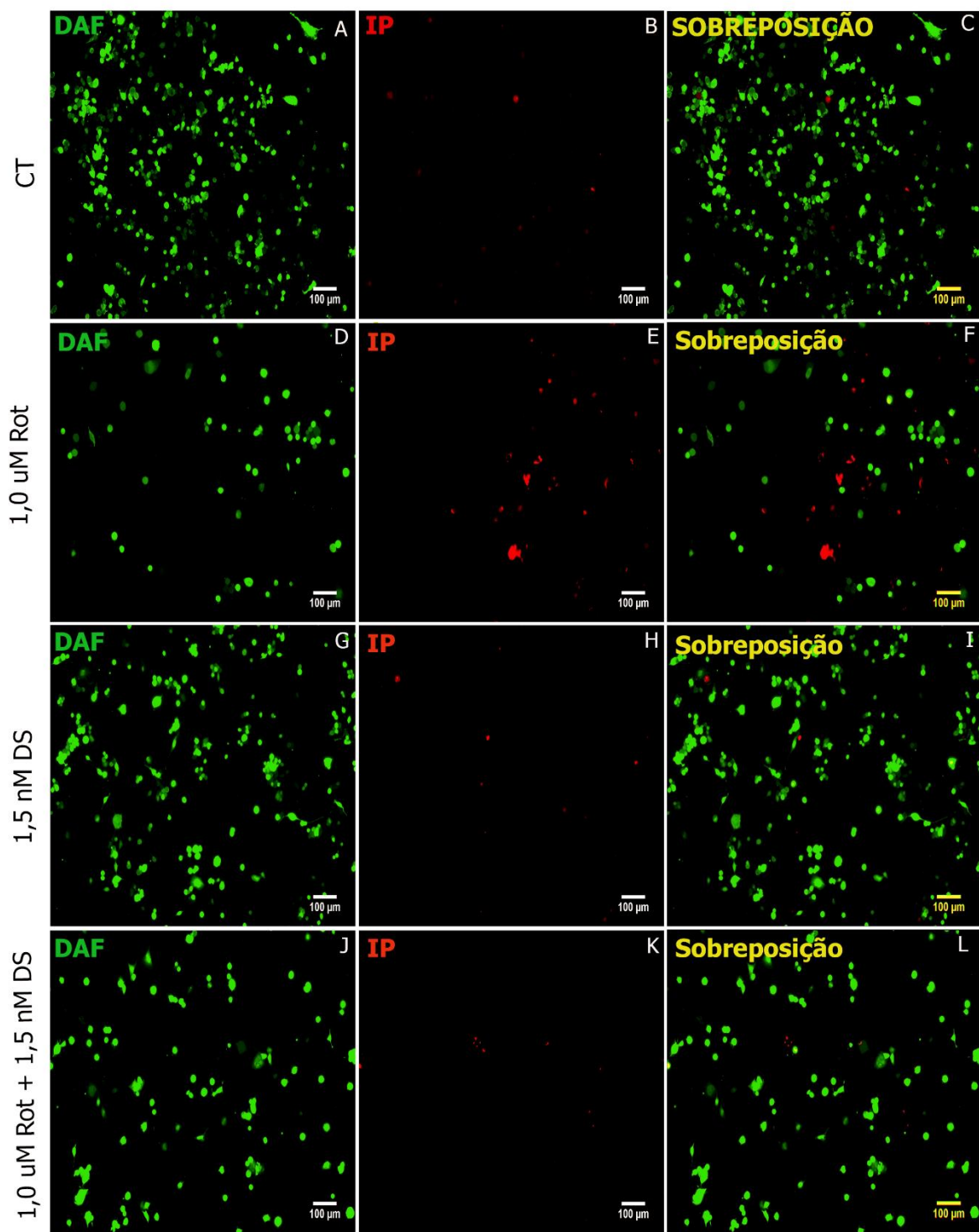


Figura 15 - Micrografia das células NEURO-2A para avaliação da viabilidade celular. A, D, G e J) Histoquímica com DAF; B, E, H e K) Histoquímica com Iodeto de propídeo) C, F, I e L) Sobreposição. Barra de escala: 100µm. N=4 amostras.

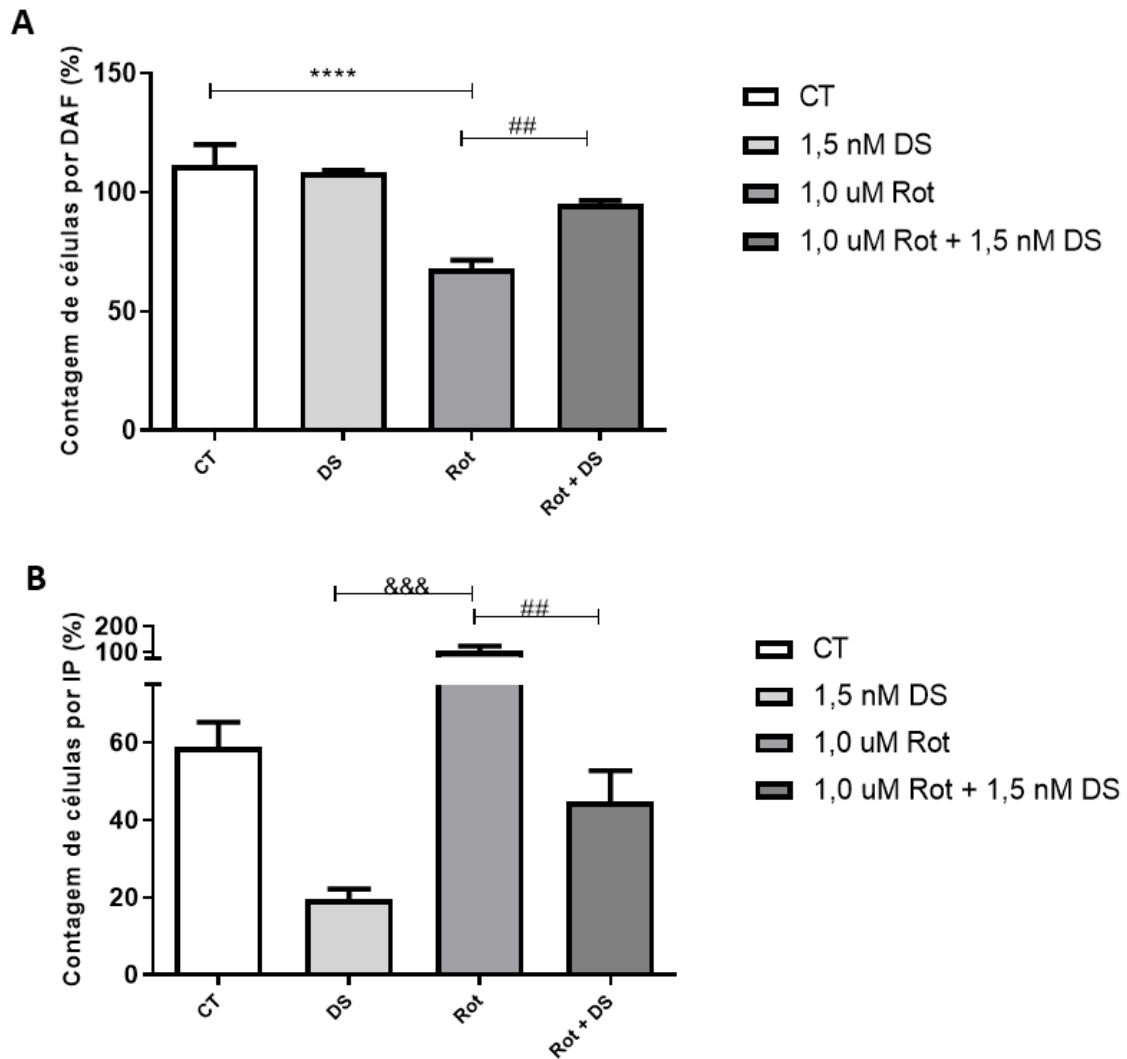


Figura 16 - Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em culturas de células de NEURO-2A expostas a 1 μ M de Rotenona e a 1,5 nM de DS. A) células viáveis marcadas com DAF; B) células apoptóticas marcadas com IP. O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento, empregando diferentes corantes IP e DAF. Foram analisados 4 campos de células por poço. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*), grupo DS (&) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

Para melhor avaliar a alteração na morfologia das células Neuro-2A após a incubação com rotenona e/ou DS de *P. nigra*, as células com neuritos foram contadas

em imagens obtidas por marcação de fluorescência com DAF. Após a incubação com 1,0 μM de rotenona, as células com neuritos diminuíram de 100% nos controles para 40% no grupo experimental de rotenona. O DS de *P. nigra* não melhorou o número de células com neurites em uma co-incubação com rotenona (Figura 17A). Além disso, o número de neurites por neurônio diminuiu após a incubação com 1,0 μM de rotenona e o DS de *P. nigra* não alterou a característica dessa célula (Figura 17B). No entanto, procurando o comprimento dos neurites, como esperado, 1,0 μM de rotenona diminuiu o comprimento dos neurites e, por outro lado, apenas o DS de *P. nigra*, melhorou de 50,5 μm nos controles para 105,18 μm (Figura 17C). Após a co-incubação com rotenona e DS de *P. nigra*, o comprimento dos neuritos aumentou em comparação com a rotenona sozinha, de 16,25 a 39,23 μm (Figura 17C).

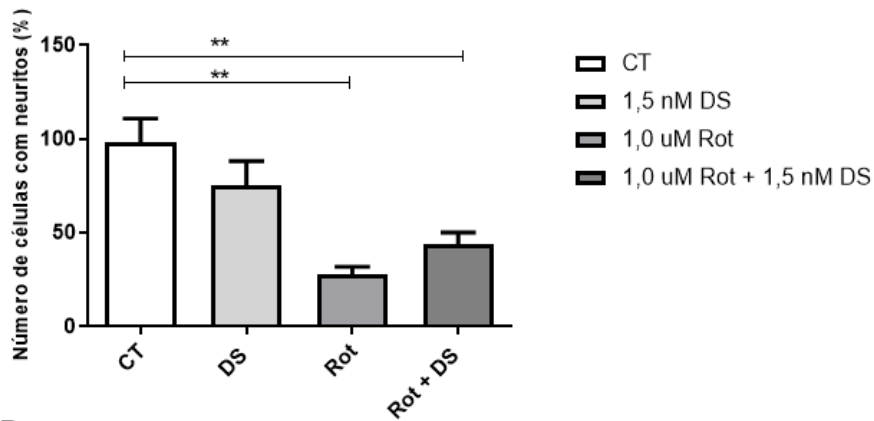
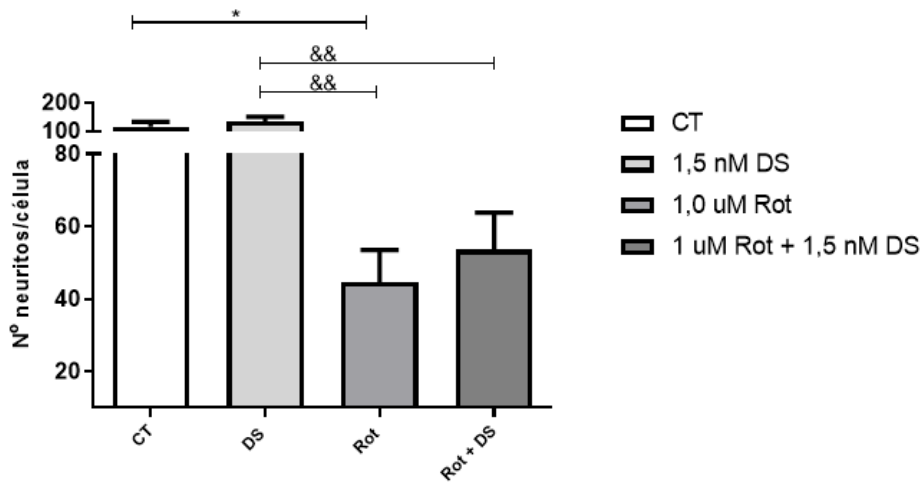
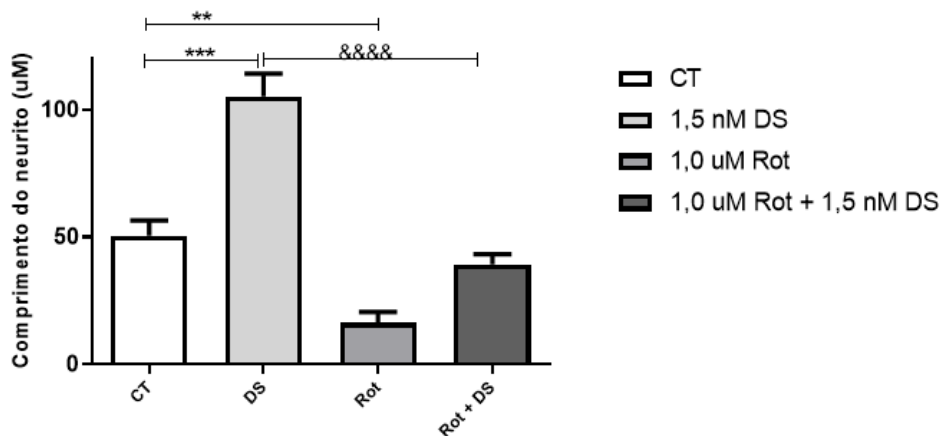
A**B****C**

Figura 17 - Quantificação de neuritos nas células NEURO-2A marcadas com DAF. A) Relação entre a presença de neuritos por célula; B) Porcentagem de neurônios com prolongamentos; C) Comprimento do prolongamento neurítico. O resultado foi obtido no tempo de 72 h após o tratamento (n = 3 experimentos independentes, foram

analisados 4 campos de células por poço) utilizando o programa NIH ImageJ, versão 1.47t. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo DS (&) ($p \leq 0,05$).

Os efeitos citotóxicos e alterações morfológicas foram confirmadas pela avaliação da ultraestrutura das células NEURO-2A que revelaram modificações da integridade da membrana. As células do grupo controle apresentaram morfologia bem definida, com pequenas projeções do citoplasma (filopódios) organizadas de forma regular, permitindo observar que as células se mantinham aderidas ao substrato (Figura 18A). A incubação com 1,5 nM de DS revelou a presença de prolongamentos neuríticos bem compridos, passando de uma forma mais esférica observado no controle para uma conformação mais achatada e alongada do corpo celular, adquire a morfologia piramidal do corpo celular com neurites longos e ramificados emergidos do soma característico de neurônio, confirmando os dados observados no contraste de fase e na fluorescência (Figura 18B).

A rotenona na concentração de 1,0 μ M, após 72h de incubação afetou drasticamente a morfologia das células comparadas ao controle, com modificações da sua morfologia que caracteristicamente correspondem a células apoptóticas, como blebbing de membrana, desaparecimento das projeções de membrana, retração dos filopódios, com conseqüente perda de adesão à matriz, passando de uma forma mais esférica para uma conformação mais achatada do corpo celular (Figura 18C).

Em uma co-incubação entre rotenona com DS de *P. nigra*, observou-se a presença de projeções dos filopódios do citoplasma, aparência arredondada e pequenos neuritos emergidos do soma. Em comparação com as células incubadas isoladamente com o DS de *P. nigra*, o comprimento dos neuritos é menor (Figura 18D).

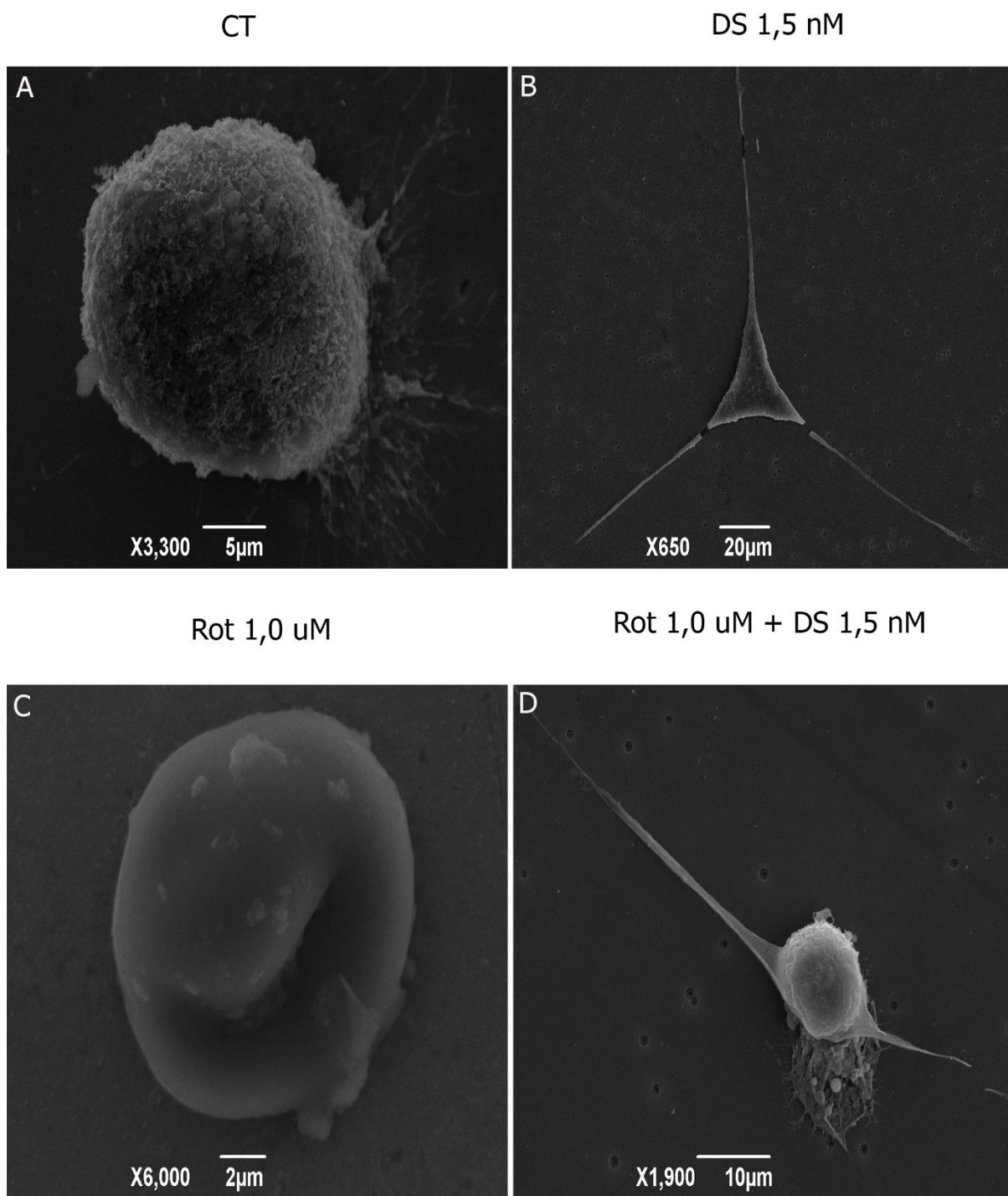


Figura 18 -Eletromicrografia de varredura de células NEURO-2A incubadas com rotenona e DS de *P. nigra* durante 72h. N=2.

6.4. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Além disso, do papel do DS de *P. nigra* na viabilidade e morfologia celular, decidimos investigar se o efeito neuroprotetor observado nos experimentos realizados aqui estava correlacionado ao efeito antioxidante do DS de *P. nigra*, uma vez que a rotenona é descrita como indutora de estresse oxidativo.

Como esperado a incubação com rotenona apresentou aumento da produção de ROS quando comparado ao grupo controle. O grupo DS de *P. nigra* não induziu aumento de ROS e sua incubação concomitante com a rotenona, diminuiu a produção de EROs em 67% em relação ao controle indicando que o DS de *P. nigra* tem ação antioxidante (Figura 19).

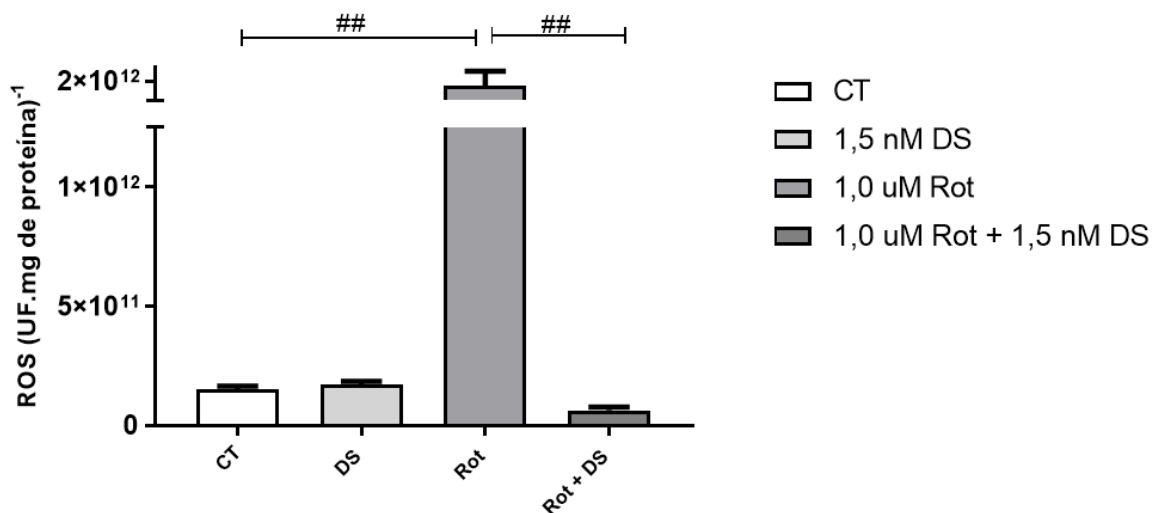


Figura 19 -Efeitos do DS e rotenona isolada ou em conjunto sobre a produção de ROS em células NEURO-2A. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

6.4.1. Análise do sistema antioxidante

Para avaliar se a atividade antioxidante suposta pelo experimento da quantificação de ROS era através da ação direta da molécula de DS inativando as ROS ou se era por ação na atividade das enzimas do sistema antioxidante, a atividade das enzimas SOD, CAT e ACAP foram realizados.

Para a SOD a diminuição causada pela incubação com rotenona foi de 78% em relação ao controle, sendo essa diminuição a mais expressiva dos grupos. O grupo DS mostrou um aumento de 65% em relação ao controle assim como o grupo rotenona + DS apresentou atividade de SOD de 43% (Figura 20).

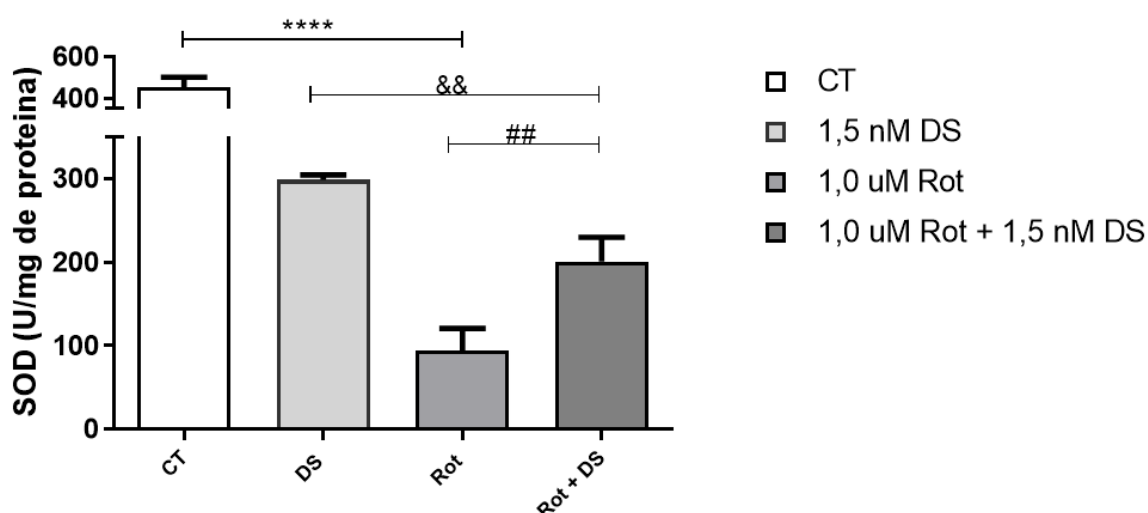


Figura 20 - Atividade de SOD (U/mg de proteína) em células de neuroblastoma murino NEURO-2A tratadas com rotenona e DS de *P. nigra*. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*), grupo DS (&) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

Para a CAT (Figura 21) houve um aumento na sua atividade de 243 % (no grupo DS) e 162% (no grupo Rotenona + DS), enquanto para CAT não houve diferença estatística entre os grupos DS e Rotenona + DS.

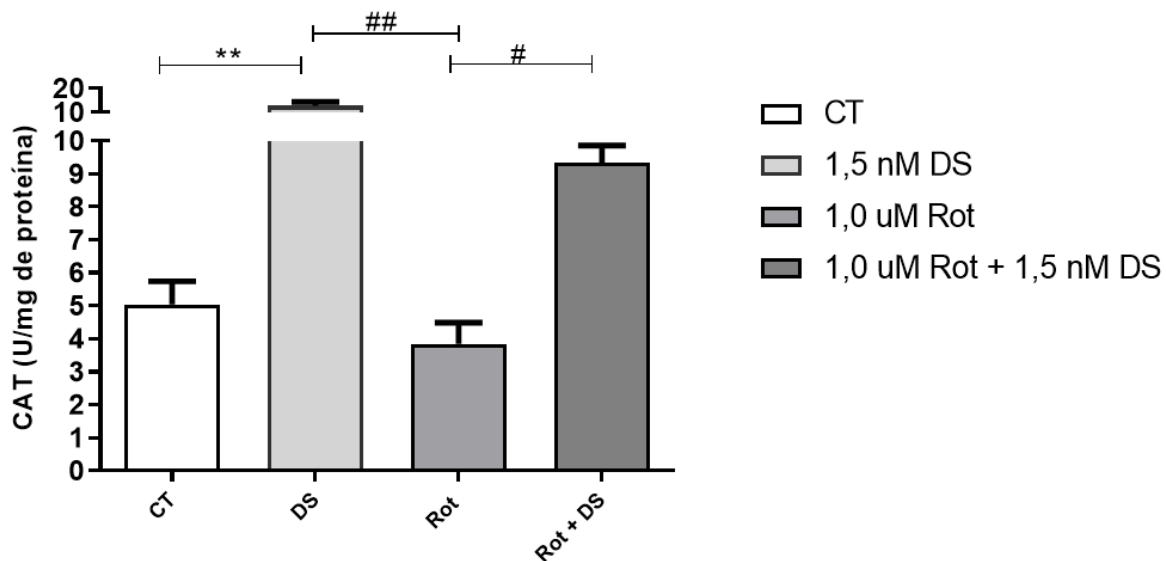


Figura 21 - Atividade de CAT (U/mg de proteína) em células de neuroblastoma murino NEURO-2A tratadas com rotenona e DS de *P. nigra*. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

Quando avaliamos a capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP) nas células, verificamos que o grupo rotenona apresentou menor competência antioxidante quando comparado aos demais grupos (40%). O DS de *P. nigra* na presença de rotenona apresentou a maior ACAP no mesmo tempo de incubação, superando a ACAP do grupo controle e do grupo DS de *P. nigra* isolado (Figura 22).

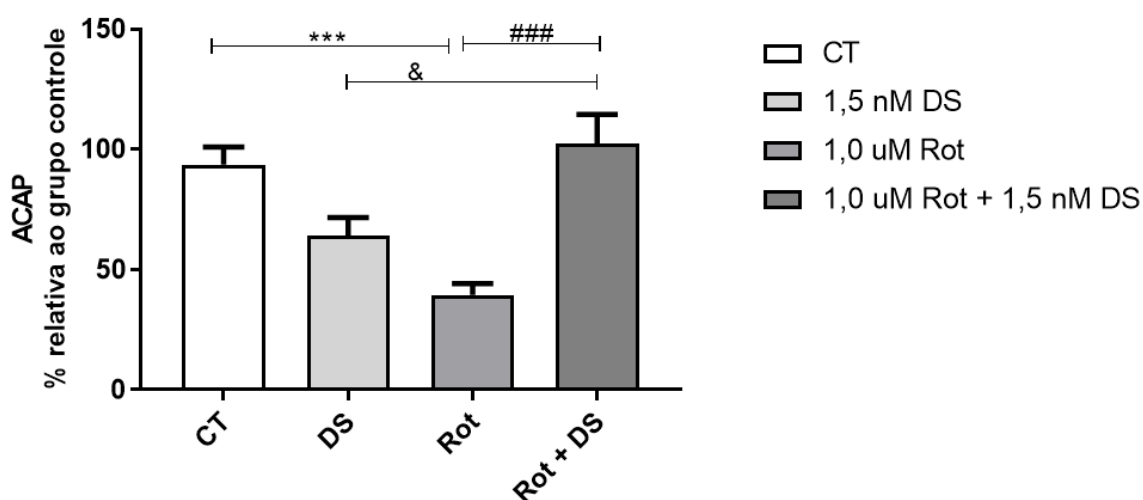


Figura 22 -Efeitos do DS e rotenona isolada ou em conjunto sobre a capacidade antioxidante de ROS em células NEURO-2A. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

6.5. AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR POR LPO

A integridade das membranas celulares foi avaliada pelo ensaio de LPO. A rotenona, como esperado, induziu altos níveis de LPO em comparação com o grupo controle. Os níveis de LPO no controle foram de 43,90% e no grupo rotenona foi de 100,44%. O DS de *P. nigra* induziu também níveis de LPO para 66,14% em comparação com o controle, no entanto, foi menor do que no grupo experimental de rotenona. A rotenona co-incubada com o DS de *P. nigra* reduziu os níveis de LPO para 70,60% (Figura 23).

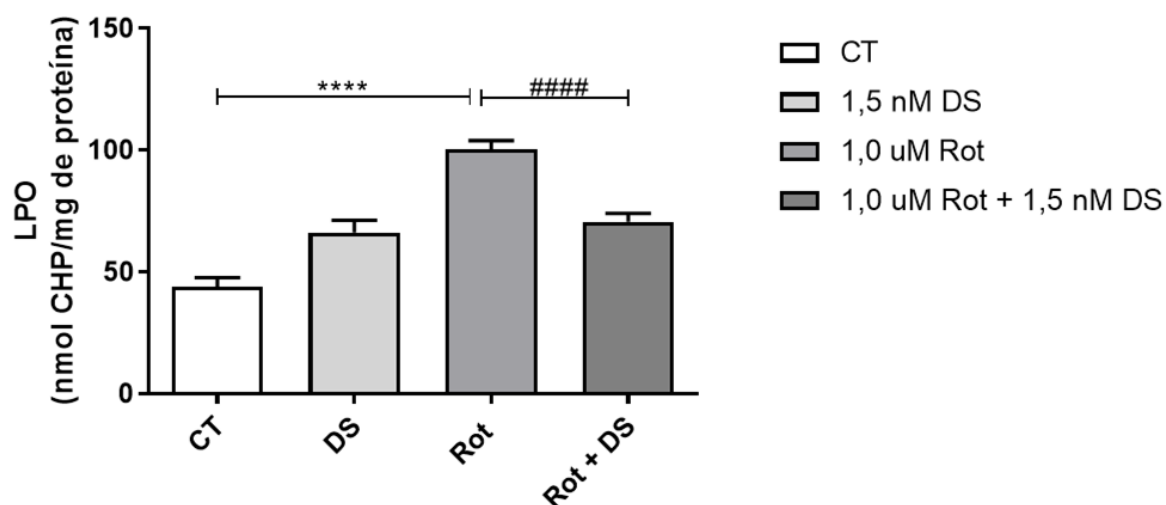


Figura 23 -Efeitos do DS de *P. nigra* e rotenona isolada ou em conjunto sobre a peroxidação lipídica. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico ONE-WAY ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (*) e ao grupo rotenona (#) ($p \leq 0,05$).

De fato, houve uma redução da peroxidação de lipídios no grupo rotenona + DS de *P. nigra* comparativamente ao grupo rotenona isolado, ou seja, mais uma vez houve efeito oposto entre ambos.

7. DISCUSSÃO

Os processos de neurodegeneração representam um tema importante nas neurociências e o entendimento de seus mecanismos pode propiciar o desenvolvimento de terapias para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

As doenças neurodegenerativas, em geral, são caracterizadas por morte neuronal, estresse oxidativo e inflamação. Recentemente, novas propriedades dos glicosaminoglicanos no sistema nervoso central. Suas propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias são bem estudadas em muitos sistemas diferentes. Aqui, investigamos os efeitos neuroprotetores e antioxidantes do DS obtidos da ascídia *Phallusia nigra* usando uma linhagem de células de neuroblastoma de camundongo Neuro-2A.

A grande heterogeneidade estrutural dos GAGs pode afetar suas afinidades de se ligarem a proteínas, fazendo assim, com que estas moléculas possam promover efeitos biológicos e por sua vez, exibir potenciais biotecnológicos. Por isso, novas pesquisas a cerca destes polissacarídeos sulfatados, em especial aqueles com pouca elucidação sobre distribuição, estrutura e interação biológica, se fazem imprescindíveis. Os resultados aqui mostrados, sugerem que este DS isolado da *P. nigra* apresente propriedades biológicas que favorecem seu uso como potentes candidatos no tratamento das doenças neurodegenerativas. Além disso, a composição estrutural peculiar do composto tipo DS da *P. nigra*, aponta esta molécula como um notável alvo biotecnológico com perspectivas de aplicações a serem exploradas.

Neste estudo, demonstramos que preparações de DS supersulfatadas estruturalmente de *P. nigra*, possuem atividades promotoras de neurites. Análises morfométricas de células de neuroblastoma murino NEURO-2A tratadas com DS mostraram boas correlações entre suas propriedades neuritogênicas, fornecendo bases bioquímicas e biológicas para elucidar os mecanismos subjacentes. Esse resultado do DS de *P. nigra* é semelhante aos observados por pesquisadores que utilizam diferentes glicosaminoglicanos ou polissacarídeos em diferentes tipos de células de neuroblastoma. Recentemente, Chuanxia *et al.*, observaram um efeito

neuroprotetor de CS na SH-SY5Y superexpressando a linhagem de células humanas de α -sinucleína após 24 h com uma alta concentração de CS atingindo 400 mg / L. Além disso, a quitosana (15 μ M) adicionada à linhagem celular SH-SY5Y após a citotoxicidade induzida pela rotenona mostrou um efeito protetor, no entanto, foi prejudicial para as células em altas concentrações. No trabalho anterior, Woods *et al.*, utilizando diferentes concentrações de sulfato de heparan ou CS (15 μ g/mL) na neurodegeneração induzida por β -amilóide (25-35) em neurônios do hipocampo cultivados, não observaram influência na viabilidade celular com baixa concentrações de GAGs, mas um efeito protetor em outros parâmetros analisados. O papel na atividade mitocondrial, observado aqui, nas células Neuro-2A foi somente após 72h em uma concentração muito baixa de DS de *P. nigra* (1,5 nM). Isso pode ser atribuído a uma estrutura diferente encontrada no DS, enquanto que o CS obtido de mamíferos possui dissacarídeos repetidos que incluem ácido glucurônico (GlcUA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Sugahara 2003), e a quitosana contém unidades repetidas de D-glucosamina e N- A acetil-D-glucosamina (Islam *et al.* 2017), DS de *P. nigra* possui uma estrutura copolimérica, comparada à CS, enriquecida em ácido idurônico (IdoUA) (Pavão *et al.*, 1995). O alto conteúdo de dissacarídeo IdoA está associado ao crescimento de células neuronais observado em culturas de hipocampo de camundongos (Hikino *et al.* 2003; Bao *et al.* 2005) e deve ser responsável pelo alto efeito neuroprotetor do DS de *P. nigra*, mesmo em concentrações muito baixas.

Evidências sugerem que a exposição a toxinas ambientais, tais como pesticidas, podem ser fatores de risco subjacentes ao desenvolvimento de muitas doenças neurodegenerativas (Ascherio *et al.*, 2006; Tanner *et al.*, 2011). Atendo-se para a temática da toxicidade, estudos *in vitro* demonstraram que a rotenona é tóxica para células do SNC (Swarnkar *et al.*, 2012; Thakur e Nehru, 2014; Park *et al.*, 2014), fenômeno que foi observado neste estudo e pode ser correlacionado com a diminuição da viabilidade celular provocada pelo estresse oxidativo decorrente da inibição do complexo I mitocondrial (Betarbet *et al.*, 2000).

As mitocôndrias podem desempenhar um papel vital no controle de processos fundamentais na neuroplasticidade, incluindo diferenciação neural, crescimento de neuritos, liberação de neurotransmissores e remodelamento dendrítico (Cheng *et al.*, 2010; Mattson 2007). Particularmente intrigante são os dados emergentes sugerindo

que distúrbios nas funções mitocondriais podem desempenhar papéis em neuroplasticidade prejudicada no acidente vascular cerebral (Cheng *et al.*, 2010). O tráfico de mitocôndrias pode ser uma tarefa necessária no desenvolvimento neuronal (Chang e Reynolds 2006). A preservação das funções mitocondriais pode ser benéfica no tratamento de doenças enurodegenerativas, através da modulação das funções mitocondriais, induzindo crescimento neurítico e protegendo os neurônios (He *et al.*, 2017).

No nosso estudo buscamos avaliar a viabilidade mitocondrial utilizando o método de redução do MTT, uma vez que o estresse oxidativo pode desencadear morte por apoptose ou necrose. O ensaio de MTT é um método utilizado para mensurar a atividade da enzima que reduz MTT. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial pela medida da formação de um produto de cor escura gerado pela redução do MTT, que se acredita ocorrer principalmente na mitocôndria, fornecendo, portanto, uma medida da função mitocondrial. É um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (Liu *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1994), e detecta células vivas e não as mortas, onde o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células (Mosmann, 1983), assim, de modo geral, o método de MTT parece ser mais indicado para avaliar morte por apoptose.

A avaliação da atividade mitocondrial pelo teste do MTT demonstrou que a rotenona apresentou um efeito citotóxico sobre as células estudadas, efeito este que foi dose dependente (Figura 11). Além disso, alterações na morfologia celular também são indícios de toxicidade desse agente, dessa forma, as células tratadas com rotenona apresentaram aparência apoptóticas, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos, fugindo de um padrão fenotípico fusiforme encontrado nas células não tratadas por esta droga (Figura 13 e 15).

Já está bem descrito na literatura que a rotenona provoca disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, e estes contribuem para gerar danos celulares, e de fato, podem provocar alterações moleculares e bioquímicas que culminam em morte celular, especificamente morte celular por apoptose (Perfeito *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014). Este processo é um tipo de morte caracterizada por retração celular, vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear, condensação e marginalização

da cromatina, formação de corpos apoptóticos e externalização da fosfatidilserina (Robbins *et al.*, 2010; Tamilselvam *et al.*, 2013).

O tratamento com rotenona para células NEURO-2A resultou em redução dependente da concentração na atividade mitocondrial na dosagem de 1,0 μM , o que corroborou com achados anteriores (Ishihara *et al.*, 2011; Swarnkar *et al.*, 2012; Kambe *et al.*, 2016). Já 1,5 nM de DS de *P. nigra*, mostrou a máxima neuroproteção correspondendo a toxicidade induzida por rotenona (1,0 μM) (Figura 11).

Uma grande dúvida que sempre permeia a maioria dos trabalhos que envolvem a ação de compostos químicos sobre células é o alvo desta ação. Buscamos diminuir tais dúvidas com o uso da microscopia eletrônica de varredura e marcação de fluorescência para detectar alterações morfológicas causadas pelo DS e/ou rotenona, frente à linhagem de células de neuroblastoma murino NEURO-2A. O uso de tais ferramentas já se mostrou um grande aliado em outros estudos investigativos do processo de morte celular, por serem ferramentas importantes no estabelecimento do mecanismo de morte celular, o qual se distingue, de forma geral em apoptose ou necrose.

As análises de microscopia de fluorescência, utilizando os marcadores para núcleo (DAPI), membrana celular viável (DAF) e membrana celular inviável (IP), demonstra que o tratamento com rotenona promove alterações morfológicas significativas de apoptose nas células NEURO-2A. A condensação de cromatina, acompanhada de fragmentação nuclear e por fim, o aparecimento de corpos apoptóticos estão entre as características morfológicas mais marcantes do processo de morte por apoptose e que podem ser observados nas células em apoptose por testes de microscopia de fluorescência (Figura 13 e 15; Edinger e Thompson, 2004, Polo *et al.*, 2005).

Na figura 13 a micrografia mostra a diferença em relação a proliferação celular entre as células incubadas com DS de *P. nigra* e/ou rotenona quando comparadas ao controle. Já é descrito na literatura que a diminuição na proliferação celular está relacionada a diferenciação celular, confirmando o aumento da arborização neurítica no grupo DS após marcação com DAF (Figura 15).

As análises por MEV demonstraram alterações morfológicas significativas na estrutura da membrana plasmática das células NEURO-2A tratadas com rotenona (Figura 18). No grupo controle, verifica-se a organização morfológica típica, como a presença de microvilosidades (projeções citoplasmáticas) e filopódios destas células, geralmente associados à sua capacidade migratória. No entanto, em células tratadas com 1 μ M de rotenona ocorre o desaparecimento das microvilosidades, bem como a diminuição do número de filopódios e o surgimento de estruturas arredondadas, o que possivelmente pode resultar em perda de adesão à matriz, muito embora sejam necessários outros experimentos para comprovar essa hipótese. Dados da literatura relatam que mudanças semelhantes ocorridas na membrana plasmática são responsáveis pela formação dos corpos apoptóticos com produtos de degradação nuclear, que *in vivo*, são fagocitados pelos macrófagos teciduais (Hacker, 2000).

Alguns estudos vêm demonstrando evidências de que o estresse oxidativo contribui para a etiologia da DP (Sanders e Greenamyre, 2013), onde a disfunção mitocondrial é considerada um dos mecanismos responsáveis pela morte neuronal (Anwar *et al.*, 2012). Também estão aumentados vários marcadores da peroxidação lipídica no cérebro de pacientes com DP (Dexter *et al.*, 1989). Da mesma forma o dano oxidativo cumulativo é o mecanismo primário pelo qual a exposição à rotenona leva a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e degeneração dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Sherer *et al.*, 2003). Foi demonstrado que vários tipos de antioxidantes podem atenuar a toxicidade promovida pela rotenona (Sanders e Greenamyre, 2013). Por esta razão, esta abordagem foi utilizada no presente trabalho.

O HO[•] é provavelmente a ERO capaz de causar mais dano aos sistemas biológicos (Diplock *et al.*, 1998; Betteridge, 2000; Nordberg e Arnér, 2001), portanto pode oxidar qualquer biomolécula, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (Breen e Murphy, 1995; Cohen *et al.*, 1998; Girotti, 1985; Bwala e Gardner-Thorpe, 1989; Stadtman e Levine, 2000; Väli-Herttua, 1999; Marnett, 2000), apesar de sua baixa capacidade de difusão (Cui *et al.*, 2004). Consequentemente, o excesso de H₂O₂ pode direta e indiretamente comprometer a integridade de moléculas localizadas em diferentes sítios dentro das células (Halliwell e Gutteridge, 1989; Cochrane, 1991), alguns pouco acessíveis às demais EROs.

As EROs são geradas durante o metabolismo oxidativo e existe um limiar de tolerância bastante estreito a elas em todos os organismos aeróbicos (Tew e Ronai, 1999). Elas reagem com vários aminoácidos (Çakatay *et al.*, 2001), o que favorece o aparecimento de enzimas modificadas ou menos ativas e, em alguns casos, proteínas desnaturadas ou não funcionais (Butterfield *et al.*, 1998).

Quando os neurônios estão sob estresse oxidativo, um grande número de EROs são gerados, o que pode causar danos cerebrais. Em condição física, SOD, um marcador de sistemas enzimáticos antioxidantes, pode remover a ROS oportuna para manter o equilíbrio dinâmico de radicais livres, e assim proteger as células (Rosen *et al.*, 1993). Ao mesmo tempo, as ERO podem causar peroxidação lipídica e formam os peróxidos lipídicos, que mostra os níveis de peroxidação lipídica (Schettler *et al.*, 1999). O tratamento exógeno com DS aumentou a atividade da SOD nos neurônios tratados com rotenona, bem como diminuiu a produção de peróxidos lipídicos (Figura 20 e 23). Neste estudo, o tratamento com DS diminuiu as atividades de ROS, aumentou as atividades de SOD e CAT e diminuiu a produção de peróxidos lipídicos nos neurônios tratados com rotenona, sugerindo que DS poderia proteger os neurônios motores contra estresse oxidativo através da regulação do sistema de oxidação-redução.

Numerosos relatórios foram documentados que a diminuição de ROS através de antioxidantes pode ser uma abordagem eficiente para prorrogar o desenvolvimento de DP (Xie *et al.*, 2014). O estresse oxidativo pode ser concebido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, como SOD e catalase, que são catalisadores ativos de radicais livres, como superóxido e hidrogênio peróxido. No entanto, o aumento da produção de ROS juntamente com um mecanismo de defesa anti-oxidante deficiente leva a dano celular progressivo e disfunção fisiológica (Gilgun-Sherki *et al.* 2001).

A atividade antioxidante depletada após exposição a rotenona nas células NEURO-2A gerou um aumento da peroxidação lipídica (Figura 23). Esses resultados indicam que estas alterações nas células podem ser por causa do estresse oxidativo devido à citotoxicidade da rotenona. É bem conhecido que a SOD, peroxidação lipídica e catalase são componentes cruciais do sistema antioxidante e de defesa

celular e desempenham um papel vital na proteção das células contra o estresse oxidativo e lesões celulares (Tamilselvam *et al.*, 2013).

Muitas moléculas podem ter uma propriedade eliminadora e, de fato, a matriz extracelular nervosa (MEC) é endereçada para proteger as células neurais de danos. O MEC deve ser parcialmente responsável por sua capacidade, principalmente porque os radicais livres formados nesse ambiente interagem com os componentes, principalmente com os GAGs (Albertini *et al.* 2000). Por outro lado, nas doenças neurodegenerativas, ocorrem alterações no ambiente extracelular, variando o conteúdo de GAG e, conseqüentemente, melhoram o estresse oxidativo (Emerit *et al.* 2004; Soleman *et al.* 2013; Suttikus *et al.* 2016).

Da mesma forma, Gao *et al.*, (2012) mostraram que tratamento com fucoidano (um polissacarídeo sulfatado) reverteu as alterações, como GSH-Px e Atividades de SOD e reduziu os níveis de MDA e ROS na linhagem celular derivada de um feocromocitoma da medula suprarrenal de rato PC12 expostas a H₂O₂, o que pode ser devido a sua atividade antioxidante. Wang *et al.*, (2016) também mostraram que o tratamento com fucoidano reduziu acentuadamente o estresse oxidativo, geração de ROS, peroxidação lipídica da proteína carbonilada e disfunção mitocondrial.

Recentemente, a quitosana e o CS foram descritos para reduzir o estresse oxidativo no modelo de parkinson *in vitro* (Canas *et al.*, 2007; Manigandan *et al.* 2018), no entanto, diferentes mecanismos foram atribuídos aos papéis antioxidantes dos GAGs. De fato, pouca informação pode ser encontrada na literatura sobre o assunto. Os diferentes mecanismos devem ser: propriedades de íons quelantes dos GAGs, interação direta com ERO, incluindo ânions superóxido, embora ligados ao GAG com SOD extracelular, rede pericelular, especialmente no sistema nervoso central, para interferir na difusão de moléculas potencialmente prejudiciais e na mediação das vias de transdução de sinal intracelular ligado a receptores e para endocitose de GAGs (Albertini *et al.*, 2000; Dudas *et al.* 2008; Kadomatsu e Sakamoto, 2014).

Usando o DS de *P. nigra* observamos menos células coradas por IP, indicando uma interferência na via apoptótica, conforme descrito para a heparina, que inibe a apoptose das células glomerulares na cultura celular (Ishikawa e Kitamura, 1999) e atenua a apoptose dos trofoblastos (Bose *et al.*, 2005) Por outro lado, observamos

uma melhora na atividade da SOD e CAT, que indica a transdução do sinal e a ativação da sinalização intracelular.

O CS foi descrito para ativar a proteína cinase C, que fosforila Akt que, através da via fosfatidilinositol 3- cinase/Akt (Canas *et al.*, 2007). No entanto, não investigamos essa via, porque CS e DS são análogos; é possível que a DS esteja agindo pela via Akt para desempenhar um papel antioxidante. Além disso, alguns tipos de células são capazes de endóctar GAGs como CS e HS e, neste caso, os efeitos dos GAGs não são mediados pelo receptor da membrana celular (Prinz *et al.* 1978; Laparra *et al.* 2009).

Em virtude dos resultados, podemos sugerir que o DS inibiu a apoptose induzida pela rotenona, possivelmente através de sua atividade antioxidante, tendo sua atuação significativamente aumentada na via da CAT, e intervenção na via mitocondrial. O DS, em princípio, semelhante aos polissacarídeos sulfatados relatados anteriormente com atividade antioxidante demonstrando sequestro de EROs e outros radicais livres gerados.

A novidade do presente estudo é averiguada pelas variadas aplicações biomédicas existentes de GAGs. Distúrbios neurológicos, frequentemente associados à degradação da matriz extracelular à base de polissacarídeos, composta de GAGs, garante o uso de polissacarídeos homólogos e seus derivados para melhorar a degeneração neuronal, evitar a agregação de proteínas e restaurar a transmissão neural e função (Miller e Hsieh-Wilson 2015; Soares da Costa *et al.*, 2017). Polissacarídeos marinhos estão envolvidos na sinalização celular e interação da matriz celular, e se ligam a proteínas em vários estágios de especificidade. Alteração química da estrutura dos polissacarídeos oferece uma oportunidade para adquirir novos agentes farmacológicos com possíveis utilizações terapêuticas.

8. CONCLUSÃO

Após a realização dos experimentos aqui expostos e da análise dos dados com estes adquiridos, podemos realizar algumas inferências sobre a ação do DS de *P. nigra* sobre o efeito neuroprotetor contra a citotoxicidade causada pela rotenona na linhagem celular estudada:

- Em relação a extração de DS das vísceras da ascídia *P. nigra*, o método utilizado mostrou ser efetivo, permitindo a obtenção de frações com dermatam sulfato isolado;
- O tratamento das células após 72 horas de incubação apresentou um EC₅₀ de 1,0 µM de rotenona e EC₅₀ de 1,5 nM de DS de *P. nigra*. Apenas o grupo rotenona apresentou mudanças significativas na porcentagem de atividade mitocondrial quando comparado ao grupo controle;
- As células da linhagem NEURO-2A são mais sensíveis a incubação com rotenona isolada em relação às células incubadas com DS de *P. nigra*, fato exemplificado não só pelo seu menor valor de EC₅₀ quanto pelas modificações estruturais mais evidentes.
- Foi verificado que o tratamento com DS de *P. nigra* por 72 h não aumentou o número de células, e apesar da baixa confluência, estas células se encontram amplamente arborizadas por prolongamentos neuríticos na linhagem NEURO-2A;
- Já a incubação com rotenona por 72 h gerou um aumento no número de células em estágio apoptótico na linhagem NEURO-2A;
- Após a incubação por 72h foi possível observar o efeito de 1,0 µM de rotenona sobre a capacidade de causar estresse oxidativo, através de danos mitocondriais, sendo este efeito menos acentuado quando 1,0 µM de rotenona é administrado em associação com 1,5 nM de DS de *P. nigra*;

- Em contrapartida foi possível observar que 1,5 nM de DS de *P. nigra* gerou um efeito protetor nas células, pois foi observado uma diminuição na porcentagem de morte celular quando comparado ao controle;
- As alterações morfológicas nas células incubadas com 1,0 µM de rotenona são compatíveis com a indução do processo de morte celular por apoptose;
- Sobre a produção de EROs em células intactas foi possível observar que tanto o 1,5 nM de DS de *P. nigra* isolado como o 1,5 nM de DS de *P. nigra* em associação com 1,0 µM de rotenona foi capaz de diminuir a produção das espécies reativas de oxigênio;
- O efeito da rotenona sobre a atividade das enzimas antioxidantes em conjunto com sua ação inibitória sobre a cadeia respiratória mitocondrial I, foi reduzido pela ação do DS de *P. nigra* quando utilizado de forma concomitante;
- A atividade antioxidante depletada após exposição a rotenona nas células NEURO-2A gerou um aumento da peroxidação lipídica;
- A incubação conjunta da rotenona com DS de *P. nigra* fez com que houvesse redução da peroxidação de lipídios, graças ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes nas células expostas ao DS de *P. nigra*;
- Considerando a atividade antioxidante apresentada pelo DS e confirmada neste trabalho e o envolvimento das EROs na fisiopatologia da DP, a investigação da possível atividade neuroprotetora do DS de *P. nigra* é um passo promissor a ser avaliado, bem como seu mecanismo de ação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 121–126.
- AKATSU C, MIZUMOTO S, KANEIWA T, MACCARANA M, MALMSTROM A, YAMADA S, SUGAHARA K, 2011. DS epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/DS hybrid structure in postnatal developing mouse brain. *Glycobiology*. 21:565–574.
- AKITA, K, VON HA, FURUKAWA Y, MIKAMI T, SUGAHARA K and FAISSNER A. 2008. Expression of multiple chondroitin/dermatan sulfotransferases in the advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Stem Cells*. Mar;26(3):798-809. Epub 2007 Dec 13.
- AKYÜZ N, ROST S, MEHANNA A, BIAN S, LOERS G, OEZEN I, SCHACHNER M. 2013. Dermatan 4-O-sulfotransferase1 ablation accelerates peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*, 247, 517–530.
- AKYUZ N, ALTMAN RB, BLANCHARD SC, BOUDKER O. 2013. Transport dynamics in a glutamate transporter homologue. *Nature*. Oct 3;502(7469):114-8.
- ALLEN NJ, BENNETT ML, FOO LC, WANG GX, CHAKRABORTY C, SMITH SJ and BARRES BA. 2012. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486, 410–414.
- ALLEN NJ. 2013. Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol*. 23, 1027–1033.
- ALVES G, FORSAA EB, PEDERSEN KF, DREETZ GJERSTAD M, LARSEN JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2008 Sep;255 Suppl 5:18-32.
- AMADO, L.L., M.L. GARCIA, P.B. RAMOS, R.F. FREITAS, B. ZAFALON, J.L.R. FERREIRA, J.S. YUNES, J.M. MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407: 2115-2123.
- AMAZZAL, L., LAPÔTRE, A., QUIGNON, F., BAGREL, D. 2007. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neuroscience Letters*, 418(2), 159–164.
- ANDERS M, BARTOLINI B, THELIN MA, PACHECO B, MACCARANA M. 2012. Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate: Biosynthesis and Biological Function. *J. of Histochem. Cytochem*. 60, 916–925.
- ANDREWS MR, CZVITKOVICH S, DASSIE E, VOGELAAR CF, FAISSNER A, BLITS B, FAWCETT JW. 2009. α 9 Integrin Promotes Neurite Outgrowth on Tenascin-C and Enhances Sensory Axon Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(17), 5546–5557.

ANNO K, SENO N, MATHEWS MB, YAMAGATA T, SUZUKI S. A new dermatan polysulfate, chondroitin sulfate H, from hagfish notochord. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 237: 173–177.

ANTHONY JH, JAMES M. 2018. Glycans and glycosaminoglycans in neurobiology: key regulators of neuronal cell function and fate. *Biochemical Journal*. Aug 16,475(15)2511-2545.

ANWAR, N; GEORGE, M; ADRIAN, C.B.M. 2012. Oxidative stress in Parkinson's disease; parallels between current animal models, human studies and cells, oxidative stress and diseases, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN: 978-953-51- 0552-7, InTech.

ARENDR D, DENES A S, JEKELY G, TESSMAR-RAIBLE K, 2008. The evolution of nervous system centralization. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1523–1528.

ASCHERIO, A., & SCHWARZSCHILD, M. A. 2016. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 15(12), 1257–1272.

Ascidian Phallusia nigra- Available online:
http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/1193 (accessed on 9 October 2018).

ASTASHKINA A, MANN B, GRAINGER DW. 2012. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol. Ther.* 134, 82–106.

AVILA, C. L., CHAVES, S., SOCIAS, S. B., VERA-PINGITORE, E., GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA, F., VERA, C., CHEHÍN, R. 2017. Lessons learned from protein aggregation: toward technological and biomedical applications. *Biophysical Reviews*, 9(5), 501–515.

ÁVILA, C. L., TORRES-BUGEAU, C. M., BARBOSA, L. R. S., SALES, E. M., OUIDJA, M. O., SOCIAS, S. B., CHEHÍN, R. N. 2014. Structural Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Protofibrils Preventing α -Synuclein Oligomeric Species Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(20), 13838–13850.

BAKER KR, RICE L. 2012. The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment. *Methodist Debaque Cardiovasc J.* 8:3–7.

BAKER MJ, GERSHANIK OS. 2006. Parkinson's disease. In: Aarli JA, Avanzini G, Bertolote JM, Boer H, Breivik H, Dua T, *et al.*, editors. *Neurological Disorders Public Health Challenges*. Geneva, Switzerland: WHO.

BAL-PRICE AK, HOGBERG HT, BUZANSKA L, COECKE S. 2010. Relevance of *in vitro* neurotoxicity testing for regulatory requirements: Challenges to be considered. *Neurotoxicology and Teratology*, 32, 36–41.

BAO X, MURAMATSU T, SUGAHARA K. 2005. Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J Biol Chem.* 280: 35318–35328.

BAO X, NISHIMURA S, MIKAMI T, YAMADA S, ITOH N, and SUGAHARA K. 2004. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of Liduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. *J. Biol. Chem.* v.279, p.9765–9776.

BAO X, PAVÃO MS, DOS SANTOS JC, SUGAHARA K. 2005. A functional dermatan sulfate epitope containing iduronate (2-O-sulfate) alpha1–3GalNAc (6-O-sulfate) disaccharide in the mouse brain: demonstration using a novel monoclonal antibody raised against dermatan sulfate of ascidian *Ascidia nigra*. *J Biol Chem.* 280: 23184–23193.

BAO Z., MURRAY J. I., BOYLE T., OOI S. L., SANDEL M. J. and WATERSTON R. H. 2006. Automated cell lineage tracing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2707-2712.

BARBOSA MT. *et al.* 2006. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community- based survey in Brazil (the Bambuí study). *Mov. Disord.*, v. 21, n. 6, p. 800-808.

BARODIA SK, CREED RB, GOLDBERG MS. 2017. Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, 133, 51–59.

BARSOUM MJ, YUAN H, GERENCSEER AA, LIOT G, KUSHNAREVA Y, GRÄBER S, KOVACS I, LEE WD, WAGGONER J, CUI J, WHITE AD, BOSSY B, MARTINOU JC, YOULE RJ, LIPTON SA, ELLISMAN MH, PERKINS GA, BOSSY-WETZEL E. 2006. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.*, 25, 3900–3911.

BARTLEY BGD. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford: Cabi. 341p.

BARTOLINI B, THELIN MA, RAUCH U, FEINSTEIN R, OLDBERG A, MALMSTROM A, MACCARANA M, 2012a. Mouse development is not obviously affected by the absence of dermatan sulfate epimerase 2 in spite of a modified brain dermatan sulfate composition. *Glycobiology.* 22:1007–1016.

BARTOLINI F, BARAUSSE A, PÖRTNER HO. 2012b. Climate change reduced offspring fitness in littoral spawners: a study integrating organismic response and long-term time-series, *Glob Change Biol.* vol. 19, pg. 373-86.

BASAPPA, MURUGAN, S., SUGAHARA, K. N., LEE, C. M., TEN DAM, G. B., VAN KUPPEVELT, T. H., SUGAHARA, K. 2009. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. *Glycobiology*, 19(7), 735–742.

- BASTMEYER M, and O'LEARY D. 1996. Dynamics of target recognition by interstitial axon branching along developing cortical axons. *The Journal of Neuroscience*, 16:4, 1450–1459.
- BAUD, O., GREENE AE, LI J, WANG H, VOLPE JJ, ROSENBERG PA. 2004. Glutathione Peroxidase-Catalase Cooperativity Is Required for Resistance to Hydrogen Peroxide by Mature Rat Oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 24(7), 1531–1540.
- BEAUCHAMP, C., & FRIDOVICH, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- BELARBI K, CUVELIER E, DESTÉE A, GRESSIER B, CHARTIER-HARLIN MC. 2017. *NADPH* oxidases in Parkinson's disease: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1).
- BEN MANSOUR M, DHAHRI M, HASSINE M, AJZENBERG N, VENISSE L, OLLIVIER V, CHAUBET F, JANDROT-PERRUS M, MAAROUFI RM. 2010. Highly sulfated dermatan sulfate from the skin of the ray Raja montagui: anticoagulant activity and mechanism of action. *Comp. Biochem. Physiol. B* 156, 206–215.
- BEREZIN A, KREMZER A, MARTOVITSKAYA Y, BEREZINA T, GRONENKO E. 2016. Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction. *EBio Med.* v.4, p.86–94.
- BERSTAD K and BERSTA JER. 2018. Parkinson's disease; the hibernating spore hypothesis. *Medical Hypotheses* 104; 48–53.
- BETTERIDGE, D. J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3–8.
- BLANDINI F, PORTER RHP, GREENAMYRE JT. 1996. Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.*; 12: 73–94.
- BLUM, D., TORCH, S., LAMBENG, N., NISSOU, M.-F., BENABID, A.-L., SADOUL, R., & VERNA, J.-M. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 135–172.
- BOHNEN, N. I., & ALBIN, R. L. 2011. The cholinergic system and Parkinson disease. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 564–573.
- BOONSTRA, J., & POST, J. A. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1–13.
- BOSE A, BEAL MF. 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* 139(Suppl 1):216–231.
- BOURIN MC, LINDAHL U. 1993. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J.*, 289: 2, 313-30.

BOVOLENTA P, WANDOSELL F, NIETO-SAMPEDRO M., 1993b. Neurite outgrowth inhibitors associated with glial cells and glial cell lines. *Neuroreport*; 5:345±348.

BOYD V, CHOLEWA OM, PAPAS KK. 2008. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2008 Mar;2(2):66-84.

BOYKO AA, TROYANOVA NI, KOVALENKO EI, SAPOZHNIKOV AM. 2017. Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci.*, 6;18(12).

BRADBURY EJ, MOON LD, POPAT RJ, KING VR, BENNETT GS, PATEL PN, FAWCETT JW, MCMAHON SB. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.*, 416:6881, 636-40.

BRADBURY, A. J., COSTALL, B., JENNER, P. G., KELLY, M. E., MARSDEN, C. D., NAYLOR, R. J. 1986. The effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal and limbic catecholamine neurones in white and black mice antagonism by monoamine oxidase inhibitors. *Neuropharmacology*, 25(8), 897–904.

BRADFORD, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.

BREDESEN, D. E., RAO, R. V., & MEHLEN, P. 2006. Cell death in the nervous system. *Nature*, 443(7113), 796–802.

BREEN, A. P., & MURPHY, J. A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6), 1033–1077.

BUTTERFIELD, D. A., KOPPAL, T., HOWARD, B., SUBRAMANIAM, R., HALL, N., HENSLEY, K., CARNEY, J. 1998. Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-tert-Butyl-alpha-phenylnitron and Vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 448–462.

BUTTERFIELD, S. M., AND LASHUEL, H. A. 2010. Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 5628-5654.

BWALA SA, GARDNER-THORPE C. 1989. Transient ischaemic attacks: a retrospective study of 43 cases. *Afr J Med Med Sci.*;18(3):177-80.

CABEZAS, R., AVILA, M. F., GONZÁLEZ, J., EL-BACHÁ, R. S., & BARRETO, G. E. 2014. PDGF-BB Protects Mitochondria from Rotenone in T98G Cells. *Neurotoxicity Research*, 27(4), 355–367.

ÇAKATAY, U., TELCI, A., KAYALÌ, R., TEKELI, F., AKÇAY, T., & SIVAS, A. 2001. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. *Experimental Gerontology*, 36(2), 221–229.

CALDERÓN FH, BONNEFONT A, MUÑOZ FJ, FERNÁNDEZ V, VIDELA LA, INESTROSA NC. 1999. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, and hydrogen peroxide. *J. Neurosci. Res.*, v. 56, p. 620-631.

CARLSSON A, LINDQVIST M, MAGNUSSON T. 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.*, 180(4596):1200.

CARRION, M. J. M.; VENTURIN, G. T.; DACOSTA, J. C. 2009. Potencial terapêutico das células-tronco da medulla óssea no tratamento da epilepsia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 112-119.

CARULLI D, PIZZORUSSO T, KWOK JC, PUTIGNANO E, POLI A, FOROSTYAK S, ANDREWS MR, DEEPA SS, GLANT TT, FAWCETT JW. 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain.*, 133, 2331-47.

CASTILLO GM, NGO C, CUMMINGS J, WIGHT TN, SNOW AD. 1997. Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (a beta) of Alzheimer's disease, accelerates a beta fibril formation, and maintains a beta fibril stability. *J Neurochem.* 69:2452–2465.

CHADE A, KASTEN M, TANNER CM. 2007. Epidemiology of Parkinson's disease. In: Dawson TM, editor. *Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis*. New York, USA: Informa Healthcare.

CHANG DT, REYNOLDS IJ. 2006. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons, *Prog. Neurobiol.*, 80, 241–268.

CHANG-LIU CM, WOLOSCHAK GE. 1997. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: Cell survival and gene expression. *Cancer Letters*, 113, 77–86.

CHARCOT JM, VULPIAN A. 1861. *Revue clinique: De la paralysie agitante, a` propos d'un cas tire´ de la clinique du Professeur Oppolzer. Gazette hebdomadaire de Me´decine et de Chirurgie*;8. 765-767/816-820/1863;9:54-59.

CHARCOT JM. 1879. *Lectures on the diseases of the nervous system*. Philadelphia: Henry C Lea.

CHARCOT, J M. 1893. The faith-cure. *The New review*; London Vol. 8, Ed. 44, 18-31.

CHENG A, HOU Y, MATTSON MP. 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2, e00045.

CHEUNG ST, MILLER MS, PACOMA R, ROLAND J, LIU J, SCHUMACHER AM, HSIEH-WILSON LC. 2017. Discovery of a Small-Molecule Modulator of Glycosaminoglycan Sulfation. *ACS Chemical Biology*, 12(12), 3126–3133.

CHONG, Z. Z., LI, F., MAIESE, K. 2005. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*. 75: 207-246.

- CICCHETTI, F., DROUIN-OUELLET, J., & GROSS, R. E. 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(9), 475–483.
- COCHRANE, C. G. 1991. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S23–S30.
- COHEN, J., SCOTT, R., ALIKANI, M. *et al.* 1998. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 269–280.
- COHLBERG JA, LI J, UVERSKY VN, FINK AL. 2002. Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry*. 41:1502–1511.
- COLE GJ, MCCABE CF. 1991. Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Curr Neuron.*, 7:6,1007-18.
- COLES CH, BRADKE F. 2015. Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol.*, 25:15, R677–R691.
- COLLINS, M. A., & NEAFSEY, E. J. 2002. Potential neurotoxic “agents provocateurs” in Parkinson's disease. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(5), 571–577.
- CONTI, M. M., CHAMBERS, N., BISHOP, C. 2018. A new outlook on cholinergic interneurons in Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 92, 67–82.
- COSTA DS, REIS RL, and PASHKULEVA I, 2017. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 19:1-26.
- COULOM H, BIRMAN S. 2004. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.*, 24(48):10993-8.
- CREMADES, N., COHEN, S. I., DEAS, E., ABRAMOV, A. Y., CHEN, A. Y., ORTE, A., SANDAL, M., CLARKE, R.W., DUNNE, P., APRILE, F. A., BERTONCINI, C. W., WOOD, N. W., KNOWLES, T. P., DOBSON, C. M., AND KLENERMAN, D. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alphasynuclein. *Cell* 149, 1048-1059
- CRESPO D, ASHER RA, LIN R, RHODES KE, FAWCETT JW., 2007. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol*. 206:159–171.
- CRISPO, J. A. G., ANSELL, D. R., PICHE, M., EIBL, J. K., KHAPER, N., ROSS, G. M., & TAI, T. C. 2010. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(4), 429–438.

CUI, F.Y.; LIN, T.; MA, F. 2002. The excess propagation and research on biological control of the water flea of zooplankton in raw water. *Journal HIT*, v. 34, n. 3, p. 399-403.

CUMASHI A, USHAKOVA NA, PREOBRAZHENS KAYA ME, D'INCECCO A, PICCOLI A, TOTANI L, TINARI N, MOROZEVICH GE, BERMAN AE, BILAN MI, *et al.* 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17, 541-552.

DAEUR W, PRZEDBORSKI S. 2003. Parkinson's disease. Mechanisms and models. *Revista Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889-909.

DE OLIVEIRA RM, MIRANDA VH, FRANCE LLE L, PINHO R, SZEGO EM, MARTINHO R, MUNARI F, LAZARO DF, MONIOT S, GUERREIRO P, FONSECA L, MARIJANOVIC Z, ANTAS P, GERHARDT E, ENGUITA FJ, FAUVET B, PENQUE D, PAIS TF, TONG Q, BECKER S, KUGLER S, LASHUEL HA, STEEGBORN C, ZWECKSTETTER M, OUTEIRO TF. 2017. The mechanism of sirtuin 2-mediated exacerbation of alpha-synuclein toxicity in models of Parkinson disease. *PLoS Biol.* 15, e2000374.

Dermatan sulfate—Substance Summary (SID 319085006). Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319085006#section=Top> (accessed on 9 October 2018).

DEXTER, D. T., CARTER, C. J., WELLS, F. R., JAVOY-AGID, F., AGID, Y., LEES, A., MARSDEN, C. D. 1989. Basal Lipid Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(2), 381–389.

DIAZ-NIDO J, WANDOSELL F, AVILA J. 2002. Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides*. 23:1323–1332.

DICK FD, DE PALMA G, AHMADI A, OSBORNE A, SCOTT NW, PRESCOTT GJ, BENNETT J, SEMPLE S, DICK S, MOZZONI P, *et al.* 2007. Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 64: 673–680.

DICK G, TAN CL, ALVES JN, EHLERT EM, MILLER GM, HSIEH-WILSON LC, SUGAHARA K, OOSTERHOF A, VAN KUPPEVELT TH, VERHAAGEN J, FAWCETT JW, KWOK JC. 2013. Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J Biol Chem*, 288:27384-27395.

DICKENDESHER TL, BALDWIN KT, MIRONOVA YA, KORIYAMA Y, RAIKER SJ, ASKEW KL, WOOD A, GEOFFROY CG, ZHENG B, LIEPMANN CD *et al.* 2012. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci*, 15:703-712.

DIETRICH CP. 1983. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian journal of medical and biological*

research= Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica. v.17, n.1, p.5-15.

DIETRICH KN, KRAFFT KM, BORNSCHEIN RL, HAMMOND PB, BERGER O, SUCCOP PA, *et al.* 1987. Low-level fetal lead exposure effect on neurobehavioral development in early infancy. *Pediatrics*.;80(5):721–730.

DIPLOCK, A. T., CHARULEUX, J.-L., CROZIER-WILLI, G., KOK, F. J., RICE-EVANS, C., ROBERFROID, M., VIÑA-RIBES, J. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S77.

DISCHE Z. 1946. Characteristic and sensitive color reaction of SH-compounds. *Fed Proc.*;5(1 Pt 2):132.

DITYATEV A, SCHACHNER M, SONDEREGGER P. 2010. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. Nov;11(11):735-46.

DORSEY ER, CONSTANTINESCU R, THOMPSON JP, BIGLAN KM, HOLLOWAY RG, KIEBURTZ K, *et al.* 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.*, 68(5):384-6.

DRINGEN R. 2000. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem.*;267(16):4903.

DUMAN RS, and NANXIN L. 2012. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.367, n.1601, p.2475-2484.

Edinger, A. L., & Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663–669.

EGEA, J., GARCÍA, A. G., VERGES, J., MONTELL, E., & LÓPEZ, M. G. 2010. Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S24–S27.

ELBAZ A, CARCAILLON L, KAB S, MOISAN F. 2015. Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue neurologique*. N.13.

ELBAZ A. 2007. Parkinson's disease and rural environment. *Rev Prat.*;57(11 Suppl):37-9.

ELBAZ, A., DUFOUIL, C., & ALPÉROVITCH, A. 2007. Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *Comptes Rendus Biologies*, 330(4), 318–328.

ELEFTERIOU F, EXPOSITO JY, GARRONE R, LETHIAS C. 2001. Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Letters*, 495(1-2), 44–47.

ESKO JD, ZHANG L. 1996. Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol.*;6(5):663-70.

ESKO JD. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Current opinion in cell biology*, v.3, n.5, p.805-816.

FAISSNER A, CLEMENT A, LOCHTER A, STREIT A, MANDL C, SCHACHNER M. 1994. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell. Biol.* 126, 783±799.

FEITOSA CM, DA SILVA OLIVEIRA GL, DO NASCIMENTO CAVALCANTE A, MORAIS CHAVES SK, RAI M. 2018. Determination of parameters of oxidative stress *in vitro* models of neurodegenerative diseases-A review. *Current Clinical Pharmacology, Curr Clin Pharmacol.* 2018;13(2):100-109.

FENG Y, JANKOVIC J, WU YC. 2015. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 349:3-9.

FERNANDEZ F, VANRYN J, OFOSU FA, HIRSH J, and BUCHANAN MR. 1986. The hemorrhagic and antithrombotic effects of dermatan sulfate. *British Journal of Haematology* 64, 309-317.

FERNAUD-ESPINOSA, I., NIETO-SAMPEDRO, M., BOVOLENTA, P., 1996. Developmental distribution of glycosaminoglycans in the embryo-nic rat brain: relationship to axonal tract formation. *J. Neurobiol* 30, 410±424.

FLEMING, S. M. 2017. Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease. *Current Environmental Health Reports*, 4(2), 192–199.

FOLLMER, CRISTIAN and BEZERRA NETTO, HELENO J. C. 2013. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. *Quím. Nova*, vol.36, n.2, pp.306-313.

FRANSSON LA, HAVSMARK B. 1970. Structure of dermatan sulfate. VII. The copolymeric structure of dermatan sulfate from horse aorta. *J Biol Chem.* 245: 4770–4783.

FRITZ TA, LUGEMWA FN, SARKAR AK, ESKO JD. 1994. Biosynthesis of heparan sulfate on beta-D-xylosides depends on aglycone structure. *J Biol Chem.*7;269(1):300-7.

FRITZ, T. A., AGRAWAL, P. K., ESKO, J. D., & KRISHNA, N. R. 1997. Partial purification and substrate specificity of heparan sulfate α -N-acetylglucosaminyltransferase I: synthesis, NMR spectroscopic characterization and *in vitro* assays of two aryl tetrasaccharides. *Glycobiology*, 7(5), 587–595.

GALLO, R. L. 2000. Proteoglycans and Cutaneous Vascular Defense and Repair. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 55–60.

GALTREY CM and FAWCETT JW. 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 54, 1–18.

GANDHI N S, and MANCERA RL. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482.

- GANGULY G, CHAKRABARTI S, CHATTERJEE U, SASO L. 2017. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume11, 797–810.
- GAO HM, HONG JS, ZHANG W, LIU B. 2002. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.*; 22:782–790.
- GAO HM, HONG JS, ZHANG W, LIU B. 2003. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J Neurosci.*;23(4):1228-36.
- GAO, H.-M., ZHOU, H., & HONG, J.-S. 2012. NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(6), 295–303.
- GARWOOD J, RIGATO F, HECK N, FAISSNER A, 2001. Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DDS-1-PG/ phosphacan--structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol Neurosci.* 19(1-2):51-64.
- GEORGE N, GELLER HM. 2018. Extracellular matrix and traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 96(4), 573–588.
- GILGUN-SHERKI, Y., MELAMED, E., & OFFEN, D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959–975.
- GIROTTI AW. 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med.*;1(2):87-95.
- GOEDERT M, JAKES R, SPILLANTINI MG, HASEGAWA M, SMITH MJ, CROWTHER RA. 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature.* 383:550–553.
- GOETZ CG. 1986. Charcot on Parkinson's disease. *Movement Disorders.*, 1(1):27-32.
- GOETZ CG. 2007. Early iconography of Parkinson's disease. In: Pahwa R, Lyons KE, editors. *Handbook of Parkinson's Disease*. New York, USA: Informa Healthcare.
- GOETZ CG. 2008. Charcot and Parkinson's disease. In: Factor SA, Weiner WJ, editors. *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management*. New York, USA: Demos Medical Publishin.
- GOETZ, C. G. 2009. Jean-Martin Charcot and his vibratory chair for Parkinson disease. *Neurology*, 73(6), 475–478.
- GOMEZ C, Bandez MJ, Navarro A. 2007 Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Frontiers in Bioscience* 12, 1079-1093.

GORDON-WEEKS PR. 2017. Phosphorylation of Drebrin and Its Role in Neuritogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1006:49-60.

GORDTS PLSM, ESKO JD. 2018. The heparan sulfate proteoglycan grip on hyperlipidemia and atherosclerosis. *Matrix Biology.*;71-72:262-282.

GÖTTING, C., MÜLLER, S., SCHÖTTLER, M., SCHÖN, S., PRANTE, C., BRINKMANN, T., KLEESIEK, K. 2004. Analysis of the DXD Motifs in Human Xylosyltransferase I Required for Enzyme Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42566–42573.

GREENAMYRE, J. T. 2004. BIOMEDICINE: Parkinson's--Divergent Causes, Convergent Mechanisms. *Science*, 304(5674), 1120–1122.

GROTEK B, WEHNER D, WEIDINGER G. 2013. Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development*, v.140, p.1412–1423.

GROTH I, GRUNEWALD N, and ALBAN S. 2009. Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides--comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. *Glycobiology* 19, 408-417.

GRUMET, M., FRIEDLANDER, D.R., SAKURAI, T., 1996. Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol* 3, 319±330.

GUERREIRO, R., ESCOTT-PRICE, V., DARWENT, L., PARKKINEN, L., ANSORGE, O., HERNANDEZ, D. G., BRAS, J. 2016. Genome-wide analysis of genetic correlation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Aging*, 38, 214.e7–214.e10.

GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. 1989. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.*;2(2):195-256.

GUZMAN, J. N., SANCHEZ-PADILLA, J., WOKOSIN, D., KONDAPALLI, J., ILIJIC, E., SCHUMACKER, P. T., & SURMEIER, D. J. 2010. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324), 696–700.

HACKER U, LIN X, PERRIMON N, 1997. The *Drosophila* sugarless gene modulates wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* 124, 3565± 3573.

HALLIWELL B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.*, 97(6):1634-58.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. 2007 Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4rd Edition, Oxford University Press, New York, pp.187-267.

- HAMBY, M. E., & SOFRONIEW, M. V. 2010. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*, 7(4), 494–506.
- HANISCH, F.-G. 2001. O-Glycosylation of the Mucin Type. *Biological Chemistry*, 382(2).
- HART, R. G., PEARCE, L. A., RAVINA, B. M., YALTHO, T. C., & MARLER, J. R. 2009. Neuroprotection trials in Parkinson's disease: Systematic review. *Movement Disorders*, 24(5), 647–654.
- HE W, CUI L, ZHANG C, ZHANG X, HE J, XIE Y, CHEN Y. 2017. Sonic hedgehog promotes neurite outgrowth of cortical neurons under oxidative stress: Involving of mitochondria and energy metabolism. *Experimental Cell Research*, 350(1), 83–90.
- HEINDRYCKX F, LI JP. 2018. Role of proteoglycans in neuro-inflammation and central nervous system fibrosis. *Matrix Biology*, 68-69, 589–601.
- HENCHCLIFFE C, BEAL MF. 2008. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.*, 4(11):600-9.
- HENSCH TK. 2005. "Critical period plasticity in local cortical circuits," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 11, pp. 877–888.
- HERNDON ME, LANDER AD. 1990. A diverse set of developmental regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron*. 4:949±961.
- HIGASHI, K., TAKEUCHI, Y., MUKUNO, A., TOMITORI, H., MIYA, M., LINHARDT, R.J., TOIDA, T., 2015. Composition of glycosaminoglycans in rasmobranchs including several deep-sea sharks: Identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. *PLoS ONE* 10(3), e0120860.
- HIKINO M, MIKAMI T, FAISSNER A, VILELA-SILVA AC, PAVÃO MS, SUGAHARA K. 2003. Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. *J Biol Chem*. 278: 43744–43754.
- HIRSCHBERG, C. B., & SNIDER, M. D. 1987. Topography of Glycosylation in The Rough Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 63–87.
- HIRSCHBERG, C. B., ROBBINS, P. W., & ABEIJON, C. 1998. Transporters of nucleotide sugars, atp, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 49–69.
- HOGLINGER, G. U., LANNUZEL, A., KHONDIKER, M. E., MICHEL, P. P., DUYNCKAERTS, C., FEGER, J., HIRSCH, E. C. 2005. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 930–939.
- HOLMES, B. B., DEVOS, S. L., KFOURY, N., LI, M., JACKS, R., YANAMANDRA, K., OUIDJA, M. O., BRODSKY, F. M., MARASA, J., BAGCHI, D. P., KOTZBAUER, P. T., MILLER, T. M., PAPY-GARCIA, D., AND DIAMOND, M. I. 2013. Heparan sulfate

proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3138-3147.

HONIG LS, ROSENBERG RN. 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med.* 108: 317-330.

HOOK M, KJELLEN L, and JOHANSSON S. 1984. Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 53:847-869.

HOOPEES JT, LIU X, XU X, DEMELER B, FOLTA-STOGNIEW E, LI C, HA Y. 2010. Caracterização estrutural do domínio E2 da APL-1, um homólogo de *Caenorhabditis elegans* da proteína precursora amilóide humana e seu local de ligação à heparina. *J Biol Chem.* v.285, n.3, p.2165-73.

HUBERT H. FERNANDEZ. 2012. Updates in the medical management of Parkinson disease. *cleveland clinic journal of medicine.*; volume 79. number 1.

HWANG, H.-Y., OLSON, S. K., ESKO, J. D., & ROBERT HORVITZ, H. 2003. *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis. *Nature*, 423(6938), 439-443.

IDA M, SHUO T, HIRANO K, TOKITA Y, NAKANISHI K, MATSUI F, AONO S, FUJITA H, FUJIWARA Y, KAJI T. *et al.* 2006. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 281:5982-5991.

IHSE, E., YAMAKADO, H., VAN WIJK, X. M., LAWRENCE, R., ESKO, J. D., & MASLIAH, E. 2017. Cellular internalization of alpha-synuclein aggregates by cell surface heparan sulfate depends on aggregate conformation and cell type. *Scientific Reports*, 7(1). *Sci Rep.* 2017 Aug 21;7(1):9008.

IMBERTY A, LORTAT-JACOB H, and PEREZ S. 2007. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342, 430-439.

ISHIHARA Y, KATAYAMA K, SAKABE M, KITAMURA M, AIZAWA M, TAKARA M, ITOH K. 2011. Antioxidant properties of rare sugar D-allose: Effects on mitochondrial reactive oxygen species production in Neuro2A cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6), 638-642.

IVERSEN DS, IVERSEN LL. 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in neuroscience*, v.30, n. 05, p.188-193.

IZUMIKAWA T, SATO B, KITAGAWA H. 2014. Chondroitin Sulfate Is Indispensable for Pluripotency and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, *Scientific Reports*, 4, 3701.

JADIYA, P., CHATTERJEE, M., SAMMI, S. R., KAUR, S., PALIT, G., & NAZIR, A. 2011. Sir-2.1 modulates "calorie-restriction-mediated" prevention of neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*: Implications for Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2), 306-310.

JANKOVIC J. 2008. Doença de Parkinson: características clínicas e diagnóstico. *Psychiatr*, v. 79, n. 4, p. 368-76.

- JENSEN K. 2003. Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struct*; 666:387-92.
- JIANG X, XU Q, DERTINGER SKW, STROOCK AD, FU TM. 2005. Whitesides, *Anal. Chem.*, 77, 2338.
- JIANG, Z.-Y., HUNT, J. V., & WOLFF, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389.
- JIANG, Z.-Y., WOOLLARD, A. C. S., & WOLFF, S. P. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26(10), 853–856.
- JORDAN, J. D., HE, J. C., EUNG DAMRONG, N. J., GOMES, I., ALI, W., NGUYEN, T., IYENGAR, R. 2005. Cannabinoid Receptor-induced Neurite Outgrowth Is Mediated by Rap1 Activation through G α i-triggered Proteasomal Degradation of Rap1GAP1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11413–11421.
- JU, C., GAO, J., HOU, L., WANG, L., ZHANG, F., SUN, F., ZHANG, C. 2017). Neuroprotective effect of chondroitin sulfate on SH-SY5Y cells overexpressing wild-type or A53T mutant α -synuclein. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 8721–8728.
- KADOMATSU K, & SAKAMOTO K. 2014. Sulfated glycans in network rewiring and plasticity after neuronal injuries. *Neuroscience research*. v.78, p.50-54.
- KAMBE Y, MIYATA A. 2016. Mitochondrial c-Fos May Increase the Vulnerability of Neuro2a Cells to Cellular Stressors. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59(1), 106–112.
- KANG, X., QIU, J., LI, Q., BELL, K. A., DU, Y., JUNG, D. W., JIANG, J. 2017. Cyclooxygenase-2 contributes to oxidopamine-mediated neuronal inflammation and injury via the prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *Scientific Reports*, 25;7(1):9459.
- KAPUSCINSKI, J. 1995. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233.
- KARAMANOU K, ESPINOSA DCE, FORTUNA-COSTA A, PAVÃO MSGF, 2017. Biological function of unique sulfated glycosaminoglycans in primitive chordates. *Glycoconjugate Journal* June, Volume 34, Issue 3, pp 277–283.
- KARIMI-ABDOLREZAEI S, BILLAKANTI R. 2012. Reactive astrogliosis after spinal cord injury: Beneficial and detrimental effects. *Mol. Neurobiol.*
- KASLIN J, GANZ MJ. 2008. Brain Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, v.363, p. 101–122.
- KEENER AM, BORDELON YM. 2016. Parkinsonism. *Semin Neurol*; 36:330–334.
- KEENEY PM, XIE J, CAPALDI RA, JR JPB. 2006. Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. *The Journal of Neuroscience.*, 26(19):5256-69.

- KEREVER A, YAMADA T, SUZUKI Y, MERCIER F and ARIKAWA-HIRASAWA E. 2015. Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle. *J. Chem. Neuroanat.* 66–67,52–60.
- KIKUCHI K, GUPTA V, WANG J, *et al.* 2011. *tcf21*⁺ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development (Cambridge, England)*. v.138, n.14, p.2895-2902.
- KIM CY, ALCALAY RN. 2017. Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Seminars in Neurology*. V. 37, N. 2.
- KING MK, PARDO M, CHENG Y, DOWNEY K, JOPE RS and BEUREL E. 2014. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol. Ther.* 141, 1–12
- KIRKMAN, H. N., ROLFO, M., FERRARIS, A. M., & GAETANI, G. F. 1999. Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13908–13914.
- KITAGAWA H, TSUTSUMI K, TONE Y, SUGAHARA K. 1997. Developmental regulation of the sulfation prole of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain. *J. Biol. Chem* 272, 31377±31381.
- KITAGAWA, H., SHIMAKAWA, H., & SUGAHARA, K. 1999. The Tumor Suppressor EXT-like Gene EXTL2 Encodes an α 1, 4-N-Acetylhexosaminyltransferase That Transfers N-Acetylgalactosamine and N-Acetylglucosamine to the Common Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13933–13937.
- KLAJNERT B, CORTIJO-ARELLANO M, BRYSZEWSKA M, and CLADERA J. 2006. Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 577-582.
- KLEBE, R. J., and RUDDLE, F. H., 1969. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J. Cell Biol.* 43, 69A.
- KLEENE R, and SCHACHNER M. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 195–208.
- KOIKE T, MIKAMI T, SHIDA M, HABUCHI O, KITAGAWA H. 2015. Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism, *Scientific Reports*, 5, 8994.
- KOOPMAN WJH, NIJTMANS LGJ, DIETEREN CEJ, ROESTENBERG P, VALSECCHI F, SMEITINK JAM, WILLEMS PHGM. 2010. Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(12), 1431–1470.
- KOZLOWSKI EO, PAVAO MSG, BORSIG L. 2011. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J. Thromb. Haemost.*, 9, 1807–1815.

KRESSE H, HAUSSER H, SCHÖNHERR E. 1993. Small proteoglycans. *Experientia*. May 15;49(5):403-16.

KRICHEN F, GHLISSI Z, BEN AMOR I, SAYARI N, KALLEL R, GARGOURI J, SAHNOUN Z, BOUDAWARA T, ELLOUZ-CHAABOUNI S, BOUGATEF A. 2018. Glycosaminoglycans from grey triggerfish and smooth hound skins: Rheological, Anti-inflammatory and wound healing properties. *Biomac. International Journal of Biological Macromolecules*; Vol 118, Part A, 15 October, Pages 965-975.

KRICHEN F, GHLISSI Z, BEN AMOR I, SAYARI N, KALLEL R, GARGOURI J, SAHNOUN Z, BOUDAWARA T, ELLOUZ-CHAABOUNI S, BOUGATEF A. 2017a. Purification and structural elucidation of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) skins and their anticoagulant and ACE inhibitory activities. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 45-53.

KRICHEN F, KARAOUD W, SAYARI A, SILA F, KALLEL S, ELLOUZ-CHAABOUNI A, BOUGATEF J. 2016. Antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the skin of ray *Raja montagui*. *Polym. Environ.* 24 (2), 166-175.

KRICHEN F, VOLPI N, SILA A, MACCARI F, MANTOVANI V, GALEOTTI F, ELLOUZ-CHAABOUNI S, BOUGATEF A. 2017b. Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from tunisian fish skins. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 32–39.

KRISHNASWAMY, V. R., BENBENISHTY, A., BLINDER, P., SAGI, I. 2019. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(16):3229-3248.

KROEHNE V, FREUDENREICH D, HANS S, KASLIN MJ. 2011. Brain Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors *Development*, v.138, p.4831–4841.

KWAKYE, G. F., JIMÉNEZ, J., JIMÉNEZ, J. A., & ASCHNER, M. 2018. Atropa belladonna neurotoxicity: Implications to neurological disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 116, 346–353.

KWAKYEA GF, MCMINIMYA RA and ASCHNER M. 2018. Disease-toxicant interactions in Parkinson's disease neuropathology. *Neurochem Res*; 42(6): 1772–1786.

KWOK JC, DICK G, WANG D, FAWCETT JW. 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol.* Nov;71(11):1073-89.

LAFONT F, ROUGET M, TRILLER A, PROCHIANTZ A, ROUSSELET A. 1992. *In vitro* control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development* 114, 17±29.

LAREMORE TN, LY M, ZHANG Z, SOLAKYILDIRIM K, MCCALLUM SA, OWENS RT, *et al.* 2010. Domain structure elucidation of human decorin glycosaminoglycans. *Biochem J.* 431: 199–205.

LÁZARO DF, PAVLOU MAS, OUTEIRO TF. 2017. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 298, 162–171.

LEE, P. H. A., TROWBRIDGE, J. M., TAYLOR, K. R., MORHENN, V. B., & GALLO, R. L. 2004. Dermatan Sulfate Proteoglycan and Glycosaminoglycan Synthesis Is Induced in Fibroblasts by Transfer to a Three-dimensional Extracellular Environment. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48640–48646.

LEES, A. J., HARDY, J., & REVESZ, T. 2009. Parkinson's disease. *The Lancet*, 373(9680), 2055–2066.

LEHRI-BOUFALA, S., OUIDJA, M.-O., BARBIER-CHASSEFIÈRE, V., HÉNAULT, E., RAISMAN-VOZARI, R., GARRIGUE-ANTAR, L., MORIN, C. 2015. New Roles of Glycosaminoglycans in α -Synuclein Aggregation in a Cellular Model of Parkinson Disease. *PLOS ONE*, 10(1), e0116641.

LEVY A, JOAQUIM F. 2003. *Doença de Parkinson: manual prático*. 2 ed. São Paulo: Manole.

LI F, SHETTY AK, and SUGAHARA K, 2008. Neuritogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver: Involvement of the pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 282, 2956–2966.

LI HP, KOMUTA Y, KIMURA-KURODA J, VAN KUPPEVELT TH and KAWANO H. 2013. Roles of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in the Formation of a Lesion Scar and Axonal Regeneration after Traumatic Injury of the Mouse Brain. *journal of neurotrauma*. v.30, p.413–425, March 1.

LI P, MATSUNAGA K, YAMAKUNI T, OHIZUMI Y. 2002. Picrosides I and II, selective enhancers of the mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the action of neuritogenic substances on PC12D cells. *Life Sci.* 71, 1821–1835.

LI Q, WU X, NA X, GE B, WU Q, GUO X, LI S. 2019. Impaired Cognitive Function and Altered Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Lacking Dermatan Sulfotransferase Chst14/D4st1. *Front Mol Neurosci.*, 11;12:26.

LI, J.-H., LI, S., ZHI, Z.-J., YAN, L.-F., YE, X.-Q., DING, T., YAN, L., LINHARDT, R., CHEN, S.-G., 2016. Depolymerization of Fucosylated Chondroitin Sulfate with a Modified Fenton-System and Anticoagulant Activity of the Resulting Fragments. *Marine Drugs* 14(9), 170.

LIDHOLT, K., & LINDAHL, U. 1992. Biosynthesis of heparin. The d-glucuronosyl- and N-acetyl-d-glucosaminyltransferase reactions and their relation to polymer modification. *Biochemical Journal*, 287(1), 21–29.

LIDHOLT, K., RIESENFELD, J., JACOBSSON, K. G., FEINGOLD, D. S., & LINDAHL, U. 1988. Biosynthesis of heparin. Modulation of polysaccharide chain length in a cell-free system. *Biochemical Journal*, 254(2), 571–578.

- LIGUORI, I, RUSSO G, CURCIO F, BULLI G, ARAN L, DELLA-MORTE D, ABETE P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 757–772.
- LIN, M. T., & BEAL, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787–795.
- LINHARDT RJ, AI-HAKIM A, LIU J, HOPPENSTEADT D, MASCELLANI G, BIANCINI P and FAREED J. 1991. Structural features of dermatan sulfate and their relationship to anticoagulant and antithrombotic activities. *Biochem. Pharm.* 42, (Suppl I) 1609-1619.
- LITWACK ED, IVINS JK, KUMBASAR A, PAINE-SAUNDERS S, STIPP CS, LANDER AD. 1998. Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev. Dyn* 211, 72± 87.
- LIU, C.-C., ZHAO, N., YAMAGUCHI, Y., CIRRITO, J. R., KANEKIYO, T., HOLTZMAN, D. M., BU, G. 2016. Neuronal heparan sulfates promote amyloid pathology by modulating brain amyloid- β clearance and aggregation in Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(332), 332ra44–332ra44.
- LIU Y, PETERSON D.A, KIMURA H, SCHUBERT D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.*; 69:581–593.
- LIU, B., GAO, H.-M., & HONG, J.-S. 2003. Parkinson's Disease and Exposure to Infectious Agents and Pesticides and the Occurrence of Brain Injuries: Role of Neuroinflammation. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 1065–1073.
- LOPES FM, BRISTOT IJ, DA MOTTA LL, PARSONS RB, KLAMT F. 2017. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic *In vitro* Models. *NeuroMolecular Medicine*, 19(2-3), 241–255.
- LUCHTMAN DW, SONG C. 2010. Why SH-SY5Y cells should be differentiated. *Neurotoxicology*, 31, 164–165.
- LYON, M, DEAKIN JA, RAHMOUNE H, FERNIG DG, NAKAMURA T, and GALLAGHER JT, 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.*, 273, 271–278.
- MACCARANA M, KALAMAJSKI S, KONGSGAARD M, MAGNUSSON SP, OLDBERG A, MALMSTRÖM A. 2009. Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol Cell Biol.* 29: 5517–5528.
- MAEDA N, FUKAZAWA N, ISHII M, 2010. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Front Biosci.* 15:626–644.
- MAEDA N. 2015. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci.* 2015 Mar 23; 9:98.

MAILLOUX RJ. 2015. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol* 4:381–398.

MAÏZA, A., CHANTEPIE, S., VERA, C., FIFRE, A., HUYNH, M. B., STETTLER, O., PAPY-GARCIA, D. 2018. The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Letters*. Dec;592(23):3806-3818.

MALAVAKI C, MIZUMOTO S, KARAMANOS N, SUGAHARA K, 2008. Recent Advances in the Structural Study of Functional Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in Health and Disease. *Connective Tissue Research*, 49:133–139.

MALMSTRÖM, A., BARTOLINI, B., THELIN, M. A., PACHECO, B., & MACCARANA, M. 2012. Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(12), 916–925.

MANDON E, KEMPNER ES, ISHIHARA M, HIRSCHBERG CB. 1994. A monomeric protein in the Golgi membrane catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation of heparan sulfate. *J Biol Chem.*; 269(16):11729-33.

MANIGANDAN V, NATARAJ J, KARTHIK R, MANIVASAGAM T, SARAVANAN R, THENMOZHI AJ, GUILLEMIN GJ. 2018. Low Molecular Weight Sulfated Chitosan: Neuroprotective Effect on Rotenone-Induced *In vitro* Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research.*, (3):505-515.

MANJUNATH, M. J., & MURALIDHARA. 2013. Standardized extract of *Withania somnifera* (Ashwagandha) markedly offsets rotenone-induced locomotor deficits, oxidative impairments and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1971–1981.

MANYAM BV. 1990. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. *Mov Disord.*, 5(1):47-8.

MAQSOOD MI, MATIN MM, BAHRAMI AR, GHASROLDASHT MM. 2013. Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. *Cell Biology International*, 37, 1038–1045.

MARNETT LJ. 2000. Cyclooxygenase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol.*; 4(5):545-52.

MATHEWS MB. 1975. Connective tissue macromolecular structure and evolution. *Molecular biology, biochemistry, and biophysics*, n. 19, p. 1.

MATTSON MP. 2007. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem. Res.*, 32, 707–715.

MAYEUX R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.*, 26:81-104.

MAZZIO, E. A., REAMS, R. R., & SOLIMAN, K. F. A. 2004. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine *in vitro*. *Brain Research*, 1004(1-2), 29–44.

- MAZZIO, E., & SOLIMAN, K. F. 2003. d-(+) -Glucose rescue against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity through anaerobic glycolysis in neuroblastoma cells. *Brain Research*, 962(1-2), 48–60.
- MCCORMICK ML, BUETTNER GR, BRITIGAN BE. 1998. Endogenous superoxide dismutase levels regulate iron-dependent hydroxyl radical formation in *Escherichia coli* exposed to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.*; 180(3):622-5.
- MCCORMICK ML, DENNING GM, RESZKA KJ, BILSKI P, BUETTNER GR, RASMUSSEN GT, RAILSBACK MA, BRITIGAN BE. 2000. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J.*; 350 Pt 3:797-804.
- MCLAUGHLIN RW, DE STIGTER JK, SIKKINK LA, BADEN EM, RAMIREZ-ALVARADO M. 2006. The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. *Protein Sci.*; 15: 1710-1722.
- MECOLLARI V, NIEUWENHUIS B, VERHAAGEN J. 2014. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front Cell Neurosci*, 8:328.
- MEHRA, S., GHOSH, D., KUMAR, R., MONDAL, M., GADHE, L. G., DAS, S., MAJI, S. K. 2018. Glycosaminoglycans have variable effects on α -synuclein aggregation and differentially affect the activities of the resulting amyloid fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), 12975–12991.
- MILISAV I, RIBARIČ S, POLJSAK B. 2018. Antioxidant Vitamins and Ageing. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 1–23.
- MILLER JD, GANAT YM, KISHINEVSKY S, BOWMAN RL, LIU B, TU EY, MANDAL PK, VERA E, SHIM JW, KRIKS S, TALDONE T, FUSAKI N, TOMISHIMA MJ, KRAINC D, MILNER TA, ROSSI DJ, STUDER L. 2013. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13, 691–705.
- MILLER, G. M., & HSIEH-WILSON, L. C. 2015. Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans. *Experimental Neurology*, 274, 115–125.
- MILLER, S., YASUDA, M., COATS, J. K., JONES, Y., MARTONE, M. E., & MAYFORD, M. 2002. Disruption of Dendritic Translation of CaMKII α Impairs Stabilization of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Neuron*, 36(3), 507–519.
- MITSUNAGA C, MIKAMI T, MIZUMOTO S, FUKUDA J, SUGAHARA K, 2006. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains in the development of cerebellum.
- MIYAKE N, KOSHO T, MIZUMOTO S, FURUICHI T, HATAMOCHI A, NAGASHIMA Y, ARAI E, TAKAHASHI K, KAWAMURA R, WAKUI K, TAKAHASHI J, KATO H, YASUI H, ISHIDA T, OHASHI H, NISHIMURA G, SHIINA M, SAITSU H, TSURUSAKI Y, DOI H, FUKUSHIMA Y, IKEGAWA S, YAMADA S, SUGAHARA K, MATSUMOTO

N. 2010. Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mutat.* 31, 966–974.

MIYATA S and KITAGAWA H. 2017. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Send to Biochim Biophys Acta.* Oct;1861(10):2420-2434.

MIZUMOTO S and SUGAHARA K, 2012. “Bone and skin disorders caused by a disturbance in the bioynthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate,” in *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, N. Karamanos, Ed., pp. 97–118, Walter de Gruyter, Berlin, Germany.

MIZUMOTO S, YAMADA S, SUGAHARA K. 2015. Molecular interactions between chondroitin–dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 34, 35–42.

MIZUMOTO, S., FONGMOON, D., & SUGAHARA, K. 2012. Interaction of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from various biological sources with heparin-binding growth factors and cytokines. *Glycoconjugate Journal*, 30(6), 619–632.

MOHAN V, WYATT EV, GOTTHARD I, PHEND KD, DIESTEL S, DUNCAN BW, WEINBERG RJ, TRIPATHY A, and MANESS PF. 2018. Neurocan Inhibits Semaphorin 3F Induced Dendritic Spine Remodeling Through NrCAM in Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.*; Vol. 12, N. 346.

MONAGHAN JR, MADEN M. 2012. Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotls during limb development and regeneration. *Dev. Biol.* v. 368, p.63–75.

MONSERRAT JM, GERACITANO LA, PINHO GL, VINAGRE TM, FALEIROS M, ALCIATI JC, BIANCHINI A. 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch Environ Contam Toxicol.*; 45(2):177-83.

MOORE DJ, WEST AB, DAWSON VL, DAWSON TM. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson’s disease. *Annu Rev Neurosci.*; 28:57–87.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.

MOTAMEDI-SHAD, N., MONSELLIER, E., TORRASSA, S., RELINI, A., AND CHITI, F. 2009. Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate: faster unfolding and change of pathway. *J Biol Chem* 284, 29921-29934.

MULLOY B. 2005. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An. Acad. Bras.Ciênc.*77, 651–664.

MURPHY, A. N. 2009. In a flurry of PINK, mitochondrial bioenergetics takes a leading role in Parkinson’s disease. *EMBO Molecular Medicine*, 1(2), 81–84.

NADANAKA S, CLEMENT A, MASAYAMA K, FAISSNER A. and SUGAHARA K. 1998. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from

shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. *J. Biol. Chem.* 273, 3296–3307.

NADANAKA S, KINOUCI H, TANIGUCHI-MORITA K, TAMURA J, KITAGAWA H. 2011. Down-regulation of chondroitin 4-Osulfotransferase-1 by Wnt signaling triggers diffusion of Wnt-3a. *J Biol Chem*, 286:4199-4208.

NAGATSU, T. 2008. Simple Photometric Assay of Dopamine- -Hydroxylase Activity in Human Blood: Useful in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry*, 55(1), 193–194.

NAKASE I, TADOKORO A, KAWABATA N, TAKEUCHI T, KATOH H, *et al.* 2007. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46: 492–501.

NAMSI, A., NURY, T., HAMDOUNI, H., YAMMINE, A., VEJUX, A., VERVANDIER-FASSEUR, D., LIZARD, G. 2018. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Diseases*, 6(3), 67.

NANDINI CD, ITOH N, SUGAHARA K. 2005. Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogenous injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 28116–28121 factors. *J. Biol. Chem.* 280, 4058–4069.

NANDINI CD, MIKAMI T, OHTA M, ITOH N, AKIYAMA-NAMBU F, SUGAHARA K. 2004. Structural and functional characterization of oversulfated chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from the notochord of hagfish. *J. Biol. Chem.* 279, 50799–50809.

NANDINI CD, SUGAHARA K. 2006. Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv. Pharmacol.* 53, 253–279.

NANDIPATI S and LITVAN I. 2016. Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 881.

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 1298 p.

NICHOLSON G, PEREIRA AC, HALL GM. 2002. Parkinson's disease and Anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, v. 89, n. 06, p. 904-16.

NIEDZIELSKA E, SMAGA I, GAWLIK M, MONICZEWSKI A, STANKOWICZ P, PERA J, FILIP M. 2015. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4094–4125.

NORDBERG, J., & ARNÉR, E. S. J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287–1312.

NORGARD-SUMNICHT, K., & VARKI, A. 1995. Endothelial Heparan Sulfate Proteoglycans That Bind to L-Selectin Have Glucosamine Residues with Unsubstituted Amino Groups. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12012–12024.

NUSSBAUM RL. 2017. The Identification of Alpha -Synuclein as the First Parkinson Disease Gene. *J Parkinsons Dis* 7, S45-S51.

NUYTEMANS K, THEUNS J, CRUTS M, BROECKHOVEN CV. 2010. Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: A Mutation Update. *HUMAN MUTATION*. V. 31, n. 7, 763–780.

OKAJIMA, T., YOSHIDA, K., KONDO, T., & FURUKAWA, K. 1999. Human Homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 Gene Is Galactosyltransferase I Involved in the Biosynthesis of the Glycosaminoglycan-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22915–22918.

OLMSTED, J. B., CARLSON, K., KLEBE, R., RUDDLE, F., & ROSENBAUM, J. 1970. Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65(1), 129–136.

OOHIRA A, MATSUI F, KATOH-SEMBA R. 1991. Inhibitory effects of brain chondroitin sulfate proteoglycans on neurite outgrowth from PC12D cells. *J Neurosci.*;11(3):822-7.

OOHIRA, A., MATSUI, F., TOKITA, Y., YAMAUCHI, S., & AONO, S. 2000. Molecular Interactions of Neural Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Brain Development. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(1), 24–34.

OYEWOLE AO, BIRCH-MACHIN MA. 2015. Mitochondria-targeted antioxidants. *The FASEB Journal*, 29(12), 4766–4771.

PAN T, RAWAL P, WU Y, XIE W, JANKOVIC J, LE W. 2010. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience.*, 164(2):541-51.

PANIKASHVILI D, SIMEONIDOU C, BEN-SHABAT S, HANUS L, BREUER A, MECHOULAM R, SHOHAMI E. 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, v. 413, p. 527-531.

PAN-MONTOJO, F., ANICHTCHIK, O., DENING, Y., KNELS, L., PURSCHE, S., JUNG, R., FUNK, R. H. W. 2010. Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intragastric Administration of Rotenone in Mice. *PLoS ONE*, 5(1), e8762.

PARK,C. *et al.* 2014. Effects of pro-apoptotic Bcl-2 on morin-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *European Journal of Cancer*, v.50, p.S45.

PARKINSON J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*Spring; 14(2):223-36; discussion 2.

PATEL, F. 2011. Pesticidal suicide: Adult fatal rotenone poisoning. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 18(7), 340–342.

PAVÃO MS, MOURÃO PA, MULLOY B, TOLLEFSEN DM. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem*. 270: 31027–31036.

PAVÃO MS. 1996. Unique sulfated polysaccharides from ascidians (Chordata, Tunicata). *Braz J Med Biol Res.*; 29(9):1227-33.

PAVÃO MS. 2014. Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol.*; 4:123.

PAVÃO MSG, AIELLO KR, WERNECK CC, SILVA LC, VALENTE A-P, MULLOY B, COLWELL NS, TOLLEFSEN DM, MOURÃO PAS, 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 273: 27848–27857.

PAVÃO, M. S. G., MOURÃO, P. A. S., MULLOY, B., & TOLLEFSEN, D. M. 1995. A Unique Dermatan Sulfate-like Glycosaminoglycan from Ascidian: *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 31027–31036.

PAVÃO, M. S. G., RODRIGUES, M. A., & MOURÃO, P. A. S. 1994. Acidic polysaccharides of the ascidian *Styela plicata*. Biosynthetic studies on the sulfated I-galactans of the tunic, and preliminary characterization of a dermatan sulfate-like polymer in body tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1199(3), 229–237.

PENC SF, POMAHAC B, WINKLER T, DORSCHNER RA, ERIKSSON E, HERNDON M and GALLO R L. 1998. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem*. 273, 28116-28121.

PERFEITO, R., CUNHA-OLIVEIRA, T., & REGO, A. C. 2012. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease—resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(9), 1791–1806.

PERFEITO, R., LÁZARO, D. F., OUTEIRO, T. F., & REGO, A. C. 2014. Linking alpha-synuclein phosphorylation to reactive oxygen species formation and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 62, 51–59.

PEROSA SR, PORCIONATTO MA, CUKIERT A, MARTINS JR, PASSEROTI CC, AMADO D, MATAS SL, NADER HB, *et al*. 2002. Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res. Bull*. 58 (5), 509-516.

PETZINGER GM, JAKOWEC M. 2007. Animal models. In: Pahwa R, Lyons KE, editors. *Handbook of Parkinson's Disease*. New York, USA: Informa Healthcare.

PEVNY LH, NICOLIS SK. 2009. Sox2 roles in neural stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 421-424.

PICKRELL AM and YOULE RJ. 2015. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron*, 85(2), 257–273.

PILLER F, HANLON MH, HILL RL. 1983. Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem.*; 258(17):10774-8.

PINHAL, M. A., TRINDADE, E. S., FAREED, J., DIETRICH, C. P., & NADER, H. B. 2001. Heparin and a Cyclic Octaphenol-Octasulfonic Acid (GL-522-Y-1) Bind with High Affinity to a 47-kDa Protein From Vascular Endothelial Cell Surface and Stimulate the Synthesis and Structural Changes of Heparan Sulfate Proteoglycan. *Thrombosis Research*, 103(1), 35–45.

PISOSCHI AM, POP A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

PIZZORUSSO T, MEDINI P, BERARDI N, CHERZI S, FAWCETT JW, and MAFFEI L. 2002. "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex," *Science*, vol. 298, no. 5596, pp. 1248– 1251.

POEWE W, SEPPI K, TANNER CM, HALLIDAY GM, BRUNDIN P, VOLKMANN J, SCHRAG AE and LANG AE. 2017. Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013.

POLO, V., DOMINGO, L. R., & ANDRÉS, J. 2005. Toward an Understanding of the Catalytic Role of Hydrogen-Bond Donor Solvents in the Hetero-Diels–Alder Reaction between Acetone and Butadiene Derivative. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(45), 10438–10444.

POLYMEROPOULOS, M. H. 1997. Mutation in the -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047.

POMIN VH. 2015. Sulfated glycans in inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 353-369.

PRINGSHEIM T, JETTE N, FROLKIS A, STEEVES TD. 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 29:1583-90.

PRINZ RD, WILLIS CM, VAN KUPPEVELT TH, KLUPPEL M. 2014. Biphasic role of chondroitin sulfate in cardiac differentiation of embryonic stem cells through inhibition of Wnt/b-catenin signaling. *PLoS One*, 9:e92381.

PROCHIANTZ A. 1995. Neuronal Polarity: Giving Neurons, Heads and Tails *Neuron* 15, 743-746.

PRZEDBORSKI, S. 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 11, S3–S7.

PURUSHOTHAMAN GR, MARION K, LI VA, CASAGRANDE. 2012. Gating and control of primary visual cortex by pulvinar *Nat. Neurosci.* 15: pp. 905-912.

PUSCHMANN A. 2017. New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17: 66.

PUSPITA L, CHUNG SY, SHIM J. 2017. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, 10(1).

QUENTIN, E., GLADEN, A., RODEN, L., & KRESSE, H. 1990. A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(4), 1342–1346.

RADAD, K., RAUSCH, W.-D., & GILLE, G. 2006. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International*, 49(4), 379–386.

RAHA S, ROBINSON BH. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.*; 25(10):502-8.

RAMACHANDRA R, NAMBURI RB, DUPONT ST, ORTEGA-MARTINEZ O, KUPPEVELT VTH, LINDAH U, SPILLMANN D. 2017. A potential role for chondroitin sulfate/dermatan sulfate in arm regeneration in *Amphiuira filiformis*. *Glycobiology*. 27(5):438-449.

RANI, A., BARUAH, R., & GOYAL, A. 2017. Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 159, 11–19.

REALE, M., IARLORI, C., THOMAS, A., GAMBI, D., PERFETTI, B., DI NICOLA, M., & ONOFRJ, M. 2009. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 55–63.

REICHMANN H. 2017. Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 33(5), 526–534.

REICHSMAN, F., SMITH, L., and CUMBERLEDGE, S. 1996. Glycosaminoglycans Can Modulate Extracellular Localization of the wingless Protein and Promote Signal Transduction. *J. Cell Biol.* 135, 819–827

RICHARDSON JR, FITSANAKIS V, WESTERINK RHS, KANTHASAMY AG. 2019. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*.

RIO, S., BEAU, J.-M., & JACQUINET, J.-C. 1991. Synthesis of glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of proteoglycans. *Carbohydrate Research*, 219, 71–90.

RIZZI, G., TAN, K. R. 2017. Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neural Circuits*, 11.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. 2010. *Bases patológicas das doenças*. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier.

ROHRMANN, K., NIEMANN, R., & BUDECKE, E. 1985. Two N-acetylgalactosaminyltransferase are involved in the biosynthesis of chondroitin sulfate. *European Journal of Biochemistry*, 148(3), 463–469.

ROSEN DR, SIDDIQUE T, PATTERSON D, FIGLEWICZ DA, SAPP P, HENTATI A, DONALDSON D, GOTO J, O'REGAN JP, DENG HX, *et al.* 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature* 362, 59–62.

ROSENBERG, M., AZEVEDO, N. F., & IVASK, A. 2019. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*, 9(1).

ROWLANDS G, KHAZAEZADEH N, OTENG-NTIM E, SEED P, BARR S, WEISS BD. 2013. Development and validation of a measure of health literacy in the UK: the newest vital sign. *BMC Public Health*. N.13, p.116.

RUBINSZTEIN, D. C. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), 780–786.

SAHA N, KOLEV M, NIKOLOV DB. 2014. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neurosci Res*, 87:1-7.

SAHU S, LI R, LOERS G, SCHACHNER M. 2019. Knockdown of chondroitin-4-sulfotransferase-1, but not of dermatan-4-sulfotransferase-1, accelerates regeneration of zebrafish after spinal cord injury. *FASEB J*. 33, 2252–2262.

SAKAI S, KIM WS, LEE IS, KIM YS, NAKAMURA A, TOIDA T, *et al.* 2003. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. *Carbohydr Res*. 338: 263–269.

SAMII A, NUTT JG, RANSOM BR. 2004. Parkinson's disease. *The Lancet*, v. 363, p. 1783-93.

SANDERS LH, PAUL KC, HOWLETT EH, LAWAL H, BOPPANA S, BRONSTEIN JM, RITZ B AND GREENAMYRE JT. 2017. Base Excision Repair Variants and Pesticide Exposure Increase Parkinson's Disease Risk. *Toxicological sciences*, 158(1), 188–198.

SANDERS, L. H., LAGANIÈRE, J., COOPER, O., MAK, S. K., VU, B. J., HUANG, Y. A., SCHÜLE, B. 2014. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: Reversal by gene correction. *Neurobiology of Disease*, 62, 381–386.

SANT S, HANCOCK MJ, DONNELLY JP, IYER D, KHADEMHOSEINI A. 2010. Biomimetic gradient hydrogels for tissue engineering. *Can J Chem Eng*. Dec;88(6):899-911.

SARAFIAN, T. A., MONTES, C., IMURA, T., QI, J., COPPOLA, G., GESCHWIND, D. H., & SOFRONIEW, M. V. 2010. Disruption of Astrocyte STAT3 Signaling Decreases Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress In Vitro. *PLoS ONE*, 5(3), e9532.

SARKAR S, RAYMICK J, IMAM S. 2016. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 904.

SASARMAN F, MAFTEI C, CAMPEAU PM, BRUNEL-GUITTON C, MITCHELL GA, ALLARD P. 2015. Biosynthesis of glycosaminoglycans: associated disorders and biochemical tests. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 39(2), 173–188.

SCHAPIRA, A. H. V. 2010. Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, 224(2), 331–335.

SCHAPIRA, A. H., & JENNER, P. 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049–1055.

SCHETTLER V, METHE H, STASCHINSKY D, SCHUFF-WERNER P, MÜLLER GA, WIELAND E. 1999. The oxidant/antioxidant balance during regular low density lipoprotein apheresis. *Ther. Apher.*, 3, 219–226.

SCHOLZ D, PO"LT L D, GENEWSKY A, *et al.* 2011. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *Journal of Neurochemistry*, 119, 957–971.

SCHÖN, S., PRANTE, C., BAHR, C., KUHN, J., KLEESIEK, K., & GÖTTING, C. 2006. Cloning and Recombinant Expression of Active Full-length Xylosyltransferase I (XT-I) and Characterization of Subcellular Localization of XT-I and XT-II. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14224–14231.

SCHULTHEIS, P. J., FLEMING, S. M., CLIPPINGER, A. K., LEWIS, J., TSUNEMI, T., GIASSON, B., SHULL, G. E. 2013. Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited α -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 2067–2082. doi:10.1093/hmg/ddt057

SCHWARTZ NB, DOMOWICZ MS. 2018. Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Letters*. doi:10.1002/1873-3468.13026

SCOTT, T. L., WICKER, C. A., SUGANYA, R., DHAR, B., PITTMAN, T., HORBINSKI, C., & IZUMI, T. 2016. Polyubiquitination of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 by Parkin. *Molecular Carcinogenesis*, 56(2), 325–336.

SEO, N.-S., HOCKING, A. M., HÖÖK, M., & MCQUILLAN, D. J. 2005. Decorin Core Protein Secretion Is Regulated by N-Linked Oligosaccharide and Glycosaminoglycan Additions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42774–42784.

SHAO B, WANG S, ZHOU J, KE L, RAO P. 2011. A novel lectin from fresh rhizome of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. *Process Biochemistry*, v.46, p.554–1559.

SHARRAD, D. F., DE VRIES, E., BROOKES, S. J. H. 2012. Selective expression of α -synuclein-immunoreactivity in vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axons in the guinea pig rectum and human colon. *Journal of Comparative Neurology*, 521(3), 657–676.

SHEARMAN, M. S., RAGAN, C. I., & IVERSEN, L. L. 1994. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), 1470–1474.

SHELDON ADLER and DONALD S. FRALEY. 1977. Potassium and intracellular pH. *Kidney International*, Vol. 11(1977), pp. 433-442.

SHEN Y, TENNEY AP, BUSCH SA, HORN KP, CUASCUT FX, LIU K, HE Z, SILVER J, FLANAGAN JG. 2009. PTPs is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science*, 326:592-596.

SHEN Y. 2014. Traffic lights for axon growth: proteoglycans and their neuronal receptors. *Neural Regen Res* 2014, 9:356-3561.

SHERER TB, BETARBET R, TESTA CM, *et al.* 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci.*; 23:10756–10764.

SHIVELY, J. E., and CONRAD, H. E. 1976. Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry* 15: 3932-3942.

SIES H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.*; 82(2):291-5.

SILVER MJ, KESSLER NJ, HENNIG BJ, DOMINGUEZ-SALAS P, LARITSKY E, BAKER MS, *et al.* 2015. Independent genomewide screens identify the tumor suppressor *VTRNA2-1* as a human epiallele responsive to periconceptual environment. *Genome Biology*; v.16, p.118.

SINGH S, AHMAD R, MATHUR D, SAGAR RK, KRISHANA B. 2006. Neuroprotective effect of BDNF in young and aged 6-OHDA treated rat model of Parkinson disease. *Indian J Exp Biol.*; 44(9):699-704

SINGH, S., & DIKSHIT, M. 2007. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide. *Brain Research Reviews*, 54(2), 233–250.

SOARES DA COSTA, D., REIS, R. L., & PASHKULEVA, I. 2017. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19(1), 1–26.

SOBEL RA. 2001. The extracellular matrix in multiple sclerosis: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 603-609.

SOLEMAN S, FILIPPOV MA, DITYATEV A, FAWCETT JW. 2013. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience*. Dec 3; 253:194-213.

SOLIMAN, Y., JACKSON, T., MAZZIO, E., & SOLIMAN, K. F. A. 2008. The Effects of Piroxicam in the Attenuation of MPP+/MPTP Toxicity *In vitro* and *In vivo* . *Neurochemical Research*, 34(2), 304–310.

SPRENGER F, POEWE W. 2013. Management of Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *CNS drugs*, v. 27, n. 4, p. 259-272.

STADTMAN, E. R., & LEVINE, R. L. 2006. Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191–208.

STEEN, P. V. DEN, RUDD, P. M., DWEK, R. A., & OPDENAKKER, G. 1998. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(3), 151–208.

STEWART, V. C., STONE, R., GEGG, M. E., SHARPE, M. A., HURST, R. D., CLARK, J. B., & HEALES, S. J. R. 2002. Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *Journal of Neurochemistry*, 83(4), 984–991.

STOJKOVSKA, I., KRAINIC, D., & MAZZULLI, J. R. 2017. Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, 373(1), 51–60.

STUTZMANN, J.-M., MARY, V., WAHL, F., GROSJEAN-PIOT, O., UZAN, A., & PRATT, J. 2006. Neuroprotective Profile of Enoxaparin, a Low Molecular Weight Heparin, in *In vivo* Models of Cerebral Ischemia or Traumatic Brain Injury in Rats: a Review. *CNS Drug Reviews*, 8(1), 1–30.

SUBRAMANIAM, S. R., & CHESSELET, M.-F. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 106-107, 17–32.

SUDATI, J. H., VIEIRA, F. A., PAVIN, S. S., DIAS, G. R. M., SEEGER, R. L., GOLOMBIESKI, R., BARBOSA, N. V. 2013. Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*, 37, 118–126.

SUGAHARA K, MIKAMI T, 2007. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol*. 17:536–545.

SUGAHARA K. 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), 612–620.

SUGUMARAN, G., KATSMAN, M., & SILBERT, E. J. 1998. Subcellular co-localization and potential interaction of glucuronosyltransferases with nascent proteochondroitin sulphate at Golgi sites of chondroitin synthesis. *Biochemical Journal*, 329(1), 203–208.

SULZER, D. 2007. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 244–250.

SUTHERLAND, G., MELLICK, G., SUE, C., CHAN, D. K. Y., ROWE, D., SILBURN, P., & HALLIDAY, G. 2007. A functional polymorphism in the parkin gene promoter affects the age of onset of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 414(2), 170–173.

SWANN DA. 1968. Studies on hyaluronic acid. I. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta.*; 156(1):17-30.

SWARNKAR S, GOSWAMI P, KAMAT PK, GUPTA S, PATRO IK, SINGH S, NATH C. 2012. Rotenone-induced apoptosis and role of calcium: a study on NEURO-2A cells. *Archives of Toxicology*, 86(9), 1387–1397.

TAMILSELVAM, K., BRAIDY, N., MANIVASAGAM, T., ESSA, M. M., PRASAD, N. R., KARTHIKEYAN, S., GUILLEMIN, G. J. 2013. Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–11.

TANAKA EM, FERRETTI P. 2009. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, n.10, p.713-723.

TANNER CM, OTTMAN R, GOLDMAN SM, ELLENBERG J, CHAN P, MAYEUX R, LANGSTON JW. 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA*; 281(4):341-6.

TANNER, C. M., KAMEL, F., ROSS, G. W., HOPPIN, J. A., GOLDMAN, S. M., KORELL, M., LANGSTON, J. W. 2011. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 866–872.

TERRON A, BAL-PRICE A, PAINI A, MONNET-TSCHUDI F, BENNEKOU SH, SCHILDKNECHT, S. 2017. An adverse outcome pathway for parkinsonian motor deficits associated with mitochondrial complex I inhibition. *Archives of Toxicology*, 92(1), 41–82.

TEW, K. D., & RONAI, Z. 1999. GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, 2(3), 143–147.

THAKUR, P., & NEHRU, B. 2014. Inhibition of Neuroinflammation and Mitochondrial Dysfunctions by Carbenoxolone in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 209–219.

THELIN M A, BARTOLINI B, AXELSSON J, GUSTAFSSON R, TYKESSON E, PERA E, OLDBERG A, MACCARANA M, and MALMSTROM A, 2013. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J. May*; 280(10): 2431–2446.

THEOCHARIS, A. D., SKANDALIS, S. S., NEILL, T., MULTHAUPT, H. A. B., HUBO, M., FREY, H., KARAMANOS, N. K. 2015. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1855(2), 276–300.

THIRUCHELVAM, M., BROCKEL, B., RICHFIELD, E., BAGGS, R., & CORY-SLECHTA, D. 2000. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Research*, 873(2), 225–234.

THOMAS MG, SALDANHA M, MISTRY RJ, *et al.* 2013. Nicotinamide N-methyltransferase expression in SH-SY5Y neuroblastoma and N27 mesencephalic neurones induces changes in cell morphology via ephrin-B2 and Akt signalling. *Cell Death and Disease*, 4, e669.

THOMAS, B., & BEAL, M. F. 2007. Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 16(R2), R183–R194.

THOMAS, B., SARAVANAN, K. S., & MOHANAKUMAR, K. P. 2008. *In vitro* and *in vivo* evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochemistry International*, 52(6), 990–1001.

THOMSON D, MOSS C, VENKATASAMY R, PANAGOS CG, ROBINSON J, BAVINGTON CD, HOGWOOD J, MULLOY B, UHRÍN D, SPINA D, PAGE CP. 2016. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two novel polysaccharides from the sea squirt, *ascadellia aspersa*, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.*; Vol. 40, October, Pages 69-79.

THWAITES G, FISHER M, HEMINGWAY C, SCOTT G, SOLOMON T, INNES J, 2009. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *Journal of Infection* 59, 167e187.

TIEU, K. 2011. *A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 1(1), a009316–a009316.

TOMA, L., PINHAL, M. A. S., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., & HIRSCHBERG, C. B. 1996. Transport of UDP-Galactose into the Golgi Lumen Regulates the Biosynthesis of Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3897–3901.

TORRES-BUGEAU, C. M., AVILA, C. L., RAISMAN-VOZARI, R., PAPY-GARCIA, D., ITRI, R., BARBOSA, L. R., CORTEZ, L. M., SIM, V. L., AND CHEHIN, R. N. 2012. Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Early Amyloid-like Oligomers and Their Implication in alpha-Synuclein Aggregation. *J Biol Chem* 287, 2398-2409.

TORRES-BUGEAU, C. M., ÁVILA, C. L., RAISMAN-VOZARI, R., PAPY-GARCIA, D., ITRI, R., BARBOSA, L. R. S., CHEHÍN, R. N. 2011. Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Early Amyloid-like Oligomers and Their Implication in α -Synuclein Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2398–2409.

TOVAR AMF, DE MATTOS DA, STELLING MP, SARCINELLI-LUZ BSL, NAZARETH RA, MOURÃO PAS. 2005. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta*. 1740: 45–53.

TREMBLAY RG, SIKORSKA M, SANDHU JK, LANTHIER P, RIBECCO-LUTKIEWICZ M, BANI-YAGHOUB M. 2010. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1), 60–67.

TREMBLAY, R. G., SIKORSKA, M., SANDHU, J. K., LANTHIER, P., RIBECCO-LUTKIEWICZ, M., & BANI-YAGHOUB, M. 2010. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1), 60–67.

TROWBRIDGE JM, RUDISILL JA, RON D, GALLO RL. 2002. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.* 277, 42815–42820.

TROWBRIDGE, J. M., & GALLO, R. L. 2002. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12(9), 117R–125R.

TSUCHIYA, K., TAJIMA, H., KUWAE, T., TAKESHIMA, T., NAKANO, T., TANAKA, M., SUNAGA, K., FUKUHARA, Y., NAKASHIMA, K., OHAMA, E., MOCHIZUKI, H., MIZUNO, Y., KATSUBE, N., AND ISHITANI, R. 2005. Proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions. *Eur J Neurosci* 21, 317-326.

TSUNEMI, T., & KRAINC, D. 2013. Zn²⁺ dyshomeostasis caused by loss of ATP13A2/PARK9 leads to lysosomal dysfunction and alpha-synuclein accumulation. *Human Molecular Genetics*, 23(11), 2791–2801.

TYRRELL DJ, HORNE AP, HOLME KR, PREUSS JMH, PAGE CP. 1999. Heparin in Inflammation: Potential Therapeutic Applications beyond Anticoagulation. *Adv. Pharmacol.*, 46, 151–208.

TYSNES OB, STORSTEI A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 124:901–905.

UEOKA, C., NADANAKA, S., SENO, N., KHOO, K. H., and SUGAHARA, K. 1999. Structural determination of novel tetra- and hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate H (oversulfated dermatan sulfate) of hagfish notochord. *Glycoconj. J.* 16, 291–305.

VALCARCEL J, RAMÓN NC, RICARDO PM, RUI LR, JOSÉ AV. 2017. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. *Biotechnology Advances.* Nov 1;35(6):711-725.

VENKATACHALAM KV. 2003. "Human 3-phosphoadenosine 5 -phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency," *IUBMB Life*, vol. 55, no. 1, pp. 1–11.

VERNA JM, FICHARD A, SAXOD R. 1989. Influence of glycosamino-glycans on neurite morphology and outgrowth patterns *in vitro*. *Int. J. Dev. Neurosci* 7, 389±399.

VERSTRAETEN A, THEUNS J, BROECKHOVEN CV. 2015. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in Genetics.* V. 31, n. 3.

VILA M, JACKSON-LEWIS V, GUÉGEN C, *et al.* 2001. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.*; 14: 483-489.

VILELA-SILVA AC, WERNECK CC, VALENTE AP, VACQUIER VD, MOURÃO PA. 2001. Embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* synthesize a dermatan sulfate enriched in 4-O- and 6-O-disulfated galactosamine units. *Glycobiology.* 11: 433–440.

VO T, CARULLI D, EHLERT EM, KWOK JC, DICK G, MECOLLARI V, MOLONEY EB, NEUFELD G, DE WINTER F, FAWCETT JW, VERHAAGEN J. 2013. The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 56:186-200.

- VOLPI N, MACCARI F. 2009. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequalvis*. *Glycobiology*, 19: 356–367.
- VOLPI N. 2010. Dermatan sulfate: Recent structural and activity data. *Carbohydrate Polymers* 82, 233-239.
- VON HOLST A, SIRKO S, FAISSNER A. 2006. The unique 473HD Chondroitin sulfate epitope is expressed by radial glia and involved in neural precursor cell proliferation. *J Neurosci*, 26: 4082-4094.
- WALICKE PA. 1988. Interactions between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Experimental Neurology*, 102(1), 144–148.
- WALLACE, D. C. 2005. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*, 39(1), 359–407.
- WANG, T., ZHU, M., & HE, Z.-Z. 2016. Low-Molecular-Weight Fucoidan Attenuates Mitochondrial Dysfunction and Improves Neurological Outcome After Traumatic Brain Injury in Aged Mice: Involvement of Sirt3. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(8), 1257–1268.
- WARE JC. 1989. Impotence and aging. *Clin Geriatr Med.*; 5(2):301-14.
- WEI DC, POLITANO VA, SELZER MG, LOKESHWAR VB. 2000. The association of elevated urinary total to sulfated glycosaminoglycan ratio and high molecular mass hyaluronic acid with interstitial cystitis. *J Urol.*; 163(5):1577-83.
- WILLIS AW. *et al.* 2011. Neurologist care in Parkinson disease: a utilization, outcomes, and survival study. *Neurology*. v. 30, n. 77(9), p. 851-7.
- WILSON, I. B. H. 2002. Functional Characterization of *Drosophila melanogaster* Peptide O-Xylosyltransferase, the Key Enzyme for Proteoglycan Chain Initiation and Member of the Core 2/IN-Acetylglucosaminyltransferase Family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21207–21212.
- WINYARD, P. G., MOODY, C. J., & JACOB, C. 2005. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(8), 453–461.
- WOODS AG, CRIBBS DH, WHITTEMORE ER, COTMAN CW. 1995. Heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan attenuate beta-amyloid (25-35) induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*; 697: 53–62.
- WOOTEN GF, *et al.* 2004. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 75, n. 4, p. 637-639.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2011. *Global Health and Aging*. Bethesda.

- XIE, A., GAO, J., XU, L., & MENG, D. 2014. Shared Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *BioMed Research International*, 2014, 1–8.
- XIE, X., ZHU, L., FU, Z., GUO, X., WANG, K., HU, X., CHEN, J. 2012. Low Molecular Weight Heparin Inhibits Circulating Fibrocytes Differentiation by Modulating Neuronal Nitric Oxide Synthase and TGF- β 1/Smad Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(6), 1465–1472.
- XU and J D Esko, 2014. "Demystifying heparan sulfate-protein interactions," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 83, pp. 129– 157.
- YAMADA S, SUGAHARA K, and OZBEK S. 2011. Evolution of glycosaminoglycans – comparative biochemical study. *Commun. Integr. Biol.* 4:150–158.
- YAMADA S., SUGAHARA K. 2008. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr. Drug Discov. Technol.* Dec;5(4):289-301.
- YAMADA K, *et al.* 2011. Structure and mechanism of the chromatin remodelling factor ISW1a. *Nature*. v.472, n.7344, p.448-53.
- YIU G, HE Z. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.7, p.617–627.
- YLA-HERTTUALA, S. 1999. Oxidized LDL and Atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 874, 134–137.
- YOULE, R. J., & NARENDRA, D. P. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14.
- YU Z, ZHANG S, WANG D, FAN M, GAO F, SUN W, LI S. 2017. The significance of uric acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Medicine*, 96(45), e8502.
- YUE XL, LEHRI S, LI P, BARBIER-CHASSEFIERE V, PETIT E, *et al.* 2009. Insights on a new path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic. *Cell Death Differ* 16: 770–781.
- ZAMPOL, M. A., & BARROS, M. H. 2017. Melatonin improves survival and respiratory activity of yeast cells challenged by alpha-synuclein and menadione. *Yeast*, 35(3), 281–290.
- ZHAN X, STAMOVA MDB, JIN LW, DECARLI MDC, PHINNEY DB, SHARP FR. 2016. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*, v.87.
- ZHANG L, ESKO JD. 1994. Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J Biol Chem.*; 269(30):19295-9.
- ZHANG Q, LI J, LIU C, SONG C, LI P, YIN F, XIAO Y, LI J, JIANG W, ZONG A, *et al.* 2015. Protective effects of low molecular weight chondroitin sulfate on amyloid beta (A β)-induced damage *in vitro* and *in vivo* . *Neuroscience*. 305: 169-182.

ZHANG Q, NA Z, CHENG Y, WANG F. 2018. Low-molecular-weight chondroitin sulfate attenuated injury by inhibiting oxidative stress in amyloid β -treated SH-SY5Y cells. *NeuroReport.*, 29 (14): 1174-1179.

ZHANG, L., & ESKO, J. D. 1995. Accumulation of a Pentasaccharide Terminating in α -N-Acetylglucosamine in an Animal Cell Mutant Defective in Heparan Sulfate Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12557–12562.

ZHANG, L., DAVID, G., & ESKO, J. D. 1995. Repetitive Ser-Gly Sequences Enhance Heparan Sulfate Assembly in Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27127–27135.

ZHOU, X. *et al.* 2010. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 86, p. 1707–17.

ZHOU, Z., KERK, S., & MENG LIM, T. 2008. Endogenous dopamine (DA) renders dopaminergic cells vulnerable to challenge of proteasome inhibitor MG132. *Free Radical Research*, 42(5), 456–466.

ŽUPAN, Ž., PILIPOVIĆ, K., DANGUBIĆ, B., FRKOVIĆ, V., ŠUSTIĆ, A., & ŽUPAN, G. 2011. Effects of enoxaparin in the rat hippocampus following traumatic brain injury. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(8), 1846–1856.

ZWEIG, R. M., JANKEL, W. R., HEDREEN, J. C., MAYEUX, R., PRICE, D. L. 1989. The pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 26(1), 41–46.

10. ANEXOS

10.1. ARTIGO CIENTÍFICO

Running title: Dermatan sulfate responsible for neuroprotection

Title: Dermatan sulfate obtained from *Phallusia nigra* a marine organism is responsible for antioxidant and neuroprotector effect on neuroblastoma-2A cell lineage

Graziele Fonseca de Sousa^{1,2}, Celia Yelimar Palmero³, Aline Karl Araujo⁴, Arthur Giraldi Guimarães⁵, Cintia Monteiro de Barros^{1,2, *}

¹Laboratório Integrado de Biociências Translacionais – Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM – Av. São José do Barreto, 764-Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé – CEP: 27910-970 - RJ – Brazil.

²Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Av. Alberto Lamego, 2000 - Campos dos Goytacazes – RJ - CEP: 28013-602 – RJ – Brasil.

³Laboratório Integrado de Morfologia – Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM – Av. São José do Barreto, 764-Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé – CEP: 27910-970 - RJ – Brazil.

⁴Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM – Av. São José do Barreto, 764-Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé – CEP: 27910-970 - RJ – Brazil.

⁵Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Av. Alberto Lamego, 2000 - Campos dos Goytacazes – RJ - CEP: 28013-602 – RJ – Brasil.

***Corresponding Author:**

Cintia Monteiro de Barros
Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade NUPEM/UFRJ
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Av. São José do Barreto 764
São José do Barreto, 27910-970
Macaé, RJ, Brazil.
E-mail: cintiabarros@macae.ufrj.br
Telephone: +55 22 21413950
Fax: +55 21 22808193
PO Box: 119331

Key Words: Glycosaminoglycan; Ascidian; Rotenone; Neurite outgrowth; Neural regeneration.

Abbreviations: CNS, central nervous system; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; H2DCFDA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; MTT, 3-(4,5-Dimethylthianol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; CAT, Catalase; DMEM-F12, Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12; DMSO, Dimethyl sulfoxide; GAG glycosaminoglycan; NSC, neural stem cells; bFGF, basic fibroblast growth Factor; Hep, heparin; HS, heparan; CS,

chondroitin sulfate; DS, dermatan sulfate; CHP, cumene hydroperoxide; LPO, lipid peroxidation; O.D., optical density; ACAP, total antioxidant capacity against peroxy radicals; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; FU, fluorescence units; ECM, extracellular matrix; ESC, embryonic stem cells; EC₅₀, Half maximal effective concentration.

Abstract

The neurodegenerative diseases are characterized by progressive loss of neurons in the central nervous system (CNS). Several molecules have a role in the regeneration of the CNS of mammals, among them, glycosaminoglycans, which are found in abundance in ascidians tissues. We investigated the neuroprotective and antioxidant roles of dermatan sulfate (DS) obtained from a marine invertebrate *Phallusia nigra*, an specie of ascidian Neuronal viability was analyzed with colorimetric and morphological assays to investigate the role of *Phallusia nigra* DS (*pnDS*) in a co-incubation with Rotenone. It was observed a notable increase in the mitochondrial activity of Neuro-2A cells, indicating a neuroprotective effect of 1.5 nM *pnDS* with 1,0 μM rotenone after 72 h. The lengths of neurites were increased from 16.25 to 39.23 μm after used *pnDS*. *pnDS* play a role reducing considerable the production of Reactive oxygen species (ROS) and increased the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT. In addition, *pnDS* increased ACAP levels and protect the cells from damage as observed by LPO decreased levels. These data indicate an antioxidant and neuroprotective activity of DS from *Phallusia nigra* under neurodegenerative conditions caused by rotenone.

Introduction

Neurodegenerative diseases are incurable and progressive. There are innumerable risk factors responsible for their development, which, includes, environmental contamination with the use of pesticides in the agriculture, metal exposure, dietary, lifespan, genetic mutations and aging, or yet, a complex gene-gene and gene-environment interplay (Migliore and Coppedè, 2009). However, all of them, have in common the oxidative stress, neuroinflammation and the progressive loss of selectively vulnerable populations of neurons (Dugger and Dickson, 2017). Glycosaminoglycans (GAGs) play a role in the pathomechanisms of several neurodegenerative disease, changing their content in the extracellular matrix or participating in the aggregation of some proteins like, α -synuclein in Parkinson or β -amyloid in Alzheimer diseases (Lehri-Boufala et al. 2015; Rowlands et al. 2015; Maïza et al. 2018). Recently, many studies shedding light to neuroprotective properties of GAGs besides, to already described, anticoagulant and anti-inflammatory, providing to these molecules, a new focus, as a possible therapeutic strategy to neurodegenerative disease (Dudas, 2012). Heparin used as treatment, improve the cognitive function of patients with neurodegenerative conditions (Ban et al. 1991). Nevertheless, different sulfated polysaccharide could have a different neuroprotective action. Chitosan and chondroitin sulfate (CS), was recently described, to be a neuroprotector and antioxidant, reducing oxidative stress induced by pesticides (Canãs et al. 2007; Manigandan et al. 2018). CS contrary to chitosan, is the most abundant GAG found in the extracellular matrix of adulthood nervous system. It has been attributed to CS, neurite outgrowth inhibition in neurodegenerative process (Rauvala et al. 2017). On the other hand, dermatan sulfate (DS) with specific sulfation pattern ((IdoUA(2S)-GalNAc(6S)) is found in the extracellular matrix from central

nervous system during development and diminish their concentrations in adulthood, found mainly in the neurogenic niches (Sugahara, 2003). The DS chains from the body of ascidian *Phallusia nigra* consist of a major (~80%) (IdoUA(2S)-GalNAc(6S)) in addition to a minor (~20%) (IdoUA-GalNAc(6S)) concentrations of disaccharides (Pavão et al. 1995). This unique structure from *PnDS* and their special localization in the neurogenic niches besides their notable outgrowth (Hikino et al.2003) and anti-inflammatory (Kozłowski et la., 2011) properties gives our attention to investigate other biological functions poor revealed in the literature. Then, to explore the biological potential of *Phallusia nigra DS*, we investigated here the neuroprotective and antioxidant effect on neuroblastoma – 2A cell lineage after injury induced by pesticide rotenone.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Chondroitinase AC (Sigma, C2262) e chondroitinase ABC (Sigma, C3667), 3-(4,5-Dimethylthianol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide (Sigma, M81802), 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma, D9542), propidium iodide (Sigma, P4170), 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma, D6883), 2,2'-azobis 2 methylpropionamide dihydrochloride (Sigma, 440914), Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (Sigma, D8900), fluorescein diacetate (Sigma, F7378), Cumene hydroperoxide (Sigma, 247502).

Animal collection

Adults of *Phallusia nigra* were collected from Porto do Forno, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil, and maintained at 20°C in an aerated aquarium in the vivarium of the Institute NUPEM/UFRJ, with controlled photoperiod (12 h light/12 h dark), pH (approximately 8.0), and salinity (34 PSU), for two days before the experimental procedures. The animals were fed with nauplii of *Artemia* (Sardet *et al.* 2011). The collection and maintenance of animals was permitted by Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) # 60330-2.

Extraction of the Sulfated Glycosaminoglycans

The viscera of *Phallusia nigra* ascidians were removed from the tunic and immersed in acetone for 24h under 4°C to delipidation. After, the ascidian's viscera were dried (~25 g) and suspended in 500 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 5 g papain, 5 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mM cysteine and incubated at 60°C overnight to proteolytic digestion. After this, the mixture was centrifuged (3000 × g for 10 min at room temperature), the supernatant was separated, and the pellet was incubated twice-again with papain, as described above. The clear supernatants from the three extractions were combined and mixed with cetylpyridinium chloride solution (final concentration, 0.5%) overnight at room temperature. The precipitate formed was washed with cetylpyridinium chloride (final concentration, 0.05%) and suspended with 2M NaCl in 95% ethanol (100:15, v/v). This sample in ethanol/NaCl was mixed with 2 volumes of 95% ethanol and kept overnight at 4 °C. The precipitate formed (containing the total glycosaminoglycans, GAGs) was collected by centrifugation (3000 × g for 10 min at room temperature), after the sample containing GAGs was dried, and dissolved in 50 mL of distilled water. The sample in

water was precipitated again in a gradient of ethanol to obtain a final concentration of 50%, 75% and 100%, as described in detail by Stelling et al. 2019. The fractions were dried and suspended in distilled water.

Identification of Glycosaminoglycans

Agarose Gel

The fractions of 50, 75 and 100% ethanol from ascidian viscera containing GAGs (1.5µg as uronic acid), before or after incubation with specific glycosaminoglycan lyases, or deaminative cleavage with nitrous acid were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described previously (Pavão *et al.* 1998). Briefly, the GAG and a mixture of standard containing Chondroitin sulfate (CS) and heparin (Hep) were applied to a 0.8% agarose gel in 0.05M 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0) and run for 1h at 110 mV. After electrophoresis, the GAG was fixed with aqueous 0.1% cetylmethylammonium bromide solution and stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v/v) (Pavão et al. 1995).

Enzymatic treatment

The 75% of ethanol fraction from *Phallusia nigra* (~1.5 µg as uronic acid) was incubated with 0.01 U of chondroitin AC or ABC lyase in 0.1 ml 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), containing 5 mM EDTA and 15 mM sodium acetate. After incubation at 37 °C for 12 h, the mixtures were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described above (Pavão et al. 1995).

Deaminative Cleavage with Nitrous Acid

The 75% of ethanol fraction from *Phallusia nigra* (~1.5 µg as uronic acid) was performed as described by Shively and Conrad, 1976.

Cell Culture

Murine neuroblastoma cell line Neuro-2A was kindly provided by Dr^a. Celia Yelimar Palmero (UFRJ, Macaé, RJ). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (D8900; Sigma) supplemented with 1% glutamine, 0.5% penicillin/streptomycin, and 10% fetal bovine serum at 37°C in a humidified (95%) incubator with CO₂ (5%).

Experimental Design

Neuro-2A cells were seeded in 96-well plates at a density of 10×10^4 cells/well and separated in control and experimental groups. To induce an oxidative stress and chemical injury it was used a pesticide rotenone diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO; M81802; Sigma) and the control was incubated only with DMSO vehicle. Three independent experiments (n=3) were performed made in a triplicate. To evaluate the neuroprotective and antioxidant effect of DS from *P.nigra*, (*PnDS*) Neuro-2A cells were incubated only or co-incubated with *PnDS* and/or with rotenone, as described (Figure 1) below:

Control group (CT): Incubated only with DEMEN/F12 for 72h;

Control group (DMSO): Incubated only with DMSO vehicle for 72h;

Experimental group I (*Phallusia nigra* DS): Incubated with crescent concentrations of *PnDS* only (0,75, 1,5, 3,0, 6,0 e 12,0 nM) for 72h;

Experimental group II (Rot): Incubated with crescent concentrations of rotenone only (0.12; 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 μ M) for 72h;

Experimental group III (Rot + *Phallusia nigra* DS): Co-incubated with 1 μ M Rotenone and 1.5 nM *PnDS* for 72h.

Mitochondrial activity

The mitochondrial activity was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT; M6494; Invitrogen) bromide-based colorimetric assay to analyze the cytotoxicity of Rotenone and the neuroprotective effect of *PnDS* in a Neuro-2A cells. The cells were incubated as described in experimental design # 2.5. After incubation, 10 μ L of MTT (5 mg/ml) was added into each well for 4 h at 37 °C. The solution was carefully removed, and 200 μ L DMSO was added to solubilize the formazan crystals. The mitochondrial activity was measured using a microplate reader (Multiskan Go Thermo scientific®) at 570 nm (Mosmann 1983). Three independent experiments (n=3) were performed in a triplicate and the values of mitochondrial activity was described as percentages of the control.

Light Microscopy

After 72h Neuro-2A live cells were observed under 200X of magnification on phase contrast objective to analyze the cell morphology after exposure to rotenone pesticide and *PnDS*. In addition, fluorescent dye indicators were incubated with cells to evaluate cell morphology using 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (10000 μ g/mL; DAPI; D9542; Sigma), for 3 min at 37°C, cell viability using fluorescein diacetate (6 μ g/mL; FDA; F7378; Sigma) for 30 min at 37°C, and cell mortality using propidium iodide (12 μ g/mL; PI; P4170; Sigma) for 30 min at 37°C. After incubation with fluorescent dyes the cells were observed randomly from each well (n = 3) at 200X of magnification on inverted microscope (Leica-CTR4000) and the images were obtained.

Morphometric analysis

Four random images from three independent experiments in each experimental group were obtained under inverted microscope using phase contrast objective. After this, the images were morphometric analyzed to evaluate the effect of *PnDS* and/or rotenone on neurite outgrowing at 72 h after incubation with rotenone and/or *PnDS*. The program Image J using Neuron J tool (1.47t) was used to measurement the length and the total number of neurites emerged from the soma (Pemberton et al. 2018).

Scanning Electron microscopy

To evaluate the cellular ultrastructure, the Neuro-2A cells after the experimental design as described above were fixed in 2.5% glutaraldehyde made in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 15 min, post-fixed in 2% osmium tetroxide for 20 min and then, dehydrate in a graded series of ethanol until: 30%, 50%, 70%, 90% and 100 ° C during 20 min for each concentration. Samples were dried on a Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer stub-mounted gold-plated (20 nm) sputter on the Sputter Coater DSC050 and observed on the Jeol JSM6390LV Scanning Electron Microscope by Rudolf Barth Electron Microscopy Platform at the Carlos Chagas Pavilion of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro.

Quantification of Reactive Oxygen Species (ROS)

Rotenone is pesticide knowledge to induce the generation of reactive oxygen species (ROS). To analyze the antioxidant role of *PnDS*, Neuro-2A cells was incubated with/or rotenone and *PnDS* as described in detail in an experimental design. After, cells from experimental groups were homogenized in a cold (4 °C) buffer solution containing 250 mM sucrose, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 5mM ethylenediamine

tetraacetic acid (pH 7.6). Then cells were centrifuged (10,000 g, 4 °C for 45 min) and the supernatant resulting from this centrifugation was used for the determination of ROS (Viarengo et al. 1999). For ROS detection, we used 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA, Molecular Probes). This molecule in the presence of ROS generates a fluorochrome, detected at 488 and 525 nm wavelengths for excitement and emission, respectively. The analyses were carried out in a fluorescence microplate reader (SPECTRAmax PLUS) with readings every 5 min for 120 min. The total fluorescence production was calculated by integrating the fluorescence units (FU) after 15 and 30 min over the time of the measurement, after adjusting FU data to a second order polynomial function. ROS concentration was referred to the total protein content present in the biological sample and expressed in FU (mg of protein)⁻¹.

Evaluation of Antioxidant System

To evaluate the action of *PnDS* on antioxidant system, Neuro-2A cells were quantified to total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), activity of enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) as described below:

ACAP quantification

The Neuro-2A cells were homogenized in a buffer and centrifuged as described above in quantification of ROS. The supernatant of the centrifugation was used for the analyses of ACAP according to the method of Amado et al. (2009). Briefly, 10 µL of the supernatant prepared for the enzymatic analysis was pipetted into a white 96-well microplate, six wells per sample. The 127.5 µL reaction buffer containing 30 mM HEPES (pH 7.2), 200 mM KCl, and 1 mM MgCl₂ was added to the wells with the samples. In three of the six wells of each sample, 7.5 µL of 2,2'-azobis 2

methylpropionamidine dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich) was added, while the same volume of ultrapure water was pipetted into the other three wells. The microplate was inserted into a fluorescence microplate reader (SPECTRAMax PLUS), at a programmed temperature of 35 °C, and the peroxy radicals were produced by thermal decomposition of ABAP. Immediately before reading, 10 µL of the fluorescent probe H₂DCF-DA was added to the wells at a final concentration of 40 µM (Ferreira-Cravo et al. 2007). H₂DCF-DA is cleaved by esterases according to their presence in the samples, and the non-fluorescent compound H₂DCF is oxidized by ROS to the fluorescent compound DCF, which is detected at wavelengths of 488 and 525 nm, for excitation and emission, respectively. The thermal decomposition of ABAP and ROS formation was monitored with readings every 5 min for 120 min. The total fluorescence production was calculated by integrating the FU over the period of the measurement, after adjusting the FU data to a second-order polynomial function. The results were calculated as the difference in area of the FU × min in the same sample, with and without ABAP addition, and were standardized to the ROS area without ABAP. The inverse of the relative difference between ROS area with and without ABAP was considered as a measure of the antioxidant capacity, with a high area difference representing a high antioxidant capacity.

Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Neuro-2A cells were processed as described above in experimental design and after 72 h the SOD activity was evaluated following the protocol improved by Sun and Zigman (1978). Cells were sonicated for 30 s in 100 µL phosphate buffer saline (PBS; pH 7.6). After, the samples were incubated with 50 mM sodium carbonate buffer and 30 mM adrenaline was added at time zero at room temperature (25°C) for every 2 min for 120

min. SOD activity was expressed as percentage of inhibition of the control. Analyses were done in triplicate and the results, expressed in optical density (O.D.)/mg protein, were read at 480 nm using a microplate reader (Multiskan Go Thermo scientific®).

Catalase (CAT) activity

Neuro-2A cells from each experimental group were homogenized in a cold (4 °C) 20 mM Tris-base buffer solution containing 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 150 mM KCl, and 0.1 mM PMSF (pH 7.6). Homogenates were centrifuged at 9000 g, 4 °C, for 30 min, and the supernatant was then used for the analyses. The catalase activity was analyzed according to Beutler (1975), determining the initial rate of 50 mM decomposition at 240 nm. Results were expressed in CAT units: one unit is the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μmol H_2O_2 per minute and per mg of protein, at 25°C and pH 8.0. This procedure was performed using a digital spectrophotometer (Multiskan Go Thermo scientific®).

Lipid Peroxidation (LPO)

Neuro-2A cells from each experimental group as explained in experimental design were analyzed to lipid peroxidation (LPO) to quantify the cell membrane damages. For this purpose, cells were homogenized in cold methanol and centrifuged at 1000 g, 4°C, for 10 min. The supernatant was used for the analyses by FOX method (Hermes-Lima et al. 1995; Monserrat et al. 2003), which is based on the oxidation of Fe(II) under acidic conditions and measures the quantity of lipid peroxides. For LPO measurements, 1 mM FeSO_4 , 0.25 M H_2SO_4 , 1 mM xylene orange, and MilliQ water were added sequentially. Samples (30 μL) or methanol (blanks) were added and incubated for 45 min. Thereafter, absorbance under 550 nm was determined using a

microplate reader (Multiskan Go Thermo scientific®), and cumene hydroperoxide (CHP; Sigma-247502) was employed as a standard. LPO was expressed in CHP equivalents per gram of wet mass. The experiments were adjusted to protein concentration of the cells homogenates was evaluated by the Bradford method (Bradford 1976).

Statistical Analysis

Raw data were collected from a series of independent assays. Data describing the neuroprotective and antioxidant effects of *PnDS* analyzed by mitochondrial activity, morphometric, ROS and LPO production, antioxidant system were applied to Kolmogorov-Smirnov to assess the normality of the distributions. After, the results from control and experimental groups were then compared using the parametric ANOVA test followed by multiple comparison Tukey pos-hoc test. Results are expressed as the mean \pm error, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The analyses were done with the use of GraphPad Prism version 7.00 from GraphPad Software, Inc.

Results

Isolation and Identification of *Phallusia nigra* dermatan sulfate

The polysaccharides obtained in each extraction were precipitated with a gradient of ethanol and analyzed by agarose gel electrophoresis. Metachromatic bands with different migration patterns, was revealed and representing a different glycans. A band migrating between standard of heparin (Hep) and chondroitin sulfate (CS) is present mostly in the sample obtained with 75% of ethanol and probably corresponds to dermatan sulfate (DS) polymer (Figure 2A). To confirm the nature of glycan, the

sample of 75% ethanol was treated with chondroitin lyases and nitrous acid and showed a total degradation of the band only by Chondroitin ABC lyase confirming that is DS (Figure 2B). DS polymer was previously characterized by Pavão et al. 1995.

***Phallusia nigra* DS improve mitochondrial activity after cytotoxicity induced by Rotenone**

To analyze the cytotoxicity of rotenone and to investigate the neuron protective effect of *PnDS*, the MTT assay was performed. The results showed that in the controls the optical density increased from 24h to 72 h compared with controls at 0h. Rotenone significantly decreased the optical activity after 48 h until 72 h compared with rotenone at 0h. *PnDS* did not change optical density in relation to *PnDS* at 0h. However, *PnDS* co-incubated with rotenone, change significantly the optical density only after 72 h compared with 0h in the same experimental group. It's important to note that the differences inter groups was only observed after 72 h. Because of this the follow experiments were conducted using this time (Figure 3A).

Rotenone decreased the mitochondrial activity in all concentrations tested (figure 3B). The assay revealed that the half maximal inhibitory concentration (EC_{50}) was 1 μ M rotenone. Because of this, 1 μ M rotenone was chose to assess the neuroprotective effect of *PnDS* in the following experiments. *PnDS* not showed a curve dose-response, only decreasing the mitochondrial activity in 12 nM *PnDS* concentration (Figure 3C). In a co-incubation with 1 μ M Rotenone and 1.5 nM *PnDS* a notable increase in the mitochondrial activity of Neuro-2A cells was observed indicating a neuroprotective effect of *PnDS* after 72 h (Figure 3D).

***Phallusia nigra* DS and rotenone change the length of neurite**

Neuro-2A cells morphology have changed after incubation with 1 μ M Rotenone and/or 1.5 nM *PnDS* (Figure 4A, B). Cells under rotenone action showed a round, unbranched and detached from the flask surface and apparently, there were considerable reduction the number of cells in the culture (Figure 4C, D). *PnDS* only, increased the neuron branch morphology inducing the outgrowing, however, reduced the number of cells in the culture (Figure 4E, F). Rotenone plus *PnDS*, ameliorates the aspect of the cells with the most of them presenting the round appearance and the other cells with preserved neuron branched morphology, less cells in the culture were observed too (Figure 4G, H). The cells count using DAPI, confirmed the reduction of cells in the culture observed after incubation with Rotenone and a slight increase in the cell number in the culture after co-incubation with rotenone and *PnDS* comparing with rotenone incubation only (Figure 4I).

To better evaluate the change in Neuro-2A morphology after incubation with rotenone and/or *PnDS*, the cells with neurites was counted in images obtained by phase contrast. After incubation with 1 μ M Rotenone the cells with neurites decreased from 100% in the controls to 40% in the rotenone experimental group. *PnDS* didn't improve the number of cells with neurites in a co-incubation with rotenone (Figure 5A). In addition, the number of neurites per neuron decreased after incubation with 1 μ M rotenone and, *PnDS* did not change this cells characteristic (Figure 5B). However, looking for the length of neurites, as expected, 1 μ M rotenone decreased the length of neurites and, on the other hand, *PnDS* only, improved from 50.5 μ m in the controls to 105.18 μ m (Figure 5C). After co-incubation with rotenone and *PnDS* the lengths of neurites increased compared with rotenone alone from 16.25 to 39.23 μ m (Figure 5C).

Ultrastructural analysis using scanning electron microscopy showed that control cells are round with small filopodia projection from cytoplasm indicating cell adhesion and viable cells (Figure 6A). Furthermore, the cell morphology changes drastically after *PnDS* incubation, most of the cells lost round appearance and acquire pyramidal cell body morphology with long unbranched neurites emerged from soma (Figure 6B). Rotenone reduced the size of cells and even though, the cells morphology still round as observed in the controls, the filipodia projections was lost indicating a cell death and detachment cells (Figure 6C). In a co-incubation with rotenone and *PnDS* was observed the presence of filipodia projections from cytoplasm, round appearance and small neurites emerged from soma. In comparison with *PnDS* and rotenone, the length of neurites is smaller than *PnDS* only (Figure 6D).

***Phallusia nigra* DS improves cell viability**

Data from cell count and cell morphology revealed a decreased in the number of cells, then, to elucidate if the reduction of cell number is directly correlated with cell death, we used fluorescent dyes FDA to stain viable cells and PI to unviable cells. Most of cells in the control (Figure 7 A, B, C) and, in the *PnDS* only, are viable and some of them were stained by PI (Figure 7 G, H, I). In contrast, less cells were stained by FDA and most of them were stained by PI after rotenone incubation and in comparison, with controls (Figure 7 D, E, F). *PnDS* co-incubation with rotenone revealed a decrease in PI staining with more cells viable in comparison with cells incubated with rotenone alone (Figure 7 J, K, L). To confirm the data obtained by images the morphometric analysis was performed a quantification of FDA and PI positive cells. Data from FDA revealed that rotenone diminished viable cells from 100% in the controls to 60% in the rotenone. *PnDS* incubated with rotenone (95.32%) preserved more cells viable similar to the controls (Figure 8A). Besides, unviable cells stained

with PI were high around 103.57%, as expected, in rotenone experimental group compared with controls, which it was 58.92%. *PnDS* only or in a co-incubation with rotenone, remarkably diminished unviable cells to 19.40% in *PnDS* only and to 44.64% in rotenone/ *PnDS*, better than observed in controls (Figure 8B).

***Phallusia nigra* DS decrease ROS production**

Besides, to look for the role of *PnDS* on cell viability and cell morphology, we decided to investigate if neuroprotective effect observed by experiments conducted here was correlated to antioxidant effect of *PnDS*, since rotenone is described as oxidative stress inducer.

Rotenone, as expected, induced high levels of ROS concentration by Neuro-2A cells, when compared with controls. *PnDS* only, didn't induce the production of ROS, with similar results to the control group. Unexpectedly, *PnDS* in a co-incubation with rotenone decreased considerably ROS concentration, compared with concentrations found in the control group (Figure 9).

***Phallusia nigra* DS improves antioxidant system**

To explore the possibility of *PnDS* is acting on antioxidant system as mechanism to reduce the ROS concentration, the ACAP and the activity of antioxidant enzymes were evaluated. Rotenone acted reducing the SOD activity, on the other hand, *PnDS* co-incubated with rotenone subtle increased SOD activity in a comparison with rotenone group (Figure 10A). In contrast, *PnDS* co-incubated with rotenone, increased notably CAT activity, which almost reached up until the activity found in the control group. In addition, *PnDS* only, was capable too, to induce CAT activity (Figure 10B).

To analyze the total antioxidant capacity, rotenone reduced the ACAP levels in comparison with control, however, the addition of *PnDS* with rotenone, recovered the ACAP levels similar to control group (Figure 10C).

***Phallusia nigra* DS diminished cell damages**

The integrity of cell membranes was evaluated by LPO assay. Rotenone, as expected, induced high levels of LPO in comparison with control group. The levels of LPO in the control was 43.90% and in rotenone group was 100.44%. *PnDS* induced too LPO levels to 66.14% in comparison with control, however, it was less than in rotenone experimental group. Rotenone co-incubated with *PnDS* reduced LPO levels to 70.60% (Figure 11).

Discussion

Neurodegenerative diseases, in general, are characterized by neuronal death, oxidative stress and inflammation. Recently, novel properties of glycosaminoglycans in the central nervous system come into focus additionally the knowledges anticoagulant and anti-inflammatory properties well studied in many different systems. Here, we investigated the neuroprotective and antioxidants effects of DS obtained from ascidian *Phallusia nigra* using a neuroblastoma cell lineage Neuro-2A.

The *PnDS* showed a neuroprotective role, enhanced the mitochondrial activity even in the presence of cytotoxic effect induced by rotenone. This result of *PnDS* is similar to others observed by researchers using different glycosaminoglycans or polysaccharides in different types of neuroblastoma cells. Recently, Chuanxia et al.

observed a neuroprotective effect of CS on SH-SY5Y overexpressing α -synuclein human cell lineage after 24 h with a high CS concentration reached to 400 mg/L. Besides, chitosan (15 μ M) added on SH-SY5Y cell lineage after, cytotoxicity induced by rotenone showed a protective effect, however, it was deleterious to cells in high concentrations. In previous paper, Woods et al, using a different concentrations of heparan sulfate or CS (15 μ g/mL) in neurodegeneration induced by β -amyloid (25-35) on cultured hippocampal neurons didn't observed an influence on the cell viability with low GAGs concentrations, but an protective effect in others parameters analyzed. The role in mitochondrial activity, observed here, on Neuro-2A cells was only after 72h in very low *PnDS* (1.5 nM) concentration. This could be attributed a different structure found in *PnDS*, while, CS obtained from mammals have repeating disaccharides comprising glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylgalactosamine (GalNAc) (Sugahara 2003), and chitosan contain repeating units of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine (Islam et al. 2017), *PnDS*, have a co-polymeric structure, compared to CS, enriched in iduronic acid (IdoUA) (Pavão et al, 1995). The high content of IdoA disaccharide is associated to neuronal cell outgrowth observed in mouse hippocampal cultures (Hikino et al. 2003; Bao et al. 2005) and should be responsible for the high neuroprotective effect of *PnDS* even in very low concentrations.

PnDS in an MTT assay revealed a limited growth as observed in optical density, and confirmed by cell counting using DAPI. The number of cells after *PnDS* only or in a co-incubation with rotenone stopped growing, this fact, could be attributed to cell death, induced by *PnDS*. However, FDA and IP staining showed that more cells were found viable after *PnDS* incubation in comparison with rotenone. We believe that *PnDS* didn't induce cell death and, may be, it will act reducing cell proliferation and inducing cell differentiation, as observed, by neuronal appearance, with long neurites emerged from

soma, observed by SEM and acquired after *PnDS* addition. Heparin, a glycosaminoglycan analogous to DS, is related to influence in cell fate decision, which can induce differentiation of neural stem cells (NSC) and embryonic stem cells (ESC) into neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Yu et al. 2017; Lei et al. 2017). Interestingly, in an experiment conducted with NSC, hep and basic fibroblast growth Factor (bFGF), induced committing and differentiation of NSC into dopaminergic neurons after three days of incubation in a Parkinson disease mouse model (Yu et al. 2017).

Interestingly, a DS with similar structure to *PnDS* is found restrict to neurogenic niche of adult mammalian brain, and the specific localization of DS may be presuming the important function of this molecule in the differentiation and maintenance of neural stem cells in the niche (Sugahara 2003).

In addition, DS from different marine organisms, with different disaccharide sulfation pattern and IdoA content, were incubated with hippocampal mouse or embryonic rat neurons and promoted a distinct action on neurite outgrowth (Hikino et al. 2003). Corroborating with Hikino et al. our data on neurite outgrowing demonstrated a longest length of neurite observed with Neuro-2A after *PnDS* incubation. Hikino and their colleagues, attribute this fact to [GlcUA/IdoUA(2S)-GalNAc(6S)] structure, which has a different sulfation pattern and not only because the charge density.

Furthermore, the antioxidant activity observed here using *PnDS*, adding a novel important characteristic to DS molecule. *PnDS* considerable reduced oxidative stress, decreasing ROS production, LPO levels and inducing antioxidant capacity. Many molecules could have a scavenger property and, in fact, nervous extracellular matrix (ECM) is addressed to protect neural cells from damages. ECM should be partially

responsible for its capacity, mainly, because, free radicals formed in this environment putatively interacting with its components, especially with GAGs (Albertini et al. 2000). On the other hand, in the neurodegenerative diseases, there are changes in the extracellular environment, varying GAG content, and, consequently improve oxidative stress (Emerit et al. 2004; Soleman et al. 2013; Suttkus et al. 2016).

Recently, chitosan and CS was described to reduce oxidative stress on SH-SY5Y Parkinson in vitro model (Canas et al. 2007; Manigandan et al. 2018), however, different mechanisms were attributed to antioxidant roles of GAGs. In fact, little information could be found in the literature about it. The different mechanisms should be: chelating ions properties of GAGs, direct interaction with ROS, including superoxide anions though GAG-bound with extracellular SOD, pericellular net especially in the central nervous system to interfere with diffusion of potentially harmful molecules and mediating intracellular signal transduction pathways bound to receptors and for endocytosis of GAGs (Albertini et al. 2000; Dudas et al. 2008; Kadomatsu and Sakamoto, 2014). Here, using *PnDS*, we observed less cells stained by IP, indicating an interference in apoptotic pathway, as described for heparin which, inhibits glomerular cell apoptosis in cell culture (Ishikawa and Kitamura, 1999) and attenuates trophoblast apoptosis (Bose et al. 2005). On the other hand, we observed, an improve of SOD and CAT activity, that indicates the transduction of signal and activation of intracellular cell signaling. CS was described to activate protein kinase C, which phosphorylates Akt that, via the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt pathway (Canas et al. 2007). We didn't investigate this pathway, however, because, CS and DS are analogous it's possible that DS is acting through Akt pathway, to perform an antioxidant role. Adding, some types of cells are capable to endocytose GAGs such as

CS and HS and in this case the effects of GAGs is not mediated by cell membrane receptor (Prinz et al. 1978; Laparra et al. 2009).

Moreover, Neuro-2A cells in the presence of rotenone, a knowledge mitochondrial disruptor, and *PnDS*, in detriment of ATP, may change their metabolic rout as observed with some types of cells such hepatocytes after viral infections, as a mechanism of protection and to generate energy (El-Bacha and Da Poian, 2013).

Conclusion

Finally, *PnDS* indicate by our experiments showed a notable neuroprotective and antioxidant role that gives more attention and could be useful in the future for pharmacological treatment or regenerative medicine strategies may possibly delay the progression of neurodegenerative diseases of CNS diseases or promote tissue regeneration.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES, FAPERJ and CNPQ. This research was supported by resources supplied by the Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM.

Conflicts of Interest

We have no conflict of interest to declare.

References

Albertini R., Passi A., Abuja P. M. and De Luca G. (2000) The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation. *Int J Mol Med.* 6, (2) 129-36.

Amado L. L., Garcia M. L., Ramos P. B., Freitas R. F., Zafalon B., Ferreira J. L. R., Yunes J. S. and Monserrat J. M. (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment.* 407, 2115-2123.

Ban T. A., Morey L. C., Aguglia E., Batista R., Campanella G., Conti L., Dreyfus J. F., Fjetland O. K., Grossi D., Modafferri A., Marin-Perez G. A., Postiglione A., Santini V., Torres-Ruiz A. and Vergara L. E. (1991) Glycosaminoglycan polysulfate in the treatment of old age dementias. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 15, (3), 323-42.

Bao X., Muramatsu T. and Sugahara K. (2005) Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J Biol Chem.* 280, 35318–35328.

Beutler E. (1975) Disorders in glutathione metabolism. *Life Sciences.* 16, (10), 1499–1505.

Bose S., Dhillon N., Ross-Cisneros F. N. and Carelli V. (2005) Relative post-mortem sparing of afferent pupil fibers in a patient with 3460 Leber's hereditary optic neuropathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 243, (11), 1175–1179.

Bradford M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, (1-2), 248–254.

Canas N., Valero T., Villarroya M., Montell E., Verges J., Garcia A. G. and Lopez M. G. (2007) Chondroitin Sulfate Protects SH-SY5Y Cells from Oxidative Stress by Inducing Heme Oxygenase-1 via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 323, (3), 946–953.

Dudas B. and Semeniken K. (2012) Glycosaminoglycans and Neuroprotection. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 325–343.

Dudas B, Rose M., Cornelli U., Pavlovich A. and Hanin I. (2008) Neuroprotective Properties of Glycosaminoglycans: Potential Treatment for Neurodegenerative Disorders. *Neurodegenerative Diseases*. 5, (3-4), 200–205.

Dugger B. N. and Dickson D. W. (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 9, (7), a028035.

El-Bacha T. and Da-Poian A. T. (2013) Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 45, (1), 41–46.

Emerit J. and Edeas M., Bricaire F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 58, (1), 39-46.

Ferreira-Cravo M., Piedras F. R., Moraes T. B., Ferreira J. L. R., De-Freitas D. P. S., Machado M. D., Geracitano L. A. and Monserrat J. M. (2007) Antioxidant responses

and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere*. 66, (7), 1367–1374.

Hermes-Lima M. (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 19, (3), 271–280.

Hikino M., Mikami T., Faissner A., Vilela-Silva A. C., Pavão M. S. and Sugahara K. (2003) Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. *J Biol Chem*. 278, 43744–43754.

Ishikawa Y. and Kitamura M. (1999) Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin. *Kidney International*. 56, (3), 954–963.

Islam M. S., Haque P., Rashid T. U., Khan M. N., Mallik A. K., Khan M. N., Khan M. and Rahman M. M. (2017) Core-shell drug carrier from folate conjugated chitosan obtained from prawn shell for targeted doxorubicin delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 28, (4), 55.

Kadomatsu K. and Sakamoto K. (2014) Sulfated glycans in network rewiring and plasticity after neuronal injuries. *Neuroscience research*. 78, 50-54.

Kozłowski E. O., Pavão M. S. G. and Borsig L. (2011) Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1807–1815.

Laparra J. M., Barberá R., Alegría A., Glahn R. P. and Miller D. D. (2009) Purified Glycosaminoglycans from Cooked Haddock May Enhance Fe Uptake Via Endocytosis in a Caco-2 Cell Culture Model. *Journal of Food Science*. 74, (6), H168–H173.

Lehri-boufala S., Ouidja M. O., Barbier-Chassefière V., Hénault E., Raisman-Vozari R., Garrigue-Antar L. and Morin C. (2015) New Roles of Glycosaminoglycans in α -Synuclein Aggregation in a Cellular Model of Parkinson Disease. *Plos one*. 10, (1), e0116641.

Lei X., Cai S., Chen Y., Cui J., Wang Y., Li Z. and Li Y. (2017) Down-regulation of interleukin 7 receptor (IL-7R) contributes to central nervous system demyelination. *Oncotarget*. 8, (17), 28395-28407.

Maïza A., Chantepie S., Vera C., Fifre A., Huynh M. B., Stettler O. and Papy-Garcia D. (2018) The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. *FEBS Letters*. 592, (23), 3806-3818.

Manigandan V., Nataraj J., Karthik R., Manivasagam T., Saravanan R., Thenmozhi A. J. and Guillemin G. J. (2018) Low Molecular Weight Sulfated Chitosan: Neuroprotective Effect on Rotenone-Induced *In vitro* Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*. (3), 505-515.

Migliore L. and Coppedè F. (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 674, (1-2), 73–84.

Montserrat J. M., Geracitano L. A., Pinho G. L., Vinagre T. M., Faleiros M., Alciati J. C. and Bianchini A. (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using

the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch Environ Contam Toxicol.* 45, (2), 177-83.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 65, (1-2), 55–63.

Pavão M. S., Mourão P. A., Mulloy B. and Tollefsen D. M. (1995) A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem.* 270, 31027–31036.

Pavão M. S. G., Aiello K. R., Werneck C. C., Silva L. C., Valente A. P., Mulloy B., Colwell N. S., Tollefsen D. M. and Mourão P. A. S. (1998) Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. ***J Biol Chem.*** 273, 27848–27857.

Pemberton K., Mersman B. and Fenglian X. U. (2018)) Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab. *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education.* 16, (2), A186-A194.

Prinz R., Schwermann J., Buddecke E., and Von-Figura, K. (1978) Endocytosis of sulphated proteoglycans by cultured skin fibroblasts. *Biochemical Journal.* 176, (3), 671–676.

Rauvala H., Paveliev M., Kuja-Panula J. and Kuleskaya N. (2017) Inhibition and enhancement of neural regeneration by chondroitin sulfate proteoglycans. *Neural Regen Res.* 12, (5), 687-691.

Rowlands D., Sugahara K. and Kwok J. (2015) Glycosaminoglycans and Glycomimetics in the Central Nervous System. *Molecules*. 20, (3), 3527–3548.

Sardet C., McDougall A., Yasuo H., Chenevert J., Pruliere G., Dumollard R., Hudson C., Hebras C., Le-Nguyen N. and Paix A. (2011) Embryological Methods in Ascidians: The Villefranche-sur-Mer Protocols. *Methods Mol Biol*. 770, 365-400.

Shively J. E. and Conrad H. E. (1976) Nearest neighbor analysis of heparin: identification and quantitation of the products formed by selective depolymerization procedures. *Biochemistry*. 15, (18), 3943–3950.

Soleman S., Filippov M. A., Dityatev A. and Fawcett J. W. (2013) Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience*. 253,194-213.

Stelling M. P., De-Bento A. A., Caloba P., Vilanova E. and Pavão M. S. G. (2019) Methods for Isolation and Characterization of Sulfated Glycosaminoglycans from Marine Invertebrates. *Methods in Molecular Biology*. 55–70.

Sugahara K. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*. 13, (5), 612–620.

Sun M. and Zigman S. (1978) An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical Biochemistry*. 90, (1), 81–89.

Suttkus A., Morawski M. and Arendt T. (2014) Protective Properties of Neural Extracellular Matrix. *Molecular Neurobiology*. 53, (1), 73–82.

Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E. and Blasco J. (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 277, (6), R1612–R1619.

Yu Z., Zhang S., Wang D., Fan M., Gao F., Sun W. and Li S. (2017). The significance of uric acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Medicine*. 96, (45), e8502.

Figure Legends

Figure 1.

The whole study was designed in order to characterize the neuroprotective activity of *PnDS*, as well as the antioxidant activity against rotenone oxidative stress. The figure summarizes the experimental conditions used for each purpose in Neuro-2A strain. For detailed description of each experimental groups, see in Material and Methods. Mitochondrial activity by MTT; Autofluorescence by DAPI, FDA and PI; FDA neurite growth; MEV morphological analysis and phase contrast; Antioxidant capacity by ROS, SOD, CAT, ACAP and LPO.

Figure 2.

Isolation and characterization of *Phallusia nigra* total polysaccharides. Both (A) and (B) polysaccharides were applied on a 0.8% agarose gel. in 0.05 M 1,3-diaminopropane / acetate (pH 9.0), fixed with 0.1% N-cetyl-N, N, N-trimethylammonium solution after 12 h, and stained (after drying) with 1% toluidine blue. A mixture of mammalian glycosaminoglycans of chondroitin 4-sulfate (CS) and heparin (Hep) was used as standard. (B) Polysaccharides extracted before (-) and after (+) incubation with chondroitinase AC or ABC and treatment with nitrous acid.

Figure 3.

Mitochondrial activity analysis by the MTT method in the Neuro-2A. (A) at times 0, 24, 48 and 72 hours; B) exposed to 0.12-2.0 μM rotenone; C) exposed to 0.75-12 nM *pnDS* and D) exposed to 1.0 μM rotenone and 1.5 nM *pnDS*; for a period of 72 hours. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Results are representative of 3 independent experiments and statistical analyzes were performed by nonparametric ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (*) and rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

Figure 4.

Micrograph of Neuro-2A cells. A, C, E and G) DAPI-labeled cell nuclei (1: 1000) emitting blue fluorescence. B, D, F and H) by phase contrast. I) Percentage of cells present in Neuro-2A cultures exposed to Rotenone (1.0 μM) to DS (1.5 nM). The result was obtained within 72 h after DAPI treatment (the arrows indicate the neuritic extension). Four cell fields per well were analyzed. The bars represent the standard error. Statistical analyzes were performed by the nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (*) and rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

Figure 5.

Quantification of neuritis in FDA-labeled Neuro-2A cells. A) Relationship between the presence of neurites per cell; B) Percentage of neurons with prolongations; C) Length of neuritic prolongation. The result was obtained within 72 h after treatment ($n = 3$ independent experiments, 4 cell fields per well were analyzed) using the NIH

ImageJ software, version 1.47t. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Statistical analyzes were performed by the nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (*) and DS (&) group ($p \leq 0.05$).

Figure 6.

Scanning electron micrograph of Neuro-2A cells. After incubated with rotenone and *PnDS* for 72h (the arrows indicate neuritic extension and presence of membrane invaginations (stars), characterizing profound changes in the cell surface). $n = 2$.

Figure 7.

Micrograph of Neuro-2A cells to assess cell viability. A, D, G and J) Histochemical with FDA; B, E, H and K) PI histochemistry) C, F, I and L) Overlap (the arrows indicate the neuritic extension). Scale bar: 100 μ m. $n = 4$.

Figure 8.

Percentage of viable and apoptotic cells in Neuro-2A cells exposed to 1 μ M Rotenone and 1.5 nM DS. A) FDA-labeled viable cells; B) PI-labeled apoptotic cells. The result was obtained within 72 h after treatment using different PI and FDA dyes. Four cell fields per well were analyzed. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Results are representative of 3 independent experiments and statistical analyzes were performed by nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (*), DS group (&) and rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

Figure 9.

Effects of *pnDS* and rotenone alone or together on ROS production in Neuro-2A cells. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Results are representative of 4 independent experiments and statistical analyzes were performed by the nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from the rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

Figure 10.

Effects of *pnDS* and rotenone alone or together on the antioxidant system in Neuro-2A cells. A) SOD activity (U / mg protein) in murine neuroblastoma Neuro-2A cells treated with rotenone and *PnDS*. B) CAT activity (U / mg protein) in rotenone-treated murine Neuro-2A murine neuroblastoma cells of *Phallusia nigra*. C) Effects of DS and rotenone alone or together on the antioxidant capacity of ROS in Neuro-2A cells. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Results are representative of 4 independent experiments and statistical analyzes were performed by the nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (*) and rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

Figure 11.

Effects of DS of *Phallusia nigra* and rotenone alone or together on lipid peroxidation. The bars represent the means of the triplicate analysis, with their respective standard deviations. Results are representative of 4 independent

experiments and statistical analyzes were performed by the nonparametric ONE-WAY ANOVA test and Tukey post-test. Statistically significant difference from control (^) and rotenone group (#) ($p \leq 0.05$).

10.2. ARTIGO DE REVISÃO

THE ROLE OF DERMATAN SULFATE IN NEURITOGENESIS

Graziele Fonseca de Sousa^{1,2,3}, Arthur Giral-di-Guimarães², Cintia Monteiro de Barros¹

1. Laboratório Integrado de Morfologia – Instituto de Sustentabilidade e Biodiversidade – NUPEM/UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Macaé – RJ – Brasil.
2. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Campos dos Goytacazes – RJ – Brasil.
3. Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Campos dos Goytacazes – RJ – Brasil.

Corresponding Author: cintiabarrosmacae@gmail.com

Key Words: glycosaminoglycan, Neurodegenerative disease, extracellular matrix, nervous system.

Abbreviations: CNS, central nervous system; CS, chondroitin sulfate; FGF, fibroblast growth factor; GAG, glycosaminoglycan; HS, heparan sulfate; DS, dermatan sulfate; KS, keratan sulfate, HA, hyaluronan; IdoA, L-iduronic acid; GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine; DS4ST1, DS-specific 4-*O*-sulfotransferase; NGF, nerve growth factor; BDNF, brain derived neurotrophic factor; HP, heparin; ECM, extracellular matrix; HA, hyaluronan.

ABSTRACT

Many evidences suggest the involvement of dermatan sulfate (DS), a glycosaminoglycan (GAG) present in the extracellular matrix (ECM) of the central nervous system (CNS), in brain development, neuritogenesis and neuronal dysfunctions. Among these events, the involvement of DS in the development of the CNS has attracted attention from a therapeutic point of view for the potential application of DS to nerve regeneration. The several functions of DS can be mainly attributed to structural variability of their polysaccharide moieties. Old and recent reports about the relationship among DS structure and its function are helping to discover potential novel neurobiological roles for DS, increasing the understanding of a great variety of biological processes. Therefore, here we reviewed the recent knowledge about the possible involvement of the DS in the neuritogenesis of the CNS, suggesting the importance of these studies in therapeutic strategies which are promising for future perspectives.

1. INTRODUCTION

The extracellular matrix (ECM) in the nervous system is a complex meshwork of supporting molecules arranged in diffuse form, around cell surface and/or associated to it. These ECM usually presents net-like formations surrounding neural cells. It is fundamental in maintaining the homeostasis of the central nervous system (CNS), acting as a scaffold for them and harboring chemical signaling molecules that are important for several neural processes, both in normal, physiological processes and in neural diseases (Bovolenta and Fernaud-Espinoza 2000; De Wit and Verhaagen 2007; Oliveira *et al.*, 2015).

Many evidences suggest the involvement of dermatan sulfate (DS), a glycosaminoglycan (GAG) present in the ECM of the CNS, in brain development, neuritogenesis and neuronal dysfunctions. The main DS involved in a neuritogenic activity is composed by oversulfated disaccharides that contain L-iduronic acid (IdoA) residues (Cummings and Pierce 2014). Besides, IdoA occurs in variable proportions in DS and, as a result of the different position of the carboxyl moiety together with the different pattern of sulfation found in their disaccharides, it generates a more flexible polysaccharide chain, allowing specific interactions with several proteins and other polysaccharides (Cilla *et al.*, 2013). Thus, DS has been suggested to have many potential neurobiological functions (Rogers *et al.*, 2011; Hayes and Melrose 2018).

DS is found relatively late in the evolutionary tree and appears from the Echinodermata and Mollusca group of the animal Kingdom (Yamada 2015). It has been found in some invertebrate species and in the whole group of the vertebrates (subphylum Vertebrata) and it is absent in the Nematoda, Phatyhelminthe, Coelenterata and Porifera animal groups (Cole and McCabe 1991; Nader, 1991; Lafont *et al.*, 1992; Bovolenta *et al.*, 1993; Spillman *et al.*, 1995). Moreover, DS has been found in large amounts in tissues of some marine invertebrate species, which represents a good source for its purification (Nader *et al.*, 1999; Yamauchi *et al.*, 2011).

In this review we will describe the role of DS in neuritogenesis, demonstrating the importance of this molecule in potential therapeutic strategies, being promising for future perspectives.

2. GLYCOSAMINOGLYCANS

GAGs are considered a fraction of the glycoconjugates in the cell membranes, in the ECM and in some cell granules of all tissues. The ability to connect protein-protein or protein interactions is identified as an important determinant of cellular answer on development, homeostasis and disease (Oohira *et al.*, 1991; Soleman *et al.*, 2013). It can act as a physical and biochemical barrier, creating specific microenvironments around cells. They build size-selective barriers that are permeable only by small entities, such as Ca^{2+} and Na^+ that can freely diffuse and promote extracellular cation homeostasis (Costa *et al.*, 2017).

GAGs are long, nonbranched polysaccharide composed of repeating disaccharide regions of uronic acid (D-glucuronic acid or IdoA) and an amino sugar (D-galactosamine or D-glucosamine) or galactose (Hook *et al.*, 1984). They are distinguished from each other by the type of hexose, hexosamine, or hexuronic acid unit present and by the geometry of the glycosidic linkage between the repeated units (Allen 2013).

Based on the difference of repeating disaccharide units comprising GAGs, they can be categorized into six main groups: heparin (HP), heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS) and hyaluronic acid (HA) (Gallo, 2000; Yamada *et al.*, 2011).

The biosynthesis involves several enzymes that assemble the GAG backbone and subsequently add sulfate in their disaccharide at specific positions, except HA that is a non-sulfated GAG (Li *et al.*, 2016). Chains are synthesized by the attachment of a tetra-saccharide linker which is covalent attached to protein core. Following attachment of the linker to the protein core, the chain of glucosamine, galactosamine or galactose is transferred determining whether type of GAG is produced (Li *et al.*, 2008; Yamada and Sugahara, 2008). Subsequently, the sugar chains are extended by the addition of two alternating monosaccharides, either *N*-acetylgalactosamine/glucuronic acid in chondroitin sulfate/DS or *N*-acetylglucosamine/glucuronic acid in heparin/heparan sulfate on the tetra saccharides linker (Gandhi and Mancera, 2008; Imberty *et al.*, 2007).

These GAG chains are modified by sulfation at various hydroxy group positions and also by the epimerization of uronic acid residues during the biosynthetic process, thereby giving rise to structural diversity, which plays an important role in a wide range of biological roles including cell proliferation, tissue morphogenesis, infections by viruses, and interactions with growth factors, cytokines, morphogens and neuritogenesis (Mizumoto and Sugahara, 2012; Venkatachalam, 2003).

2.1. Dermatan Sulfate

DS synthesis occurs by addition of L-iduronic acid (IdoA) and N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) residues alternately to a protein core. Many of the GlcA residues become epimerized at C-5 to yield IdoA. Subsequently, O-sulfation may occur at the C-4 (by a dermatan 4-sulfate sulfotransferase (D4ST)) or C-6 (by a dermatan 6-sulfate sulfotransferase (D6ST)) positions of GalNAc or at the C-2 position of IdoA (reaction catalyzed by the DS 2-O-sulfotransferase (DS2ST)). Due the epimerization and sulfation reactions the structure of DS is heterogeneous (Penc *et al.* 1998; Lyon *et al.*, 1998; Anders *et al.*, 2012).

The variety in DS structure is responsible for giving these disaccharide subtypes: IdoUA-GalNAc (iO), IdoUA-GalNAc (4S) (iA), IdoUA-GalNAc (6S) (iC), IdoUA (2S)-GalNAc (4S) (iB), IdoUA(2S)-GalNAc(6S) (iD) and IdoUA-GalNAc (4S, 6S) (iE or H) (Figure 1). These molecules comprehend a range of molecular weight from 12 to 45 kDa with an average around 25 kDa (Jiang *et al.*, 2005; Sant *et al.*, 2010; Xu and Esko 2014).

The ratio of IdoUA to GlcUA varies depending on the tissue source or the animal species where was obtained the molecule (Linhardt *et al.*, 1991a; Hikino *et al.*, 2003; Nandanaka *et al.*, 1998; Faissner *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1992), stage of development (Herndon and Lander 1990; Fernaud-Espinosa *et al.*, 1996; Grumet *et al.*, 1996; Hacker *et al.*, 1997), as well as the method of purification (Allen *et al.*, 2012). The IdoUA content of DS polymers may range from 1 to over 90% even in many tissues from different animals and methodologies used (Kresse *et al.*, 1993; Bourin and Lindahl, 1993).

This pattern of sulfation is responsible for a wide range of biological events involving DS, such as the assembly of extracellular matrices, the transduction of signals through binding to growth factors, wound healing, anti-coagulation and studies have demonstrated a stimulatory effect on neurite outgrowth. Other important characteristic of DS structure is the content of IdoA, which could be vary depending of each organ, development stage, animal species used to obtain the molecule, among others (Trowbridge and Gallo 2002; Litwack *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2013; Miyake *et al.*, 2010; Theocharis *et al.*, 2015; Malavaki *et al.*, 2008).

For example, DS derived from porcine skin (Sakai *et al.*, 2003), marine clam (Volpi and Maccari 2009), ascidian (Pavão *et al.*, 1995; Pavão *et al.*, 1998), hagfish notochord (Anno *et al.*, 1971), and sea urchin (Vilela-Silva *et al.*, 2001) are comprised of repeating disaccharide units having a high IdoA content (more than 80%) and the DS possess both anticoagulant and neurite outgrowth activities (Hikino *et al.*, 2003). In contrast, DS isolated from horse aorta (Fransson and Havsmark 1970), embryonic pig brain (Bao *et al.*, 2005), mouse brain (Bao *et al.*, 2005), mouse skin (Maccarana *et al.*, 2009) and HEK293 cells (Laremore *et al.*, 2010) have a low content of IdoA, and can associate with growth factors such as pleiotrophin and midkine. These differences in the IdoA contents of DS chains are attributable to the levels of DS epimerases (DS-epi1 and -epi2) in Golgi apparatus of the cells comprising in each animal species and tissues (Malmstrom *et al.*, 2012; Karamanou *et al.*, 2017).

During development, IdoA-containing structures (iA, iB, iE and iD) are ubiquitous in different parts of the brain (Mitsunaga *et al.*, 2006), although at low concentrations. Indeed, DS in brains of newborn mice comprise only 2% iduronic acid (Crespo *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2010; Bartolini *et al.*, 2012). The DS bioenzymatic machinery is carefully regulated during brain development, resulting in a large variation of IdoA-containing structures. For example, in the cerebellum, iD decreases and iB increases from newborn to adult age (Akatsu *et al.*, 2011). Interestingly, the embryo-derived DS shows a greater binding of FGFs (FGF-2, 10 and 18), pleiotrophin, midkine, vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) than DS from the brains of adult animals (Sugahara and Mikami *et al.*, 2007; Thelin *et al.*, 2013).

It was demonstrated that the rare oversulfated disaccharide unit's iD present in embryonic pig brain-derived DS chains are critical elements for neuritogenesis

(Sugahara and Yamada 2000; Sugahara *et al.*, 2003). In addition, iE unit isolated from the hagfish notochord, has a unique oversulfated structure characterized by a major disaccharide. Further, exogenous iE exhibited appreciable inhibitory activity in midkine (MK)-mediated neuronal cell adhesion (Anno *et al.*, 1971; Ueoka *et al.*, 1999). However, the presence of oversulfated iE structures in the mammalian brain has not been rigorously characterized (Cole and McCabe 1991 Bovolenta *et al.*, 1993).

One particularly well-studied DS binding interaction occurs with heparin cofactor II (HCII). This serpin homolog of antithrombin III acts by inhibiting the procoagulative effect of thrombin (Kozlowski *et al.*, 2011). This effect is enhanced 1000-folds in the presence of DS, which are characterized by the predominant disulfated disaccharide units of iB, were shown to exert strong anticoagulant activity (Pavão *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 2005).

In fact, the anti-inflammatory activity is among the most widely studied properties of DS glycosaminoglycans (Volpi 2010; Ben Mansour *et al.*, 2010; Krichen *et al.*, 2017a). Furthermore, sulfated DS chain from marine sources possess other important pharmacological activities such as antiviral, antiproliferative, tissue repair and antitumoral activities (Rani *et al.*, 2017; Krichen *et al.*, 2016; Krichen *et al.*, 2017b). These functions are attributed to the importance of the molecular size and some structural features required for biological activities, especially sulfate clusters to ensure interactions with cationic proteins (Mulloy 2005, Trowbridge *et al.*, 2002; Pomin 2015; Krichen *et al.*, 2018).

Therefore a number of marine based polysaccharides has been evaluated for their antiinflammatory activity (Cumashi *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2009), as these eliminate the challenges and risks associated with molecules sourced from mammals (Klajnert *et al.*, 2006). Mammalian DS has been suggested as a potential alternative to heparin as it exhibits lower anticoagulant activity than heparin and therefore its use poses a smaller risk of hemorrhage (Fernandez 1986). DS with a variety of degrees and patterns of sulfation have been identified in the past in Ascidians, but some of these polysaccharides have been shown to also have anticoagulant activities (Pavão *et al.*, 1995; Pavão *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2016).

The reported functions of brain DS chains in neuritogenesis are controversial. DS act as neuritogenic molecules and also as modulate axonal growth (inhibiting or stimulating) regeneration in the injured CNS. Such apparently contradictory functions are probably attributed to the structural diversity of DS chains (Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

The DS appear to modulate development of neuronal polarity *in vitro*, favoring either axon or dendrite outgrowth from mesencephalic neurons (Lafont *et al.*, 1992). In the adult brain, DS has present in small amounts. These changes in composition have been postulated to influence developmental events such as axonal elongation (Walicke 1988; Sugahara 2003; Li *et al.*, 2013).

Due to the important role of DS in CNS, the investigation of the molecular mechanisms in which this molecule is involved, would lead to the future development of therapeutics in many neurodegenerative diseases.

3. THE GAGS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Approximately 20% of the volume of the adult CNS is occupied by an extracellular space filled with proteins and polysaccharides that comprise the ECM of the CNS (Garwood *et al.*, 2001). These GAGs are synthesized by both neurons and glia (Thwaites *et al.*, 2009) and almost all of them have been detected in brain tissue (Kleene and Schachner, 2004). The main GAGs in the brain are CS and HS, which comprehend a different proteoglycan. DS and KS are found in small amounts in adult nervous system but DS has a variable production during development which is found in high amounts in embryos (Sugahara *et al.*, 2007; Kleene and Schachner, 2004). In fact, radial glia is capable to produce and hybrid CD/DS molecule in mammalian embryo (Sugahara and Mikami, 2007; von Holst *et al.*, 2006). Hyaluronan shares an interesting localization with CSPGs in Perineuronal Nets (PNNs) and heparin was not been described yet (Kleene and Schachner 2004).

The interaction between these cells and their environment play an important and regulatory role in the CNS even in the adult stage but mainly in the development which evolves a series of specific steps such as: cell proliferation, neuron differentiation,

neuron extension, axon outgrowth, synaptogenesis, selective neuronal death among others (Arendt *et al.*, 2008; Malavaki 2008).

Many potentially important interactions also occur between cells and the neural ECM. Although the organization of the ECM in the vertebrate CNS is not well understood and it can be considered as a complex and dynamic association of extracellular molecules that is relatively rich in GAGs (Faissner *et al.*, 1994; Bao *et al.*, 2004; Deepa *et al.*, 2006; Krishnaswamy *et al.*, 2019).

GAGs are found in a PNNs that are aspecialized ECM that surround the soma, neurites and axons initial segments of neurons sub-population in the CNS (Kwok *et al.*, 2011; Miyata and Kitagawa, 2017). PNNs are composed of CSPGs with GAG side chains, hyaluronic acid, tenascin-R, and link proteins that coalesce to form molecular aggregates around neuronal cell bodies and processes (Mohan *et al.*, 2018). Timing of PNN formation corresponds to the end of the critical period during which synaptogenesis, synaptic refinement and maturation of the nervous system occur (Izumikawa *et al.*, 2014), suggesting that formation of PNNs depends on completion or fixation of plastic change in neural activity (Koike *et al.*, 2015).

Enzymatic disruption of PNNs by chondroitinase ABC treatment reactivates neural plasticity in the adult cerebral cortex after the critical period has ended, suggesting that formation of PNNs restricts neural plasticity in the adult brain (Pizzorusso *et al.*, 2002). In several regions of the brain, including the cerebral cortex, PNNs are selectively formed around inhibitory interneurons expressing parvalbumin, which is implicated in many neural processes including regulation of the critical period plasticity, where they are found higher levels of DS in the olfactory bulb, cerebrum/midbrain, cerebellum and pons/medulla oblongata at all developmental stages (Bastmeyer and O'Leary, 1996; Sobel 2001; Hensch 2005).

1. DISTRIBUTION OF DS IN THE NERVOUS SYSTEM

DS plays crucial roles in various biological events such as: the development of the CNS (Sugahara and Mikami 2007), wound healing (Penc *et al.*, 1998; Trowbridge *et al.*, 2002), growth factor signaling (Nandini and Sugahara 2006; Yamada and

Sugahara 2008), and proliferation of a neural stem cell progenitor (von Holst *et al.*, 2006). Among these events, the involvement of DS in the development of the CNS has attracted attention from a therapeutic point of view for the potential application of DS to nerve regeneration (Kerever *et al.* 2015). Several studies have shown that the sulfation pattern of DS in the brain alters during development, characterized by an increase in 4-O-sulfation and a decrease in 6-O-sulfation (Kitagawa *et al.*, 1997; Akita *et al.*, 2008; Bartley *et al.*, 2005, Pevny and Nicolis 2009). In addition, both the increase of 6-O-sulfation disaccharides and the presence of IdoA have been shown to be crucial factors for the neurite growth-promoting activity of DS (Nadanaka *et al.*, 1998; Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2005). This type of DS is found in high amounts during development of the mammalian CNS synthesized by both neurons and glial cells (oligodendrocytes, astrocytes and microglia) and are crucial for its development as well as for its homeostasis (Dietrich 1983, Esko 1991, Rowlands *et al.*, 2013).

The importance of DS on CNS development was better elucidated with results of an analysis of DS-epi2-deficient mouse. DS epimerases convert GlcA to IdoA by catalyzing the C5-epimerization of GlcA residues, which is the initial modifying step in the biosynthesis of IdoA-containing structures in DS (Ida *et al.*, 2006; Kwok *et al.* 2011). Intriguingly, the loss of C5 epimerase using the DS-epi2-deficient mouse model presents primarily a normal brain phenotype, but showed a drastic reduction in IdoA levels compared to wild-type littermates. Further analysis revealed a significant decrease in 4-O-sulfate and an increase in 6-O-sulfate expression (Verna *et al.*, 1989; Akyuz *et al.*, 2013; Kadomatsu and Sakamoto, 2014). The apparent normal phenotype of the brain that was observed in the adult DS-epi2-deficient animals suggests a possible compensatory mechanism, possibly through DS-epi1 expression. Was observed in the adult DS-epi2-deficient brains, suggesting a possible compensatory mechanism, possible through DS-epi1. These results support the hypothesis that there are functional redundancies in the role of DS in the ECM (Figure 3; Bartolini *et al.*, 2012).

The DS bioenzymatic machinery is carefully regulated during brain development, resulting in a large variation of IdoA-containing structures. The proportion of iE units was very small compared with that of iB or iD units in DS from all regions of the brain

postnatal. However, differently in the cerebellum, iD decreases and iB increases from newborn to adult age (Basappa *et al.* 2009; Akatsu *et al.*, 2011), but in the mouse adulthood brain iD structure is still observed in the cortex, thalamus, cerebellum and prominent in the hippocampus, region of constant neuritogenesis (Bao *et al.*, 2006; Mitsunaga *et al.*, 2006; Akatsu *et al.*, 2011).

In situ analysis of the DS in brain sections revealed that the concentration of DS increases 2-fold during development (from postnatal day 7 to seven postnatal weeks). The proportions of DS-specific, main disaccharides, iA and iB, produced by the sequential actions of D4ST-1 and single uronyl 2-O-sulfotransferase (UST) catalyzes preferentially the 2-O-sulfation of IdoUA of iA units, forming another DS-specific iB unit, which 2S and 4S represent 2-O- and 4-O-sulfate groups, respectively, were higher in the DS chains from the other brain regions (Bruckner *et al.*, 1993; Mitsunaga *et al.*, 2006; Dullatev *et al.*, 2007b).

A dramatic increase (10-fold) in the proportion of iB occurs during development, and in contrast, iD and iE decreased to 50 and 30%, respectively, in the developing cerebellum. These results suggest that the IdoUA-containing iA and iB units along with iD and iE units in the DS play important roles in the formation of the cerebellar neural network during postnatal brain development (Mitsunaga *et al.*, 2006; Galtrey and Fawcett, 2007; Carulli *et al.*, 2010).

Therefore, characteristic functional DS chains may be distributed in the brain parenchyma, where the neural network forms during development. However, the spatiotemporal distribution of such IdoUA-containing DS structures in the brain remains largely unknown because of analytical difficulties.

2. INVOLVEMENT OF DERMATAN SULFATE IN NEURITOGENESIS

Neuritogenesis is an early event in neuronal development in which newborn neurons first form growth cones, as a prerequisite for the formation of axons and dendrites. Growth cones emerge from segmented regions of the lamellipodium of embryonic neurons and grow away from the cell body leaving behind a neurite that will eventually polarise into an axon or dendrite (Dityate *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2011). Growth cones

also function to navigate precise routes through the embryo to locate an appropriate synaptic partner (Gordon-Weeks, 2017). Dynamic interactions between two components of the neuronal cytoskeleton, actin filaments and microtubules, are known to be essential for growth cone formation and hence neuritogenesis (Figure 2). The molecular mechanisms that coordinate interactions between actin filaments and dynamic microtubules during neuritogenesis are beginning to be understood (Coles and Bradke 2015; Miyata and Kitagawa 2017).

Although CNS regenerative capacity is limited in adulthood, the CNS is a rich and complex source of DS including in during development and under pathological conditions (Figure 5; Perosa *et al.*, 2002; Purushothaman *et al.*, 2012). The heterogeneity of the DS structure may be promising as regulators of bioactive proteins interacting with soluble and membrane-associated molecules (Valcarcel *et al.*, 2017). The observed potential of DS to promote neuritogenesis *in vitro*, using primary cultures of neurons or cell lineage as models (Table 1), is important not only to show its role in the mechanistic studies about the DS in natural process of the CNS development or its role in neural diseases. They also give support to stimulate future studies aiming to directly test the DS therapeutic effect in experimental designs using animals' models of neural lesions. Thus, it would be possible to evaluate the real beneficial DS effect in CNS repair, evaluating by which mechanisms, which could be of great interest for regenerative medicine (Volpi and Maccari 2009; Li *et al.*, 2013; Anthony and James 2018).

Hikino *et al.*, (2003) assessed neurite outgrowth-promoting activities of DS variants toward cultured E16 mouse hippocampal neurons and investigated the involvement of IdoUA-containing DS-type structures in the neuritogenic properties. The porcine skin DS, which contains iB units, was not neuritogenic, however DS purified from the neonatal mouse brains, containing a small proportion of iD units, exhibits a small neurite outgrowth activity.

Bao *et al.*, (2005) isolated iD unit (Table 1) from embryonic pig brains and analyzed the promote of outgrowth neurites in embryonic mouse hippocampal neurons in culture which showed neuritogenic activity revealed by interaction with growth factor pleiotrophin (PTN).

Many marine animals showed large amounts of DS with a different structure. For example, the iE structure is a major disaccharide found in DS from hagfish notochord (68%) and embryonic sea urchin (74%), while a significant amount of iD unit is found in Ascidian *Phallusia nigra* DS (>90%) (Pavão *et al.*, 1995; 2014). Interestingly, a high amount of iB disaccharide is also in DS from Ascidian *Styela plicata* (66%). In addition, DS obtained from the species of elasmobranchs *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca* that contains levels of IdoA disaccharides and iB, iC and iD unit (Higashi *et al.*, 2015). These different DS structures have been used to better comprehend the neuritogenesis activity and the function of DS in the brain and all of them showed this activity but with some peculiarity (table 1).

Neuritogenic activity was observed using DS from *S.plicata* ascidian which contains small proportion (5%) of iD units and with hagfish that comprehend (68%) (Hikino *et al.*, 2003). However, in a comparison between DS from *S.plicata* and *P. nigra*, it was observed a significant neurite outgrowth-promoting activity using *P. nigra*, which resulted specific morphological features. The *P. nigra* DS which contain high amount of iD structure (60%) induced a flattened neuronal cell soma and dendrite-like multiple neurites. On the other hand, *S. plicata* DS, exhibited only a modest neurite outgrowth-promoting activity (Hikino *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2005; Pavão, 2014).

Embryonic sea urchin that have 74% of iE DS unit, induced the better longest neurites in a hippocampus neuronal culture in comparison with ascidians DS. However, the effects on soma area and number of primary neurites/cells were best observed by *P. nigra* DS (Table 1; Hikino *et al.*, 2003).

Many studies suggest that the DS are responsible for the effect on neurons and this aspect appears to be dependent on the DS interaction with a particular neuron phenotype. Multiple DS units exhibited promoting the outgrowth of neurites of both an axonic and a dendritic nature characteristic in the embryonic brains cultured (Lafont *et al.*, 1992; Faissner *et al.*, 1994; Nandini *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 2011).

In the CNS, it is known that DS interact with growth factors and neurotrophic factors in the neural process, axon orientation and neurite outgrowth (Sugahara and Mikami, 2007) (Table 1; Figure 4), promoting axon growth (Bradbury *et al.*, 2002), neural migration and neuritogenesis (Sugahara *et al.*, 2003), apparently regulating the

differentiation and proliferation of neuronal cells. In this process, the sulfation patterns of DS chains appear to directly influence the binding of the active proteins (Yamada and Sugahara, 2008; Berezin *et al.*, 2016).

Recent evidence has indicated that CS–DS also contributes to several signaling pathways and various biological events (Sugahara and Mikami 2007; Sugahara *et al.*, 2003). The specific arrangement of the sulfation patterns of CS–DS chains is known to modulate various signaling pathways such as Wingless/int-3a (Wnt-3a) involved in many developmental and disease-related processes to regulate cellular programs in surrounding tissues (Reichsman *et al.*, 1996; Nadanaka *et al.*, 2011); in class III semaphorins (SEMA3s) present in the neural scar and influence a wide range of molecules and cell types in and surrounding that injured tissue (Dick *et al.*, 2013; Vo *et al.*, 2013; Mecollari *et al.*, 2014); in progranulin expressed in mature neurons and microglia with protective roles in neurogenerative disorders and plays a central role in the regulation of neural inflammation, enhancing neuronal survival and stimulating neurite outgrowth activity (Hikino *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2009; King *et al.*, 2014); in family receptor protein tyrosine phosphatases (RPTPs) expressed by both neurons and glia, implicated in synaptogenesis and axon pathfinding during development and of post-injury axonal plasticity (Shen *et al.*, 2009; Shen 2014); and in the Nogo receptor family predominantly expressed in neurons (Dickendesher *et al.*, 2012; Prinz *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2014; Mizumoto *et al.*, 2015).

CS–DS are highly expressed in glial scars after injuries in the spinal cord, and the removal of CS–DS from these scars by a treatment with a bacterial CS lyase facilitated axonal regeneration. DS chains appear to play crucial roles in enhancing or preventing the elongation of axons. Although the molecular mechanism by which CS–DS proteoglycans stimulate or restrict axonal elongation has not yet been elucidated in detail, several receptors for CS–DS have recently been identified at the neuronal cell surface (Bradbury *et al.*, 2002).

Akyüz *et al.*, (2013) generated a mouse deficient in the dermatan 4-O-sulfotransferase1 (Chst14^{-/-}), a key enzyme in the synthesis of iduronic acid-containing modules found in DS but not CS. In wild-type mice, Chst14 is expressed at high levels in the skin and in the nervous system, and is enriched in astrocytes and Schwann cells. Ablation of Chst14, and the assumed failure to produce DS, resulted

in enhances axonal growth of CNS neurons as well as Schwann cell process formation and proliferation in vitro.

It has been reported that Chst14 specific for DS, but not chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 (Chst11) specific for CS, regulates proliferation and neurogenesis of neural stem cells (NSCs), indicating that CS and DS play distinct roles in the self-renewal and differentiation of NSCs. The protein levels of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor, postsynaptic density 95 (PSD95), growth associated protein 43 (GAP-43), synaptophysin (SYN) and N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) which are important in synaptic plasticity were examined and Chst14 deficiency was shown to significantly reduce the expression of these proteins in the hippocampus. Further studies revealed that Akt/mammalian target rapamycin (mTOR) pathway proteins, including protein kinase B (p-Akt), p-mTOR and p-S6, were significantly lower in Chst14^{-/-} mice, which might contribute to the decreased protein expression (Li *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2019).

3. CONCLUDING REMARKS

In view of the information containing in this review, the characterization of the minimal structures of neuroactive DS chains is important to elucidate their mechanism to promote neuritogenesis. Here, it was possible observe that DS can be found in some neurogenic regions such as hippocampus to aid in the formation of new neurons. Therefore, DS is a promising candidate for drug development that aim regenerating neurons and treating neurodegenerative disease.

SUPPORT

Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

- Akatsu C, Mizumoto S, Kaneiwa T, Maccarana M, Malmstrom A, Yamada S, Sugahara K, 2011. DS epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/DS hybrid structure in postnatal developing mouse brain. *Glycobiology*. 21:565–574.
- Akita, K, Von HA, Furukawa Y, Mikami T, Sugahara K and Faissner A. 2008. Expression of multiple chondroitin/dermatan sulfotransferases in the advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Stem Cells*. Mar;26(3):798-809. Epub 2007 Dec 13.
- Akyüz N, Rost S, Mehanna A, Bian S, Loers G, Oezen I, Schachner M. 2013. Dermatan 4-O-sulfotransferase1 ablation accelerates peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*, 247, 517–530.
- Akyuz N, Altman RB, Blanchard SC, Boudker O. 2013. Transport dynamics in a glutamate transporter homologue. *Nature*. Oct 3;502(7469):114-8.
- Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ and Barres BA. 2012. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486, 410–414.
- Allen NJ. 2013. Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1027–1033.
- Anders M, Bartolini B, Thelin MA, Pacheco B, Maccarana M. Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate: Biosynthesis and Biological Function. *J. of Histochem. Cytochem.* 60, 916–925.
- Andrews MR, Czvitkovich S, Dassie E, Vogelaar CF, Faissner A, Blits B, Fawcett JW. 2009. 9 Integrin Promotes Neurite Outgrowth on Tenascin-C and Enhances Sensory Axon Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 29(17), 5546–5557.

Anno K, Seno N, Mathews MB, Yamagata T, Suzuki S. A new dermatan polysulfate, chondroitin sulfate H, from hagfish notochord. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 237: 173–177.

Anthony JH, James M. 2018. Glycans and glycosaminoglycans in neurobiology: key regulators of neuronal cell function and fate. *Biochemical Journal*. Aug 16,475(15)2511–2545.

Arendt D, Denes A S, Jekely G, and Tessmar-Raible K, 2008. The evolution of nervous system centralization. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1523–1528.

Bao X, Muramatsu T, Sugahara K. 2005. Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. *J Biol Chem*. 280: 35318–35328.

Bao X, Nishimura S, Mikami T, Yamada S, Itoh N, and Sugahara K. 2004. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of Liduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. *J. Biol. Chem*. v.279, p.9765–9776.

Bao X, Pavão MS, Dos Santos JC, Sugahara K. 2005. A functional dermatan sulfate epitope containing iduronate (2-O-sulfate) alpha1–3GalNAc (6-O-sulfate) disaccharide in the mouse brain: demonstration using a novel monoclonal antibody raised against dermatan sulfate of ascidian *Ascidia nigra*. *J Biol Chem*. 280: 23184–23193.

Bartley BGD. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford: Cabi. 341p.

Bartolini B, Thelin MA, Rauch U, Feinstein R, Oldberg A, Malmstrom A, Maccarana M, 2012. Mouse development is not obviously affected by the absence of dermatan sulfate epimerase 2 in spite of a modified brain dermatan sulfate composition. *Glycobiology*. 22:1007–1016.

Bartolini F, Barausse A, Pörtner HO. 2012. Climate change reduced offspring fitness in littoral spawners: a study integrating organismic response and long-term time-series, *Glob Change Biol*. vol. 19, pg. 373-86.

Bastmeyer M, and O'Leary D. 1996. Dynamics of target recognition by interstitial axon branching along developing cortical axons. *The Journal of Neuroscience*, 16:4, 1450–1459.

Ben Mansour M, Dhahri M, Hassine M, Ajzenberg N, Venisse L, Ollivier V, Chaubet F, Jandrot-Perrus M, Maaroufi RM. 2010. Highly sulfated dermatan sulfate from the skin of the ray *Raja montagui*: anticoagulant activity and mechanism of action. *Comp. Biochem. Physiol. B* 156, 206–215.

Berezin AE. 2017. The Impact of Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Heart Failure “Obesity Paradox”. *Prensa Med Argent.* 103:6, 267-270

Bourin MC, Lindahl U. 1993. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J.*, 289: 2, 313-30.

Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I, MeÂndez-Otero R, Nieto-Sampedro M. 1997. Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci.*, 9:5, 977-89.

Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M., 1993b. Neurite outgrowth inhibitors associated with glial cells and glial cell lines. *Neuroreport*; 5:345±348.

Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.*, 416:6881, 636-40.

Brito AS, Arimatéia DS, Souza LR, Lima MA, Santos VO, Medeiros VP, Ferreira PA, Silva RA, Ferreira CV, Justo GZ *et al.* 2008. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. *Bioorganic Med. Chem.*, 16, 9588–9595.

Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia.* 8:183–200.

Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW. 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain.*, 133, 2331-47.

Cilla A, Marta O & José ML. 2013. Glycosaminoglycans from Animal Tissue Foods and Gut Health, *Food Reviews International*, 29:2, 192-200.

Cole GJ, McCabe CF. 1991. Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Curr Neuron.*, 7:6,1007-18.

Coles CH, Bradke F. 2015. Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol.*, 25:15, R677–R691.

Costa DS, Reis RL, and Pashkuleva I, 2017. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 19:1-26.

Crespo D, Asher RA, Lin R, Rhodes KE, Fawcett JW., 2007. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol.* 206:159–171.

Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, *et al.* 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17, 541-552.

Dermatan sulfate—Substance Summary (SID 319085006). Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319085006#section=Top> (accessed on 9 October 2018).

De-Wit JJ. 2007. VerhaagenProteoglycans as modulators of axon guidance cue function *Adv. Exp. Med. Biol.* 600, pp. 73-89.

Dick G, Tan CL, Alves JN, Ehlert EM, Miller GM, Hsieh-Wilson LC, Sugahara K, Oosterhof A, van Kuppevelt TH, Verhaagen J, Fawcett JW, Kwok JC. 2013. Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J Biol Chem*, 288:27384-27395.

Dickendeshler TL, Baldwin KT, Mironova YA, Koriyama Y, Raiker SJ, Askew KL, Wood A, Geoffroy CG, Zheng B, Liepmann CD *et al.* 2012. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci*, 15:703-712.

Dietrich CP. 1983. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica*. v.17, n.1, p.5-15.

Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. 2010. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. Nov;11(11):735-46.

Dou C, and Levine J. 1995. Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. *The Journal of Neuroscience*, 15(12), 8053–8066.

Esko JD. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Current opinion in cell biology*, v.3, n.5, p.805-816.

Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M. 1994. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell. Biol.* 126, 783±799.

Fernandez F, Vanryn J, Ofosu FA, Hirsh J, and Buchanan MR. 1986. The hemorrhagic and antithrombotic effects of dermatan sulfate. *British Journal of Haematology* 64, 309-317.

Fernaund-Espinosa, I., Nieto-Sampedro, M., Bovolenta, P., 1996. Developmental distribution of glycosaminoglycans in the embryo-nic rat brain: relationship to axonal tract formation. *J. Neurobiol* 30, 410±424.

Fransson LA, Havsmark B. 1970. Structure of dermatan sulfate. VII. The copolymeric structure of dermatan sulfate from horse aorta. *J Biol Chem*. 245: 4770–4783.

Galtrey CM and Fawcett JW. 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 54, 1–18.

Gandhi N S, and Mancera RL. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482.

Garwood J, Rigato F, Heck N, Faissner A, 2001. Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/ phosphacan--structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol Neurosci.* 19(1-2):51-64.

Gordon-Weeks PR. 2017. Phosphorylation of Drebrin and Its Role in Neuritogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1006:49-60.

Groth I, Grunewald N, and Alban S. 2009. Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides--comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. *Glycobiology* 19, 408-417.

Grumet, M., Friedlander, D.R., Sakurai, T., 1996. Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol* 3, 319±330.

Hacker U, Lin X, Perrimon N, 1997. The *Drosophila* sugarless gene modulates wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* 124, 3565± 3573.

Hensch TK. 2005. "Critical period plasticity in local cortical circuits," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 11, pp. 877–888.

Herndon ME, Lander AD. 1990. A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron.* 4:949±961.

Higashi, K., Takeuchi, Y., Mukuno, A., Tomitori, H., Miya, M., Linhardt, R.J., Toida, T., 2015. Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: Identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus paucus* and *Prionace glauca*. *PLoS ONE* 10(3), e0120860.

Hikino M, Mikami T, Faissner A, Vilela-Silva AC, Pavão MS, Sugahara K. 2003. Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward

embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. *J Biol Chem.* 278: 43744–43754.

Hook M, Kjellen L, and Johansson S. 1984. Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 53:847–869.

Ida M, Shuo T Hirano K, Tokita Y, Nakanishi K, Matsui F, Aono S, Fujita H, Fujiwara Y, Kaji T. *et al.* 2006. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 281:5982-5991.

Imberty A, Lortat-Jacob H, and Perez S. 2007. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342, 430–439.

Izumikawa T, Sato B, Kitagawa H. 2014. Chondroitin Sulfate Is Indispensable for Pluripotency and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, *Scientific Reports*, 4, 3701.

Jiang X, Xu Q, Dertinger SKW, Stroock AD, Fu TM. 2005. Whitesides, *Anal. Chem.*, 77, 2338.

Kadomatsu K, & Sakamoto K. 2014. Sulfated glycans in network rewiring and plasticity after neuronal injuries. *Neuroscience research.* v.78, p.50-54.

Karamanou K, Espinosa DCE, Fortuna-Costa A, Pavão MSGF, 2017. Biological function of unique sulfated glycosaminoglycans in primitive chordates. *Glycoconjugate Journal* June, Volume 34, Issue 3, pp 277–283.

Kerever A, Yamada T, Suzuki Y, Mercier F and Arikawa-Hirasawa E. 2015. Fractone aging in the subventricular zone of the lateral ventricle. *J. Chem. Neuroanat.* 66–67,52–60.

Kitagawa H, Tsutsumi K, Tone Y, Sugahara K. 1997. Developmental regulation of the sulfation prole of chondroitin sulfate chains in the chicken embryo brain. *J. Biol. Chem* 272, 31377±31381.

King MK, Pardo M, Cheng Y, Downey K, Jope RS and Beurel E. 2014. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol. Ther.* 141, 1–12

Klajnert B, Cortijo-Arellano M, Bryszewska M, and Cladera J. 2006. Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 577-582.

Kleene R, and Schachner M. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 195–208.

Koike T, Mikami T, Shida M, Habuchi O, Kitagawa H. 2015. Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism, *Scientific Reports*, 5, 8994.

Kozlowski EO, Pavao MSG, Borsig L. 2011. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J. Thromb. Haemost.*, 9, 1807–1815.

Kresse H, Hausser H, Schönherr E. 1993. Small proteoglycans. *Experientia*. May 15;49(5):403-16.

Krichen F, Ghilissi Z, Ben Amor I, Sayari N, Kallel R, Gargouri J, Sahnoun Z, Boudawara T, Ellouz-Chaabouni S, Bougatef A. 2018. Glycosaminoglycans from grey triggerfish and smooth hound skins: Rheological, Anti-inflammatory and wound healing properties. *Biomac. International Journal of Biological Macromolecules*; Vol 118, Part A, 15 October, Pages 965-975.

Krichen F, Ghilissi Z, Ben Amor I, Sayari N, Kallel R, Gargouri J, Sahnoun Z, Boudawara T, Ellouz-Chaabouni S, Bougatef A. 2017a. Purification and structural elucidation of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) skins and their anticoagulant and ACE inhibitory activities. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 45-53.

Krichen F, Karaoud W, Sayari A, Sila F, Kallel S, Ellouz-Chaabouni A, Bougatef J. 2016. Antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the skin of ray *Raja montagui*. *Polym. Environ.* 24 (2), 166-175.

Krichen F, Volpi N, Sila A, Maccari F, Mantovani V, Galeotti F, Ellouz-Chaabouni S, Bougatef A. 2017b. Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from tunisian fish skins. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 32–39.

Krishnaswamy, V. R., Benbenishty, A., Blinder, P., Sagi, I. 2019. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(16):3229-3248.

Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW. 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol.* Nov;71(11):1073-89.

Lafont F, Rouget M, Triller A, Prochiantz A, Rousselet A. 1992. *In vitro* control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development* 114, 17±29.

Laremore TN, Ly M, Zhang Z, Solakyildirim K, McCallum SA, Owens RT, *et al.* 2010. Domain structure elucidation of human decorin glycosaminoglycans. *Biochem J.* 431: 199–205.

Li F, Shetty AK, and Sugahara K, 2007. Neuritogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver: Involvement of the pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 282, 2956–2966.

Li HP, Komuta Y, Kimura-Kuroda J, Van Kuppevelt TH and Kawano H. 2013. Roles of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in the Formation of a Lesion Scar and Axonal Regeneration after Traumatic Injury of the Mouse Brain. *journal of neurotrauma.* v.30, p.413–425, March 1.

Li P, Matsunaga K, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2002. Picrosides I and II, selective enhancers of the mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the action of neuritogenic substances on PC12D cells. *Life Sci.*71, 1821–1835.

Li Q, Wu X, Na X, Ge B, Wu Q, Guo X, Li S. 2019. Impaired Cognitive Function and Altered Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Lacking Dermatan Sulfotransferase Chst14/D4st1. *Front Mol Neurosci.*, 11;12:26.

Linhardt RJ, Al-Hakim A, Liu J, Hoppensteadt D, Mascellani G, Biancini P and Fareed J. 1991a. Structural features of dermatan sulfate and their relationship to anticoagulant and antithrombotic activities. *Biochem. Pharm.* 42, (Suppl I) 1609-1619.

Litwack ED, Ivins JK, Kumbasar A, Paine-Saunders S, Stipp CS, Lander AD. 1998. Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev. Dyn* 211, 72± 87.

Liu CC, Zhao N, Yamaguchi Y, Cirrito JR, Kanekiyo T, Holtzman DM, 2016. Sulfatos de heparano neuronais promover amilóide patologia através da modulação do cérebro apuramento amyloid- β e agregação de Alzheimer 's disease. *Sci Transl Med*. v.8, n.332, p.332-44.

Lyon, M, Deakin JA, Rahmoune H, Fernig DG, Nakamura T, and Gallagher JT, 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.*, 273, 271–278.

Maccarana M, Kalamajski S, Kongsgaard M, Magnusson SP, Oldberg A, Malmström A. 2009. Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol Cell Biol*. 29: 5517–5528.

Maeda N, Fukazawa N, Ishii M, 2010. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Front Biosci*. 15:626–644.

Malavaki C, Mizumoto S, Karamanos N, Sugahara K, 2008. Recent Advances in the Structural Study of Functional Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in Health and Disease. *Connective Tissue Research*, 49:133–139.

Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. 2014. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front Cell Neurosci*, 8:328.

Mitsunaga C, Mikami T, Mizumoto S, Fukuda J, Sugahara K, 2006. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains in the development of cerebellum.

Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saitsu H, Tsurusaki Y, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. 2010. Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mutat*. 31, 966–974.

Miyata S and Kitagawa H. 2017. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Send to Biochim Biophys Acta*. Oct;1861(10):2420-2434.

Mizumoto S and Sugahara K, 2012. "Bone and skin disorders caused by a disturbance in the bioynthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate," in *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, N. Karamanos, Ed., pp. 97–118, Walter de Gruyter, Berlin, Germany.

Mizumoto S, Yamada S, Sugahara K. 2015. Molecular interactions between chondroitin–dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 34, 35–42.

Mohan V, Wyatt EV, Gotthard I, Phend KD, Diestel S, Duncan BW, Weinberg RJ, Tripathy A, and Maness PF. 2018. Neurocan Inhibits Semaphorin 3F Induced Dendritic Spine Remodeling Through NrCAM in Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.*; Vol. 12, N. 346.

Mulloy B. 2005. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An. Acad. Bras.Ciênc.*77, 651–664.

Nadanaka S, Clement A, Masayama K, Faissner A. and Sugahara K. 1998. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. *J. Biol. Chem.* 273, 3296–3307.

Nadanaka S, Kinouchi H, Taniguchi-Morita K, Tamura J, Kitagawa H: Down-regulation of chondroitin 4-Osulfotransferase-1 by Wnt signaling triggers diffusion of Wnt-3a. *J Biol Chem* 2011, 286:4199-4208.

Nader HB, 1991. Characterization of a heparan sulfate and peculiar chondroitin 4-sulfate from platelets. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 10518-10523.

Nader HB, et. al., 1999. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Brazilian journal of Medical and Biological Research.*, v. 32, p. 529-538.

Nandini CD, Itoh N, Sugahara K. 2005. Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogenous injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 28116–28121 factors. *J. Biol. Chem.* 280, 4058–4069.

Nandini CD, Mikami T, Ohta M, Itoh N, Akiyama-Nambu F, Sugahara K. 2004. Structural and functional characterization of oversulfated chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from the notochord of hagfish. *J. Biol. Chem.* 279, 50799–50809.

Nandini CD, Sugahara K. 2006. Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv. Pharmacol.* 53, 253–279.

Oliveira GB, Vale AM, Santos AC, Moura, CEB, Rocha, HAO, Oliveira MF. 2015. Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. *Braz. arch. biol. technol.* vol.58 no.4 Curitiba July/Aug. Epub May 01.

Oohira A, Matsui F, Watanabe E, Kushima Y, Maeda N. 1994. Developmentally regulated expression of a brain speci@c Opin *Struct Biol* 13:612-620.

Pavão MS, Mourão PA, Mulloy B, Tollefsen DM. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem.* 270: 31027–31036.

Pavão MSG, Aiello KR, Werneck CC, Silva LC, Valente A-P, Mulloy B, Colwell NS, Tollefsen DM, Mourão PAS, 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **J Biol Chem.** 273: 27848–27857.

Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M and Gallo R L. 1998. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 28116-28121.

Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JR, Passeroti CC, Amado D, Matas SL, Nader HB, *et al.* 2002. Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res. Bull.* 58 (5), 509-516.

Pevny LH, Nicolis SK. 2009. Sox2 roles in neural stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 421-424.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, and Maffei L. 2002. "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex," *Science*, vol. 298, no. 5596, pp. 1248– 1251.

Poli D, Pastore VP and Massobrio P. 2015. Functional connectivity in *in vitro* neuronal assemblies. *Front. Neural Circuits* 9, 57.

Pomin VH. 2015. Sulfated glycans in inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 353-369.

Prinz RD, Willis CM, van Kuppevelt TH, Kluppel M. 2014. Biphasic role of chondroitin sulfate in cardiac differentiation of embryonic stem cells through inhibition of Wnt/b-catenin signaling. *PLoS One*, 9:e92381.

Purushothaman GR, Marion K, Li VA, Casagrande. 2012. Gating and control of primary visual cortex by pulvinar *Nat. Neurosci.* 15: pp. 905-912.

Rani A, Baruah R, Goyal A. 2017. Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. *Carbohydr.Polym.* 159, 11–19.

Reichsman, F., Smith, L., and Cumberledge, S. 1996. Glycosaminoglycans Can Modulate Extracellular Localization of the wingless Protein and Promote Signal Transduction. *J. Cell Biol.* 135, 819–827

Rogers LC, Frykberg RG, Armstrong DG, Boulton AJ, Edmonds M, Van GH *et al.* 2011. The Charcot foot in diabetes. *J Am Podiatr Med Assoc.* Sep-Oct;101(5):437-46.

Rowlands G, Khazaezadeh N, Oteng-Ntim E, Seed P, Barr S, Weiss BD. 2013. Development and validation of a measure of health literacy in the UK: the newest vital sign. *BMC Public Health.* N.13, p.116.

Saha N, Kolev M, Nikolov DB. 2014. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neurosci Res*, 87:1-7.

Sahu S, Li R, Loers G, Schachner M. 2019. Knockdown of chondroitin-4-sulfotransferase-1, but not of dermatan-4-sulfotransferase-1, accelerates regeneration of zebrafish after spinal cord injury. *FASEB J.* 33, 2252–2262.

Sakai S, Kim WS, Lee IS, Kim YS, Nakamura A, Toida T, *et al.* 2003. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. *Carbohydr Res.* 338: 263–269.

Sant, S, Hancock, M J, Donnelly, J P, Iyer, D, Khademhosseini, A, 2010. *Can. J. Chem. Eng.*, 88, 899.

Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG. 2009. PTPs is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science*, 326:592-596.

Shen Y. 2014. Traffic lights for axon growth: proteoglycans and their neuronal receptors. *Neural Regen Res* 2014, 9:356-3561.

Sobel RA. 2001. The extracellular matrix in multiple sclerosis: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 603-609.

Soleman S, Filippov MA, Dityatev A, Fawcett JW. 2013. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience*. Dec 3; 253:194-213.

Sugahara K, Mikami T, 2007. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol.* 17:536–545.

Sugahara K. 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), 612–620.

Thelin M A, Bartolini B, Axelsson J, Gustafsson R, Tykesson E, Pera E, Oldberg A, Maccarana M, and Malmstrom A, 2013. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J.* May; 280(10): 2431–2446.

Thomson D, Moss C, Venkatasamy R, Panagos CG, Robinson J, Bavington CD, Hogwood J, Mulloy B, Uhrín D, Spina D, Page CP. 2016. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two novel polysaccharides from the sea squirt,

ascadellia aspersa, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.; Vol. 40, October, Pages 69-79.

Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, Scott G, Solomon T, Innes J, 2009. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *Journal of Infection* 59, 167e187.

Tovar AMF, de Mattos DA, Stelling MP, Sarcinelli-Luz BSL, Nazareth RA, Mourão PAS, 2005. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. **Biochim Biophys Acta**. 1740: 45–53.

Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RL. 2002. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.* 277, 42815–42820.

Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, Preuss JMH, Page CP. 1999. Heparin in Inflammation: Potential Therapeutic Applications beyond Anticoagulation. *Adv. Pharmacol.*, 46, 151–208.

Ueoka, C., Nadanaka, S., Seno, N., Khoo, K. H., and Sugahara, K. 1999. *Glycoconj. J.* 16, 291–305.

Valcarcel J, Ramón NC, Ricardo PM, Rui LR, José AV. 2017. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. *Biotechnology Advances*. Nov 1;35(6):711-725.

Venkatachalam KV. 2003. "Human 3-phosphoadenosine 5 -phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency," *IUBMB Life*, vol. 55, no. 1, pp. 1–11.

Verna JM, Fichard A, Saxod R. 1989. Influence of glycosamino-glycans on neurite morphology and outgrowth patterns *in vitro*. *Int. J. Dev. Neurosci* 7, 389±399.

Vilela-Silva AC, Werneck CC, Valente AP, Vacquier VD, Mourão PA. 2001. Embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* synthesize a dermatan sulfate enriched in 4-O- and 6-O-disulfated galactosamine units. *Glycobiology*. 11: 433–440.

Vo T, Carulli D, Ehlert EM, Kwok JC, Dick G, Mecollari V, Moloney EB, Neufeld G, de Winter F, Fawcett JW, Verhaagen J. 2013. The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 56:186-200.

Volpi N, Maccari F. 2009. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequalvis*. *Glycobiology*. 19: 356–367.

Volpi N. 2010. Dermatan sulfate: Recent structural and activity data. *Carbohydrate Polymers* 82, 233-239.

Von Holst A, Sirko S, Faissner A. 2006. The unique 473HD Chondroitin sulfate epitope is expressed by radial glia and involved in neural precursor cell proliferation. *J Neurosci*, 26: 4082-4094.

Walicke PA. 1988. Interactions between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Experimental Neurology*, 102(1), 144–148.

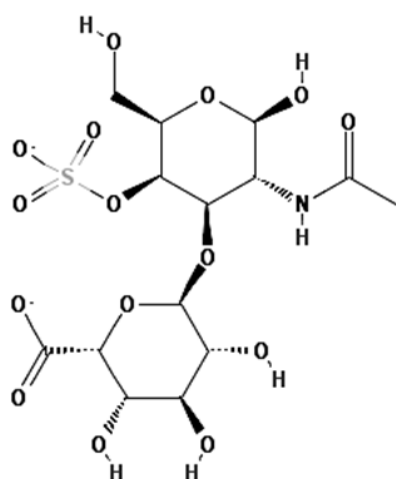
Xu and J D Esko, 2014. “Demystifying heparan sulfate-protein interactions,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 83, pp. 129– 157.

Yamada S, Sugahara K, and Ozbek S. 2011. Evolution of glycosaminoglycans – comparative biochemical study. *Commun. Integr. Biol.* 4:150–158.

Yamada S. 2015. Catabolism of chondroitin sulfate. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 20(2).

Yamada S., Sugahara K. 2008. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr. Drug Discov. Technol.* Dec;5(4):289-301.

Dermatan Sulfate



[$-4\text{IdoUA}\alpha 1-3\text{GalNAc}\beta 1-$]

SYMBOL	SEQUENCE
iO unit	IdoUA-GalNAc
iA unit	IdoUA-GalNAc(4S)
iC unit	IdoUA-GalNAc(6S)
iB unit	IdoUA(2S)-GalNAc(4S)
iD unit	IdoUA(2S)-GalNAc(6S)
iE unit	IdoUA-GalNAc(4S,6S)

Figure 1: Typical repeating disaccharide units in DS, and their potential sulfation sites. DS consists of IdoA and GalNAc. These sugar moieties are esterified by sulfate at various positions as indicated by 'S'. 2S, 4S, and 6S represent 2-O-sulfate, 4-O-sulfate, and 6-O-sulfate, respectively. Abbreviations of possible disaccharide units are shown in the panel. The corresponding DS disaccharide units are indicated by 'i', which represents IdoA. Specific sequences composed of these units provide structural diversity, thereby affecting a wide range of interactions with various functional proteins. Chemical structures were taken from the PubChem Substance and Compound database (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). The unique chemical structure identifiers are: 32756 (Dermatan, 4-(hydrogen sulfate)-Depositor: Chembase).

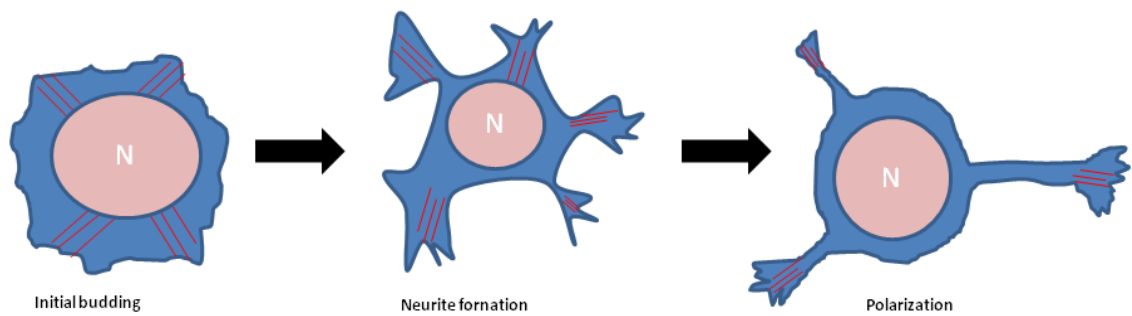


Figure 2: Schematic representation of the succession of steps that lead from the formation of a cell to a neurite. Dendritic actin filament network (blue) and radial filopodia containing bundled actin filaments (red). N = nucleus.

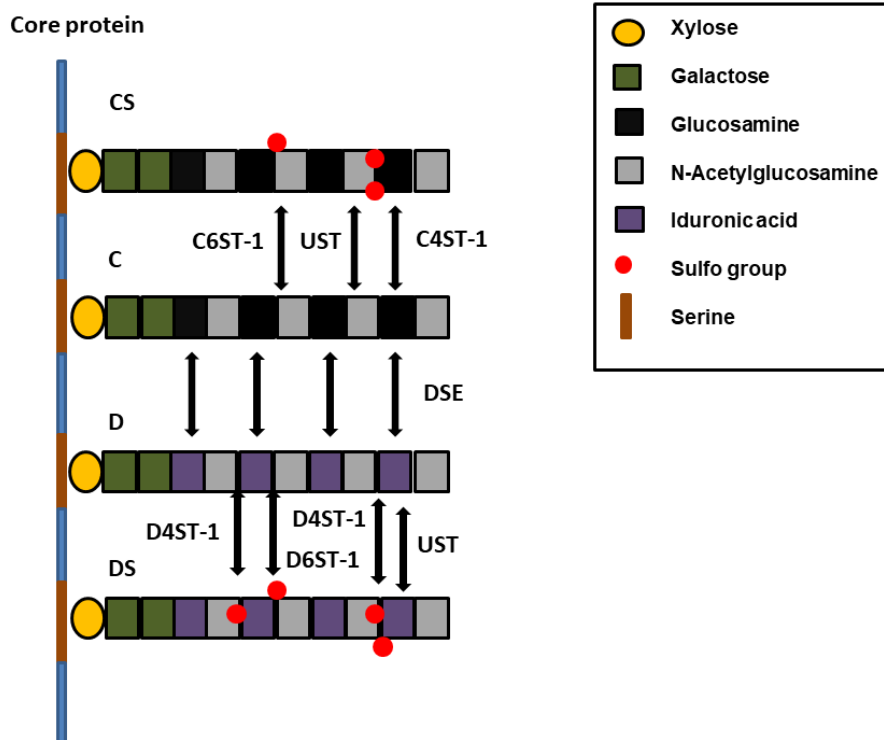


Figure 3: Biosynthesis of DS. CS and DS share the synthesis of a tetrasaccharide linker region that attaches the GAG chains to a serine residue within the conserved

attachment site of core proteins. The activity of a unique N-acetylgalactosaminyltransferase-I that transfers the first GalNAc residue onto the tetrasaccharide linker starts a growing glycosaminoglycan chain to CS. This step is followed by the activities of specific enzymes that polymerize the glycosaminoglycan chain by the alternate additions of N-acetyl-D-galactosamine and D-glucuronic acid moieties in CS. CS chains can be modified during elongation by Golgi residents, epimerase and a number of sulfotransferases. After the formation of the chondroitin backbone, epimerization of GlcUA to L-iduronic acid by C5-hydroxyl epimerases (DSE) followed by sulfate addition to the C4 hydroxy of the adjacent GalNAc residue by D4ST1 generates DS from CS, and prevents back-epimerization of IdoUA to GlcUA. The extent of modification with sulfate groups by the actions of CS and DS sulfotransferases varies between different core proteins, and spatio-temporally.

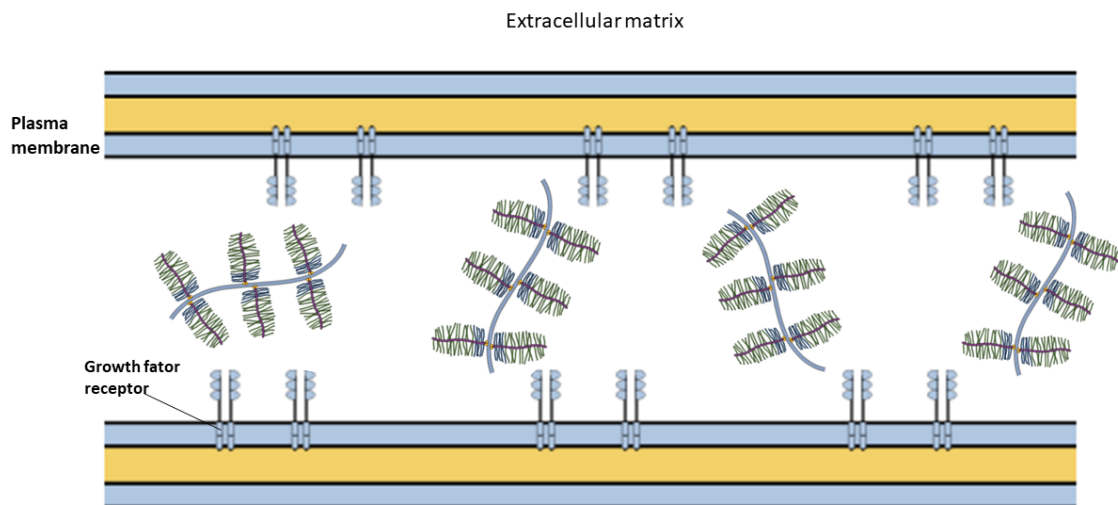


Figure 4: Schematic structure of ECM in the brain. The ECM of the brain is mainly composed of GAG, which store various proteins such as chemokines, growth factors and axon guidance molecules. Cell surface proteoglycans may function as receptors or co-receptors for growth factors.

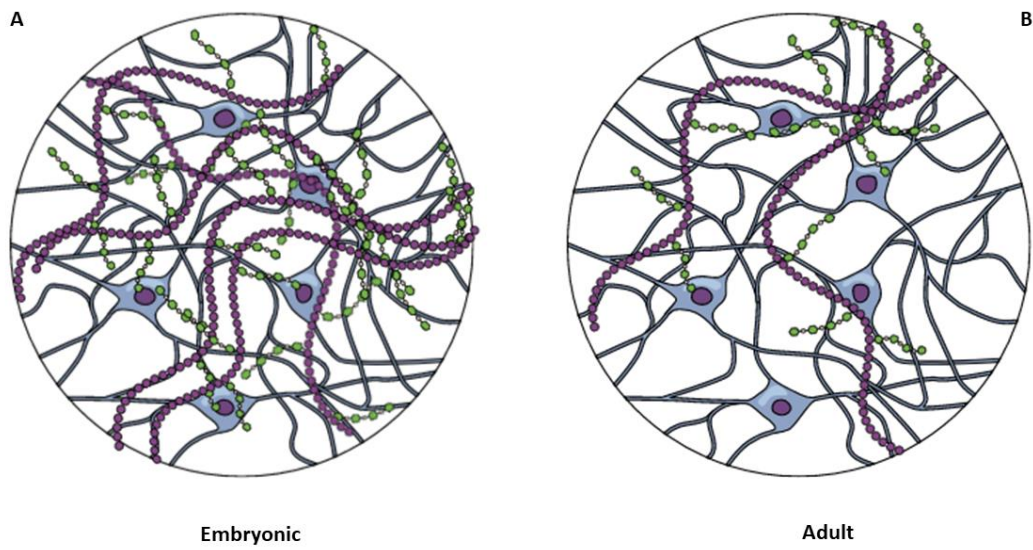


Figure 5: Structure of ECM in the brain: (a) Embryonic; (b) Adult. DS levels are particularly high in the ECM of the CNS, which includes the brain. In the embryonic ECM, DS is present in relatively large amounts and decreases as development progresses.

TYPE OF GAG CHAINS	TIMING	REGION	NEURONAL CELL BODY	KNOCKOUT PHENOTYPE	REF.
iD units	E16 mouse hippocampal neurons	Ascidian <i>P. nigra</i>	Soma	neurite growth	Hikino <i>et al.</i> , 2003
iD units	embryonic mouse hippocampal neurons	embryonic pig brains	Soma	binding growth factor pleiotrophin	Bao <i>et al.</i> , 2005
iD units	E16 mouse hippocampal neurons	shark skin	Soma	neuritogenic activity	Nandini <i>et al.</i> , 2005
iD units	E14 rat mesencephalic neurons and E18 rat hippocampal neurons	postnatal mouse brain	Soma	neurite growth	Faissner <i>et al.</i> , 1994
iD units	E14 rat post-mitotic mesencephalic neurons	Bovine mucosa	Soma	neurite growth	Lafont <i>et al.</i> , 1992
iE units	E16 mouse hippocampal neurons	Embryonic sea urchin	Soma	neurite growth	Hikino <i>et al.</i> , 2003
iB units	E16 mouse hippocampal neurons	Ascidian <i>S. plicata</i>	Soma	neurite growth	Hikino <i>et al.</i> , 2003
iB units	E16 mouse hippocampal neurons	porcine skin	Soma	neurite growth	Hikino <i>et al.</i> , 2003
iE units	E16 mouse hippocampal neurons	Hagfish notochord	Soma	neurite growth	Hikino <i>et al.</i> , 2003

CS-DS	E16 mice hippocampal neurons	Shark <i>Isurus oxyrinchus</i> and <i>Prionace glauca</i>	Soma	neurite growth and Midkine and pleiotrophin interact strongly	Higashi <i>et al.</i> , 2015
CS-DS	E18 rat hippocampal neurons	Hagfish notochord	Soma	neurite growth	Nandini <i>et al.</i> , 2004
DS	Chst14-deficient mice	-	Axon	axonal growth	Akyüz <i>et al.</i> , 2013
DS	Chst14-deficient zebrafish	-	Axon	axonal growth	Sahu <i>et al.</i> , 2019

Table 1: Dermatan sulfate proteoglycans in the brain.