



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SABRINA SIMPLÍCIO DE ARAÚJO ROMERO FERRARI

**EXPRESSÃO DA REDE REGULATÓRIA DE MIR-7, MIR-671, CYRANO (OIP5-
1AS) E CDR1AS EM MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO
DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR MPP+**

Brasília - DF

2025

SABRINA SIMPLÍCIO DE ARAÚJO ROMERO FERRARI

EXPRESSÃO DA REDE REGULATÓRIA DE MIR-7, MIR-671, CYRANO (OIP5-1AS) E CDR1AS EM MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR MPP+

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Brasília – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Fisiopatologia Médica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida

Co-orientadora: Pesquisadora Sênior Dra. Simoneide Souza Titze de Almeida

Brasília – DF

2025

SABRINA SIMPLÍCIO DE ARAÚJO ROMERO FERRARI

EXPRESSÃO DA REDE REGULATÓRIA DE MIR-7, MIR-671, CYRANO (OIP5-1AS) E CDR1AS EM MODELO *IN VITRO* DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR MPP+

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Brasília – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em 05 de dezembro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida (presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Raphael Severino Bonadio (membro titular)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fernando Francisco Borges Resende (membro titular)
Uniceplac - Centro Universitário Central Aparecido dos Santos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, a quem devo cada inspiração e a própria essência do meu ser. Sem Ele, eu nada seria.

À minha família. Em especial, aos meus amados pais, Elsaby e Cibele, por serem a bússola que me guiou e por, com paciência e sabedoria, ensinaram-me o maior e mais complexo ensinamento da vida: o amor.

Meus sinceros agradecimentos aos meus orientadores, Ricardo e Simoneide, e às queridas Fran e Mary-Ann. A concretização deste sonho acadêmico é reflexo da dedicação, da expertise e do apoio de todos vocês. Meu sucesso também é de vocês.

Aos meus amigos, presentes em cada riso e em cada desafio, minha eterna gratidão por cultivarem laços que resistem à distância e ao tempo.

Por fim, um reconhecimento às fundações de fomento – FAPDF, CAPES e CNPq – cujo investimento financeiro foi importante para a viabilidade e o sucesso desta pesquisa.

"São precisamente as perguntas para as quais não há resposta que marcam os limites das possibilidades humanas e que traçam as fronteiras de nossa existência."

(Milan Kundera)

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo crônico que afeta o movimento, e pode prejudicar também a cognição. É caracterizada patologicamente pela perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e pela formação de Corpos de Lewy, resultantes da agregação de α -sinucleína. RNAs regulatórios, incluindo RNAs longos não codantes (lncRNAs), RNAs circulares (circRNAs) e microRNAs (miRNAs), estão funcionalmente relacionados e envolvidos na fisiopatologia da DP. Cyrano, também conhecido como OIP5-AS1, é um lncRNA que participa do desenvolvimento embrionário, agindo em processos como proliferação, apoptose e mitose, com possível envolvimento em doenças neurológicas, inflamatórias e câncer. Uma das suas funções moleculares importantes é a capacidade de interagir com miR-7, podendo promover sua degradação, por meio de um sítio de ligação complementar. O RNA circular CDR1as (Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA) é um dos mais bem caracterizados circRNAs, altamente expresso no cérebro de mamíferos, com mais de 70 sítios de ligação para miR-7, atuando como uma esponja desse microRNA. Outro microRNA relevante para a patogênese de várias doenças, incluindo a DP, é o microRNA miR-671. Esse microRNA regula negativamente o gene CDR1as via AGO2, portanto faz parte da rede regulatória de miR-7, juntamente com CDR1as e Cyrano. O presente estudo teve como objetivo investigar a expressão de Cyrano, CDR1as, miR-7 e miR-671 no modelo *in vitro* de neurodegeneração dopaminérgica induzida por MPP⁺, utilizando células SH-SY5Y. A exposição de células SH-SY5Y ao MPP⁺ por 24 horas causou redução dose-dependente da viabilidade celular para 87,30%, 81,20%, 58,7%, 34,2%, e 15% nas respectivas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM. Também foi observado aumento significativo no estresse oxidativo nas concentrações de MPP⁺ de 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM, juntamente com alterações morfológicas típicas de apoptose, como condensação e fragmentação nuclear. A contagem de núcleos apoptóticos revelou que a apoptose foi dose-dependente ($p < 0,05$). Finalmente, a análise de expressão por RT-qPCR mostrou uma desregulação significativa da rede regulatória nos grupos expostos ao MPP⁺. Houve aumento de 104% (2,04-fold) na expressão de CDR1as ($p = 0,0083$) e redução de 56,1% (0,439-fold) e 38,7% (0,613-fold) na expressão de miR-671 e miR-7, respectivamente ($p = 0,0026$ e $p = 0,0078$). Por outro lado, Cyrano não apresentou diferença estatisticamente significativa de expressão gênica. Ensaio de transfecção com imitadores de miR-7 e miR-671 em células submetidas a MPP⁺ não alteraram a viabilidade celular nas condições experimentais testadas. Em conclusão, as mudanças de expressão gênica em três ncRNAs, CDR1as, miR-7 e

miR-671, durante a injúria de células dopaminérgicas, fundamentam a necessidade de novos ensaios com sistemas de expressão otimizados e modelos mais robustos da DP. Perspectivas futuras incluem a validação funcional desta rede *in vivo* e em modelos de toxicidade por alfa-sinucleína, visando elucidar o papel desta via na neuropatologia da doença de Parkinson.

Palavras-chave: miR-7, miR-671, Cyrano, CDR1as, Doença de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder that affects movement and may also impair cognition. It is pathologically characterized by the loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal network and by the formation of Lewy Bodies, resulting from alpha-synuclein aggregation. Regulatory RNAs, including long non-coding RNAs (lncRNAs), circular RNAs (circRNAs), and microRNAs (miRNAs), are functionally related and involved in the pathophysiology of PD. Cyrano is an lncRNA (also known as OIP5-AS1) that participates in embryonic development, acting in processes such as proliferation, apoptosis, and mitosis, and may be involved in neurological diseases, inflammatory disorders, and cancer; one of its important molecular functions is the ability to interact with miR-7, potentially promoting its degradation due to a complementary binding site. The circular RNA CDR1as (Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA) is one of the most well-characterized circRNAs, highly expressed in the mammalian brain, with over 70 binding sites for miR-7, acting as a miR-7 "reservoir." Another relevant microRNA is miR-671, which contributes to the pathogenesis of several diseases, including PD; this microRNA negatively regulates the CDR1as gene via AGO2, therefore making it part of the miR-7 regulatory network, along with CDR1as and Cyrano. The present study aimed to investigate the expression of Cyrano, CDR1as, miR-7, and miR-671 in an *in vitro* model of MPP⁺-induced dopaminergic neurodegeneration, using SH-SY5Y cells. Exposure of SH-SY5Y cells to MPP⁺ for 24 hours caused a dose-dependent reduction in cell viability of 87.30%, 81.20%, 58.7%, 34.2%, and 15% at the respective concentrations of 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, and 4 mM; a significant increase in oxidative stress was also observed at MPP⁺ concentrations of 0.5 mM, 1.0 mM, and 2.0 mM, along with morphological changes typical of apoptosis, such as nuclear condensation and fragmentation. The apoptotic nuclei count revealed that apoptosis was dose-dependent ($p < 0.05$). Finally, RT-qPCR expression analysis showed a significant dysregulation of the regulatory network in the MPP⁺-exposed groups: there was a 104% (2.04-fold) increase in CDR1as expression ($p = 0.0083$) and a 56,1% (0,439-fold) and 38,7% (0,613-fold) reduction in miR-671 and miR-7 expression, respectively ($p = 0.0026$ and $p = 0.0078$); conversely, Cyrano did not show a statistically significant difference in gene expression. However, the supplementation of miR-7 and miR-671 (mimics) in MPP⁺-treated cells did not alter cell viability under the experimental conditions tested. In conclusion, the changes in the expression of three ncRNAs—CDR1as, miR-7, and miR-671—during dopaminergic cell injury support the need for further assays with optimized expression systems and more robust PD models. Future

perspectives include the functional validation of this network *in vivo* and in alpha-synuclein toxicity models to elucidate the role of this pathway in Parkinson's disease neuropathology.

Keywords: miR-7, miR-671, Cyrano, CDR1as, Parkinson's Disease.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Via de agregação, toxicidade e propagação da α -sinucleína no cérebro de pacientes com Parkinson.	17
Figura 2 – Perda de neurônios dopaminérgicos pigmentados na substância negra (SN) na doença de Parkinson.	18
Figura 3 – Biogênese e função biológica dos microRNAs.	20
Figura 4 – Biogênese e função biológica de lncRNAs.	22
Figura 5 – Biogênese e função biológica de circRNAs.	24
Figura 6 – Viabilidade celular por atividade mitocondrial em células SH-SY5Y expostas ao MPP+ pelo método de MTT.	36
Figura 7 – Análise de Estresse Oxidativo (ROS) pelo método de DCFH-DA em células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	37
Figura 8 – Detecção e quantificação da apoptose em células SH-SY5Y por coloração com Hoechst 33342.	38
Figura 9 – Expressão relativa de miR-7 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	39
Figura 10 – Expressão relativa de miR-671 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	40
Figura 11 – Expressão relativa de Cyrano em células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	41
Figura 12 – Expressão relativa de CDR1as em células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	42
Figura 13 – Viabilidade celular após suplementação com imitadores de miR-671 e miR7 em células SH-SY5Y.	43
Tabela 1 – Resumo da biogênese, função biológica e interação entre miR-7, miR-671, Cyrano e CDR1as.	25
Tabela 2 – Sequências nucleotídicas dos alvos utilizados nos ensaios de expressão de miR-7 e miR-671.	33
Tabela 3 – Sequências nucleotídicas dos alvos utilizados nos ensaios de expressão de Cyrano e CDR1as.	34
Tabela 4 – Sequência dos miRNAs maduros dos imitadores de miR-7 e miR-671.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
3'-UTR	Região não traduzida três linha
7-NI	7-nitroindazola (um inibidor seletivo de nNOS)
AGO2	Argonauta 2
ANOVA	Análise de Variância
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
cDNA	DNA complementar
CDR1as	Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA
circRNA	RNA circular
CLs	Corpos de Lewy
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ct/Cq	Ciclo de quantificação
DA	Dopamina
DAT	Transportadores de dopamina
DCF	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DMEM/F12	Meio Dulbecco's Modified Medium + F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DP	Doença de Parkinson
EPM	Erro Padrão da Média
EXP5-Ran-GTP	Exportina 5-Ran Trifosfato de Guanosina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gene de referência)
GPB1	Proteína G beta 1 (gene de referência)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID	Identificação
IFN-gama	Interferon gama
LB	Lewy Bodies
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster (um inibidor de NO sintases)
lncRNA	RNA longo não-codante
MDS	Movement Disorder Society

miR-	MicroRNA
miR-126	microRNA-126
miR-671	microRNA-671
miR-7	microRNA-7
miRNA	MicroRNA
mM	Milimolar
MPP+	1-metil-4-fenilpiridínio, um metabólito do MPTP
MPTP	Toxina ambiental 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MREs	Elementos de respostas de miRNA
MREs	Elementos de respostas de miRNA
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
ncRNA	RNA não codante
ng/uL	Nanogramas por microlitro
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase
OIP5-1AS	Cyrano
p	Valor p (probabilidade estatística)
PBS	Solução Salina Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pré-miRNA	Pré-microRNA
pri-miRNA	Transcrito primário de microRNA
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RBP	RNA-binding proteins
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNase L	Ribonuclease L
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR quantitativa	Transcrição reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa
SFB	Soro Fetal Bovino
SH-SY5Y	Linhagem celular de célula de neuroblastoma humano
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência
SK-N-SH	Linhagem celular SK-N-SH (linhagem parental das células SH-SY5Y)

SN	Substância Negra
SNC	Sistema Nervoso Central
TH	Tirosina Hidroxilase
VDAC1	Canal de Ânion Dependente de Voltagem 1
α -sinucleína	Alfa-sinucleína
α -Syn	Alfa-sinucleína
Δ Ct/Delta Ct	Diferença entre Ct do gene-alvo e Ct do gene de referência
$\Delta\Delta$ Cq	Ciclo de quantificação da expressão relativa de genes na qPCR
$\Delta\Delta$ Ct/Delta Delta Ct	Diferença entre Δ Ct experimental e Δ Ct controle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Histórico e Prevalência da Doença de Parkinson (DP)	15
1.2	Etiologia e Fisiopatologia da DP	16
1.3	MicroRNAs: conceito, biogênese e função biológica	19
1.3.1	O Papel de miR-7 na Regulação da α -sinucleína na DP	20
1.3.2	Relação de miR-671 na DP	21
1.4	RNA Longo Não Codante: Cyrano (OIP5-1AS)	21
1.5	RNA Circular: CDR1as	23
1.6	Modelo <i>In Vitro</i> para Estudo da DP	25
1.7	Justificativa	26
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Cultivo Celular	28
3.2	Injúria com MPP+	28
3.3	Viabilidade Celular pelo Método de MTT	28
3.4	Ensaio de Estresse Oxidativo por DCFH-DA	29
3.5	Contracoloração Nuclear para Microscopia de Fluorescência e Contagem de Núcleos Apoptóticos (Hoechst 33342)	30
3.6	Análise da Expressão Gênica em Células SH-SY5Y	31
3.6.1	Extração e Quantificação	31
3.6.2	RT-qPCR de MicroRNAs (miR-7 e miR-671)	32
3.6.3	RT-qPCR de RNAs Circular e Longo Não Codante (CDR1as e Cyrano)	33

3.7	Transfecção Celular com Imitadores Sintéticos de microRNAs (Mimics)	34
3.8	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Análise do Efeito do MPP+ na Viabilidade Celular	36
4.2	Estresse Oxidativo (ROS) pelo Método de DCFH-DA em Células SH-SY5Y	37
4.3	Morfologia Nuclear e Contagem de Alterações Apoptóticas das Células SH-SY5Y (Hoechst 33342)	38
4.4	Expressão Gênica da Rede Regulatória de miR-7 em Células SH-SY5Y Expostas ao MPP+	39
4.5	Transfecção com miR-7 e miR-671 mimic	42
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO	47
7	CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Prevalência da Doença de Parkinson (DP)

A Doença de Parkinson (DP) foi inicialmente descrita por James Parkinson em 1817 como "paralisia agitante", caracterizada por tremor de repouso assimétrico, postura fletida, marcha festinante e dificuldades como disartria, disfagia e salivação, além de constipação, porém, com cognição preservada. Posteriormente, Jean-Martin Charcot e Armand Trousseau aprofundaram a descrição, destacando a presença de rigidez muscular e progressão do declínio cognitivo com o avanço da doença, além da bradicinesia como o principal sintoma motor incapacitante (1,2). Um estudo realizado por Hoehn e Yahr em 1967 adicionou novas contribuições para caracterização da doença, classificando a síndrome em forma primária (DP idiopática) e formas secundárias, que foi definida como uma síndrome cujos sintomas são causados por um agente etiológico conhecido ou fazem parte de uma doença mais abrangente, que afeta sistemas além daqueles tipicamente atingidos pela DP "clássica", diferenciando-a de parkinsonismos atípicos (3). Ainda na década de 1960, estudos mostraram que os Corpos de Lewy (CLs) podiam estar presentes em cérebros de idosos sem sintomas evidentes, sugerindo uma fase prodrômica (não motora) da doença (4). Essa observação levou à compreensão de que os sinais clássicos de parkinsonismo só se manifestam após ocorrer uma perda neuronal substancial na substância negra e uma depleção severa de dopamina no estriado (5). Mesmo 200 anos após ser descrita, a DP ainda tem causa desconhecida e diagnóstico principalmente baseado em sinais clínicos, com confirmação post-mortem (6). Dada a tendência de envelhecimento global, estudos sobre doenças neurodegenerativas devem estar em pauta priorizando o fomento de pesquisas tanto focados na fisiopatologia quanto nos impactos sociais e econômicos.

O contexto demográfico vem mostrando um aumento da taxa populacional idosa no mundo, e as doenças crônicas acompanham esse crescimento, sendo as principais causas de morbidade e comprometimento cognitivo em idosos (7). Segundo o Censo de 2022 do Brasil, nos últimos 12 anos, houve um aumento de 15,6% de pessoas com 60 anos ou mais, correspondendo a 56% da população (8). A DP apresenta uma incidência anual de 8 a 18 diagnósticos a cada 100.000 indivíduos acima de 65 anos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no Brasil (7). Em nível global, cerca de 1-2% da população é acometida por esse distúrbio neurodegenerativo (9). Além disso, foi identificado que a

mediana da idade para a DP é de 60 anos, acometendo mais o gênero masculino, e possui uma sobrevida média de 15 anos após o diagnóstico (7). A sintomatologia da DP inclui a tríade clássica de sintomas motores, bradicinesia, rigidez e tremor, além de fenótipos não-motores, como distúrbios do sono, psiquiátricos e autonômicos (10–13).

1.2 Etiologia e Fisiopatologia da DP

A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, o que desencadeia a sintomatologia motora, além de perdas em outros sistemas de neurotransmissão e áreas cerebrais, bem como prejuízos em tecidos periféricos (14). Embora fatores como mutações genéticas e neurotoxinas ambientais sejam citados, o envelhecimento é o principal fator de risco, com início médio aos 60 anos e aumento significativo de incidência após os 70, com etiologia indefinida na maioria dos casos (6,14). Além de sua base fisiopatológica, a DP possui variações transculturais na prevalência, sendo mais alta na Europa e nas Américas em comparação com a África e Ásia (6).

As células dopaminérgicas são responsáveis pela produção da dopamina, que é um neurotransmissor envolvido no controle motor na região cerebral do estriado e que também participa de funções cognitivas, emoções através do sistema límbico, bem como do sistema de recompensa (15,16). Vários mecanismos patogênicos estão envolvidos com a degeneração de neurônios dopaminérgicos, porém o mais relevante está associado com a α -sinucleinopatia. As células nervosas passam a formar agregados da proteína α -sinucleína (α -Syn), originando-se os chamados ‘corpos de Lewy’ (CL ou *Lewy Bodies*, LB), que causam toxicidade e morte celular programada (Figura 1). É importante destacar que quando o indivíduo apresenta os sinais motores, já houve a perda de mais de 50% das células dopaminérgicas da via nigroestriatal (15,17–19).

O estadiamento da DP é baseado em abordagens patológicas e clínicas (20). O estadiamento de Braak é amplamente reconhecido como uma descrição neuropatológica da progressão topográfica previsível da sinucleinopatia ao longo do Sistema Nervoso Central (SNC) (Figura 1), que incluem um espectro de sintomas como hiposmia, disfunção autonômica (hipotensão ortostática, constipação, disfunções urinárias e eréteis), transtornos do sono (insônia, sonolência diurna excessiva), problemas psiquiátricos (depressão e ansiedade) e

cognitivos (comprometimento cognitivo leve e demência), além de alterações motoras típicas da doença, que tendem a progredir com o avanço da neurodegeneração cerebral (13,20,21).

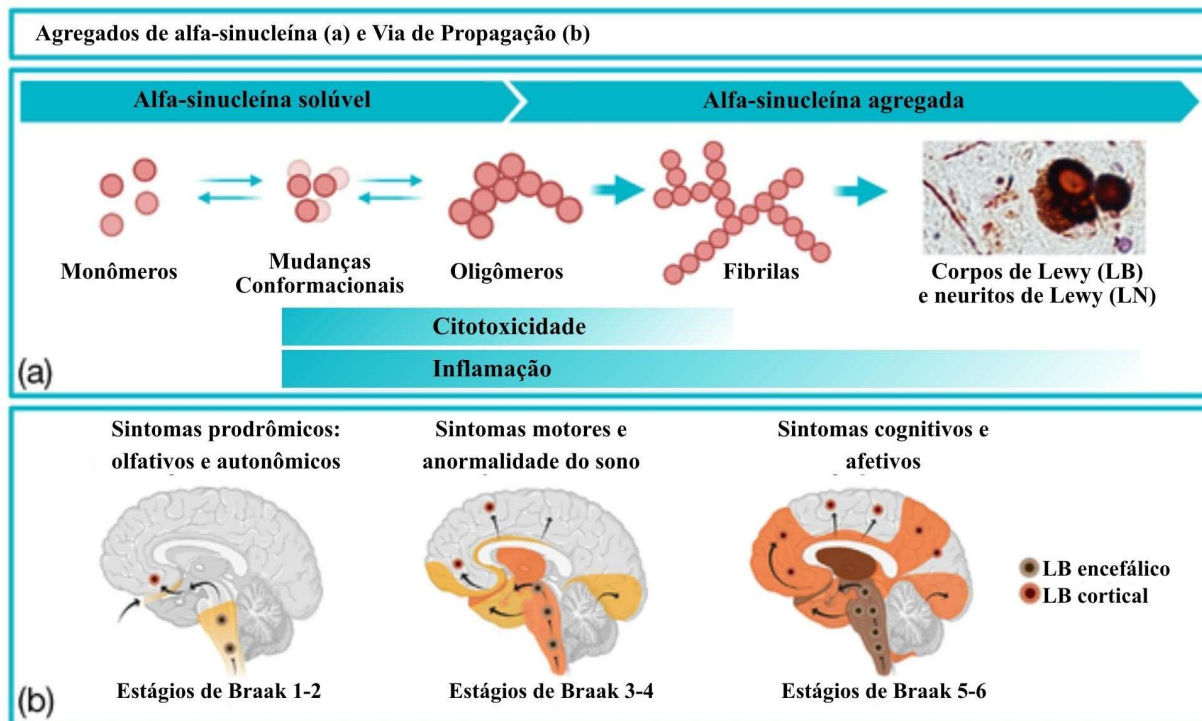


Figura 1 - Via de agregação, toxicidade e propagação da α -sinucleína no cérebro de pacientes com Parkinson. As formas oligoméricas pré-fibrilares (a) da α -sinucleína são altamente neurotóxicas e podem se propagar entre as células, disseminando a patologia por áreas interconectadas do cérebro. A progressão patológica, inicia-se no tronco encefálico inferior e avança em direção ao córtex cerebral (b), o que está associado aos estágios mais avançados da doença. Adaptado de Aniszewska *et al.* (2022) (22).

O parkinsonismo é um termo abrangente que define uma síndrome motora. Esta síndrome é caracterizada pela presença de duas ou mais das seguintes manifestações: bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. O parkinsonismo engloba tanto a DP idiopática quanto formas secundárias e outros distúrbios degenerativos. Tais condições estão frequentemente relacionadas à disfunção da via nigroestriatal, que pode ser desencadeada por alterações químicas, estruturais ou processos degenerativos (23). Devido ao fato de outras doenças apresentarem sinais e sintomas similares à DP, os diagnósticos diferenciais são amplamente estudados e aprimorados para a precisão clínica (23,24). O diagnóstico para a DP é feito a partir do histórico clínico do paciente, com base nos critérios da *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS), podendo ser associados a exames neurológicos complementares, como a cintilografia cerebral, para avaliação da atividade dopaminérgica por meio dos transportadores de dopamina (DAT) e a ultrassonografia

transcraniana da substância negra (25). O diagnóstico de certeza é, ainda hoje, reservado à avaliação histopatológica da presença de CL post-mortem (Figura 2) (24).

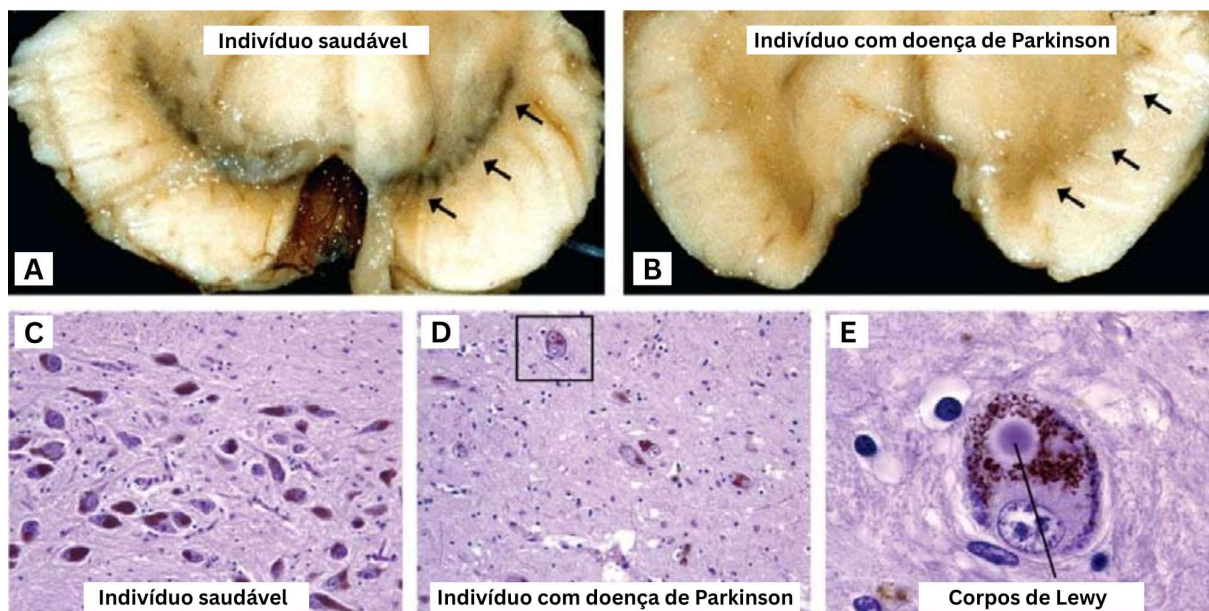


Figura 2 - Perda de neurônios dopaminérgicos pigmentados na substância negra (SN) na doença de Parkinson. O exame post-mortem do mesencéfalo de um paciente saudável (A) revela os típicos neurônios dopaminérgicos pigmentados na SN (setas). O cérebro de um paciente com DP (B) exibe a perda desses neurônios e o desaparecimento do pigmento (neuromelanina) na SN (setas). A ampliação da área (C) mostra uma densa rede de neurônios da SN pigmentados em um cérebro saudável, enquanto a maioria dos neurônios da SN é perdida na DP (D). Os neurônios remanescentes na DP (E), que representam uma ampliação da área em D, contêm agregados proteicos (corpos de Lewy) compostos por α -sinucleína agregada e outras proteínas. Os grânulos contendo melanina apresentam coloração marrom-avermelhada e estão distribuídos no citosol de todos os neurônios da SN (C-E). Adaptado de Agamanolis (2024) (26).

O tratamento da DP foca no alívio sintomático, buscando a reposição da dopamina no estriado ou estimulando seus receptores, no entanto, seu manejo clínico é complexo (6). Além da sintomatologia motora, sintomas não motores, como disfunção olfativa e autonômica, hipotensão ortostática, incontinência, constipação, dor, fadiga, distúrbios do sono e manifestações cognitivas e psiquiátricas, podem estar presentes desde as fases iniciais e progredir na maioria dos casos, impactando significativamente a qualidade de vida, sendo a demência observada em até 83% dos pacientes após 20 anos do diagnóstico (6,27).

Embora existam múltiplos fatores ligados à morte neuronal, os RNAs não codantes (ncRNA) destacam-se por representarem a vasta maioria (98%) do transcriptoma (28). Esses ncRNA são definidos pela ausência de tradução proteica, possuem participação em processos básicos como crescimento e diferenciação, e estão implicados na regulação epigenética e na manutenção da estabilidade genômica (29). Evidências demonstram que ncRNAs atuam

mediante mecanismos complexos, como RNA de interferência (RNAi), promovendo o silenciamento de genes transcritos, a metilação do DNA e o controle rigoroso de elementos transponíveis (*transposons*) no genoma (29,30). Essa capacidade regulatória se estende ao SNC, onde as classes de ncRNAs curtos, como miRNAs e siRNAs, e longos, como lncRNAs e circRNAs, são fundamentais para a manutenção das funções cerebrais e da proteção neuronal (29). Os ncRNAs possuem papel importante na neurodegeneração, uma vez que são capazes de modular vias patológicas na DP, abrangendo o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a agregação proteica (28). Dada a complexidade e o potencial regulatório desses elementos, os tópicos a seguir detalham a função e o mecanismo de ação das principais classes de ncRNAs, incluindo miRNAs, lncRNAs e circRNAs.

1.3 MicroRNAs: conceito, biogênese e função biológica

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes de cerca de 22 nucleotídeos que atuam como reguladores centrais da expressão gênica (31). A biogênese de miRNAs é canônica e envolve a ação sequencial de duas enzimas microprocessadoras: Drosha e Dicer. Primeiramente, um transcrito primário de miRNA (pri-miRNA), sintetizado pela RNA polimerase II, é clivado pela Drosha no núcleo, gerando um pré-miRNA. Este pré-miRNA é subsequentemente transportado para o citoplasma por um mecanismo dependente de EXP5-Ran-GTP. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela Dicer para produzir o miRNA maduro. Finalmente, o miRNA maduro é incorporado ao *RNA-induced silencing complex* (RISC), onde exerce sua função inibitória sobre a tradução do RNAm alvo (32,33). O mecanismo predominante de ação ocorre pela interação com a região 3'-UTR do RNA mensageiro (RNAm) alvo, resultando na supressão da tradução, embora também possam interagir com outras regiões do RNAm ou, ainda, interagir com outros RNAs não codantes e, em condições específicas, atuar na ativação gênica (34,35). Com aproximadamente 2.500 variantes em humanos e modulando cerca de 60% da expressão gênica, os miRNAs são essenciais para o desenvolvimento biológico, gerenciando a diferenciação e proliferação celular, a apoptose e a homeostase (36–39). Por fim, além de seu papel intracelular, os miRNAs são secretados em fluidos extracelulares e encapsulados em exossomos, onde funcionam como potenciais biomarcadores e moléculas de sinalização para a comunicação intercelular (40,41).

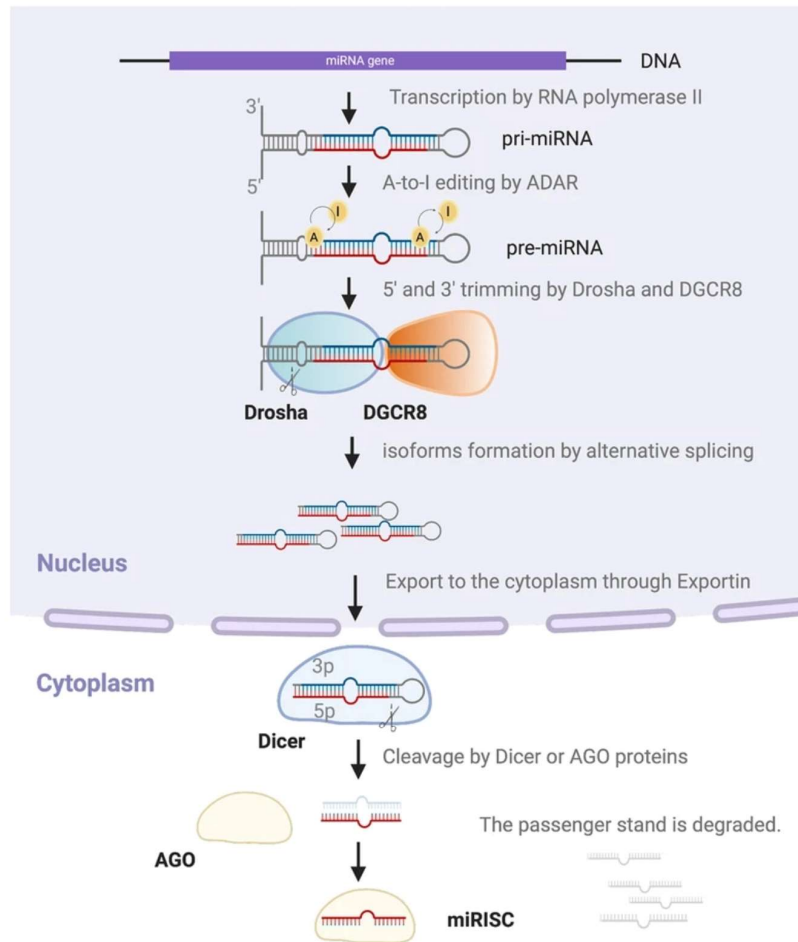


Figura 3 - Biogênese e função biológica dos microRNAs. Os miRNAs são moléculas de RNA não codificantes, transcritas como pri-miRNAs e pré-miRNAs com estrutura de hairpin (grampo) no núcleo. O complexo Drosha/DGCR8 processa os pri-miRNAs em pré-miRNAs, que são então exportados para o citosol pela Exportina-5. No citoplasma, a enzima Dicer cliva o pré-miRNA, gerando um miRNA maduro de fita dupla (cerca de 20–22 nucleotídeos). A fita simples madura é incorporada às proteínas Argonata para formar o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). A especificidade do alvo é determinada pela sequência-semente (seed sequence) do miRNA, que se liga a sequências complementares, tipicamente na região 3'-UTR do RNAm. O RISC atua como regulador, promovendo o silenciamento pós-transcricional da expressão gênica. Adaptado de Kuo *et al.* (2021) (42).

1.3.1 O Papel de miR-7-5p na Regulação da α -sinucleína na DP

O microRNA-7-5p (miR-7) foi identificado como regulador crucial da expressão da proteína α -sinucleína, que é central na patogênese da DP. Estudos demonstram que miR-7 reprime a expressão de α -sinucleína ao se ligar à região 3'-UTR do mRNA da α -sinucleína, reduzindo assim a tradução de proteínas e a consequente formação de agregados tóxicos de α -sinucleína (43–45). Além disso, miR-7 promove a degradação de α -sinucleína e de seus agregados, a partir da ativação da autofagia, um processo celular de limpeza essencial para a manutenção da homeostase neuronal (46). Este efeito protetor de miR-7 contra a neurodegeneração induzida por α -sinucleína foi demonstrado em modelos animais, onde a

superexpressão de miR-7 reduziu a propagação de fibrilas de α -sinucleína e a neuroinflamação (43). Além disso, o grupo de Mouradian *et al.* (2009) demonstrou que miR-7 também exerce efeitos protetores em modelos de disfunção mitocondrial, característica comum em várias doenças neurodegenerativas. Seu mecanismo envolve a regulação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, através da modulação da expressão do canal de ânion dependente de voltagem 1 (VDAC1), resultando na redução das espécies de oxigênio reativas e na proteção contra a citotoxicidade (47).

1.3.2 Relação de miR-671 na DP

O microRNA miR-671 é frequentemente reportado na literatura como um miRNA desregulado na DP, demonstrando relevância como potencial biomarcador (48). O miR-671 apresenta um padrão de expressão alterado tanto no cérebro quanto no sangue de pacientes com a doença (49). Especificamente, análises em plasma de pacientes com DP revelaram que os níveis do miR-671 se encontram reduzidos, o que o torna um alvo de investigação promissor nas redes regulatórias da fisiopatologia (50).

1.4 RNA longo não codante: Cyrano (OIP5-1AS)

Cyrano, também denominado de OIP5 antisense RNA 1 (OIP5-AS1) ou linc-OIP5, é um RNA longo não codante (lncRNA). RNAs longos são moléculas de RNA não codantes maiores que 200 nucleotídeos, transcritos de forma similar a RNAs mensageiros (RNAm) (51), recebem capeamento, poliadenilação e frequentemente sofrem ‘*splicing*’ (52). A origem dos lncRNAs é descrita por meio de quebras de transcrição de genes codificantes, recombinação cromossômica e transcrição de sequências repetidas de bases nitrogenadas (53). Além disso, os lncRNAs são classificados em senso, antisenso, bidirecional, intrônico e intergênico (54). No citoplasma, as funções de lncRNAs são diversas e se manifestam na regulação da expressão gênica, ocorrendo tanto em níveis pós-transcricionais — por meio da estabilização ou degradação de mRNAs — quanto na promoção e inibição da tradução. Além disso, eles atuam como precursores de miRNAs e como "esponjas"(54). No núcleo celular de eucariotos, os lncRNAs participam do controle epigenético de genes específicos, na regulação transcricional, além de ter participação em processos pós-transcricionais por *splicing* alternativo (54).

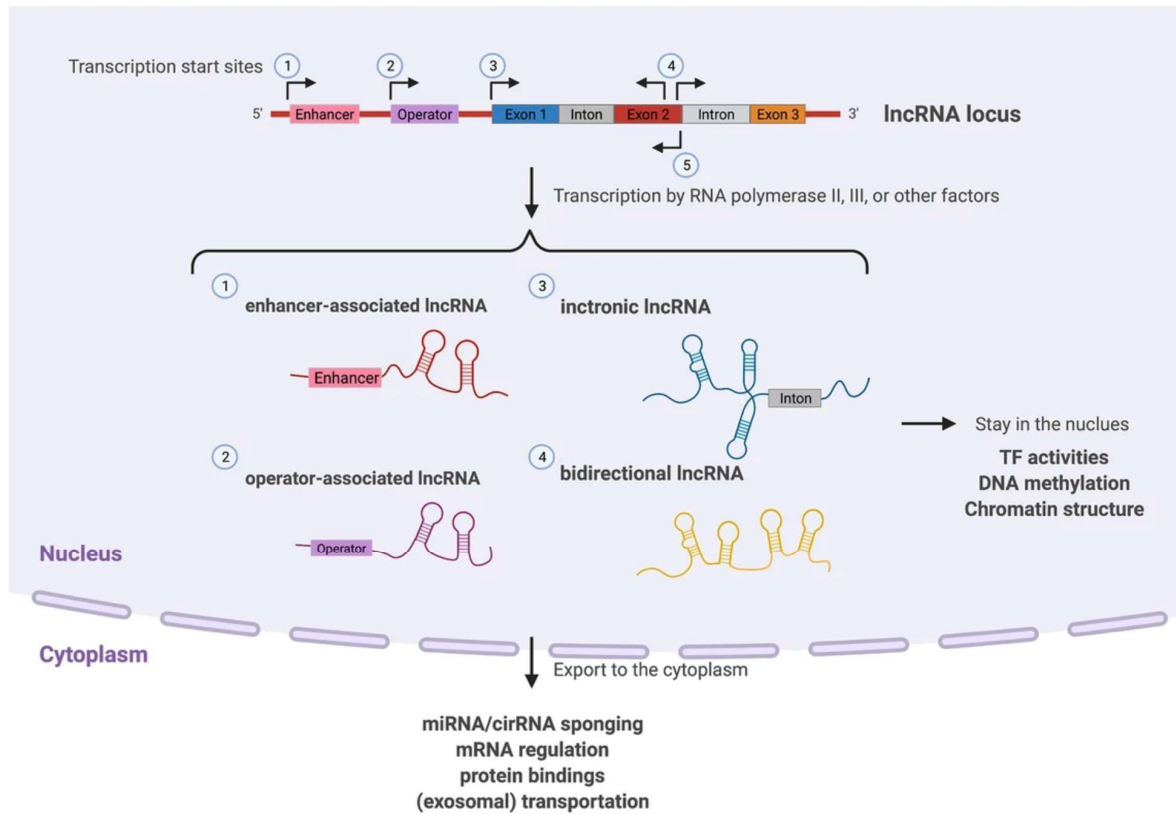


Figura 4 - Biogênese e função biológica de lncRNAs. Os lncRNAs são transcritos pela RNA Polimerase II (Pol II) e, estruturalmente, assemelham-se ao RNAm, possuindo uma cauda poliadenilada terminal 3', um cap 5' metil guanosina (5'mG), éxons e introns, além de diversos sítios de *splicing* alternativo. Os lncRNAs desempenham inúmeras funções biológicas na célula. No núcleo, os lncRNAs atuam como reguladores primários da expressão gênica, exercendo funções como fator de transcrição, metilação do DNA, modulação de modificadores de cromatina e formação da estrutura tridimensional da cromatina. Já no citoplasma, suas funções são predominantemente pós-transcricionais, incluindo o sequestro (*sponging*) de miRNAs e circRNAs, a regulação de RNAm, a interação com proteínas e o transporte via exossomos. Adaptado de Kuo *et al.* (2021) (42).

Estudos anteriores evidenciaram várias funções biológicas para Cyrano, incluindo a de esponjas, *scaffolds*, ativadores e inibidores de processos transcricionais e pós-transcricionais, conforme sua localização. Assim, Cyrano demonstra sua relevância ao participar de múltiplos processos biológicos, como a regulação do crescimento, proliferação e morte celular (mitose), além do desenvolvimento de tecidos e órgãos (51). Por outro lado, sua disfunção ou envolvimento também está associada a processos patológicos, abrangendo distúrbios neurológicos, cânceres e doenças inflamatórias (51). Cyrano possui interações intermoleculares já descritas no cérebro de camundongo, como seu forte potencial para interação com miR-7 (55,56). Sua estrutura molecular contém um sítio de ligação complementar e conservado para miR-7, podendo causar a degradação desse microRNA (57,58). Além disso, estudos recentes demonstram que a interação entre Cyrano e miR-126 afeta o controle da α -sinucleína, cuja desregulação está diretamente relacionada à patogênese da DP (59).

1.5 RNA circular: CDR1as

CDR1as (Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA), também conhecido como gene LINC00632, faz parte dos denominados circRNAs, RNAs não-codantes com estrutura circular em fita simples. Destaca-se que as extremidades da molécula precursora são covalentemente ligadas nas terminações 3' e 5' por ligação fosfodiéster, gerando, assim, um RNA com estrutura circularizada. CircRNAs foram descobertos em 1976 em vírus e, posteriormente, identificados em células humanas e genoma mitocondrial de leveduras (60,61). O principal mecanismo de formação dos circRNAs é referido como '*back-splicing*', possuindo três formas básicas de ciclização: *lariat-driven*, *intron-pairing-driven* e *RNA-binding-protein-driven*, que consiste na conformação por sequências de ribonucleotídeos derivados de íntrons, exons-íntrons e emparelhamento com sequências de exons distantes ligados covalentemente por proteínas de ligação ao RNA, respectivamente (62,63).

CircRNAs exercem diferentes papéis na biologia celular, atuando primariamente como reservatórios ou 'esponjas' de microRNAs, pois possuem em sua estrutura sequências para ligação de miRNAs, denominados de Elementos de Respostas de miRNA (MREs). As funções de circRNAs também incluem a promoção da degradação de RNAm, o que, por sua vez, pode reprimir a síntese de novas proteínas. Além disso, são esponjas de proteínas, através da ligação com as *RNA-binding proteins* (RBP), participando da regulação de expressão gênica, da tradução de proteínas via CAP-independente, da modulação de meia-vida de RBPs e, ainda, atuando como '*scaffolds*' moleculares (63). Os circRNAs também podem atuar como "armadilhas de RNAm", sequestrando o local de início de tradução ou quebrando a integridade de um transcrito de RNAm linear maduro, deixando o RNA não traduzido fragmentado. A degradação de circRNAs pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo globalmente degradado pela RNase L (63). Em especial para CDR1as, a clivagem é mediada por miR-671 dependente da proteína Argonata 2 (AGO2), potencializado pela interação com miR-7 (56). CDR1as é um dos mais bem caracterizados circRNAs, altamente expresso no cérebro de mamíferos, e que possui mais de 70 sítios de ligação para miR-7 (64). Evidências mostram papéis relevantes de circRNAs e miR-7 na patogênese de várias doenças, incluindo o câncer e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (43,65).

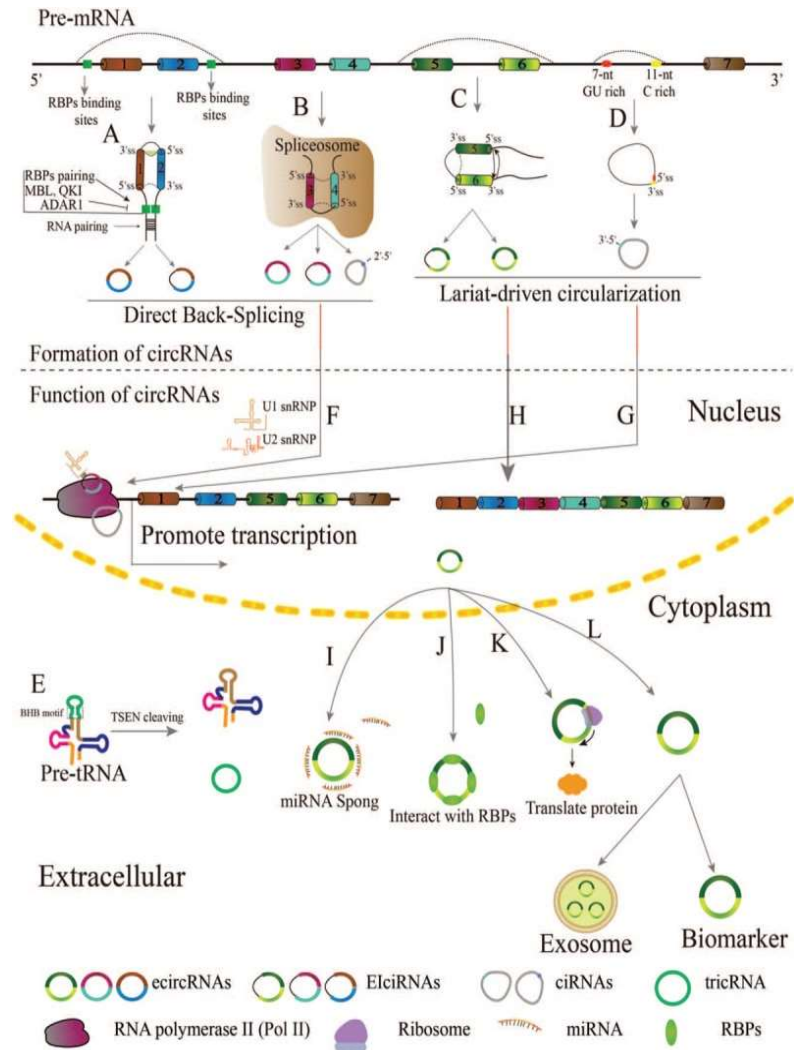


Figura 5 - Biogênese e função biológica de circRNAs. Os circRNAs são gerados primariamente por “back-splicing” (B), um processo catalisado pelo spliceossomo e impulsionado pelo pareamento de íntrons ou por proteínas de ligação ao RNA (RBPs) (A, C, D), que ocorre por três vias principais de ciclização: *lariat-driven*, *intron-pairing-driven* e *RNA-binding-protein-driven*. Outras vias incluem a exclusão de éxons (C) e o processamento de pré-tRNA pela enzima TSEN (E). Uma vez formados, os circRNAs exibem diversas funções regulatórias: (1) Regulação Transcricional, onde complexos de circRNA interagem com a RNA Polimerase II (F, G); (2) Regulação de *Splicing*, atuando no salto de éxons (*exon skipping*) (H); (3) Ação Esponja (ceRNA), ligando-se a miRNAs para regular a expressão de RNAm (I); (4) Interação Proteica, sequestrando RBPs para afetar suas funções (J); (5) Tradução em Proteína (K); e (6) Comunicação Intercelular, sendo empacotados em exossomos e transportados para outras células (L). Adaptado de Li *et al.* (2019) (65).

A Tabela 1 apresenta uma síntese dos principais aspectos relacionados a miR-7, miR-671, Cyran0 e CDR1as, incluindo seus processos de biogênese, descrição de suas funções biológicas e padrões de interação molecular entre estes ncRNAs.

Tabela 1 - Resumo da biogênese, função biológica e interação entre miR-7, miR-671, Cyrano e CDR1as.

RNA Não Codante	Biogênese	Função Biológica Principal	Interação Chave
miR-7	Biogênese canônica de miRNA: processado por Droscha (núcleo) e Dicer (citoplasma), incorporado ao RISC.	Regula a expressão gênica. Reprime α -sinucleína, reduzindo agregados tóxicos e promovendo autofagia. Protege contra disfunção mitocondrial.	Degradado por Cyrano. Potencializa a clivagem de CDR1as por miR-671. CDR1as atua como "esponja" de miR-7.
miR-671	Biogênese canônica de miRNA (similar ao miR-7).	Regula a expressão gênica, envolvido na morte de neurônios dopaminérgicos.	Cliva CDR1as (mecanismo dependente de AGO2), potencializado por miR-7. Aumenta com a redução de Cyrano.
Cyrano	Transcrito e processado como RNAm (capeamento, poliadenilação, <i>splicing</i>).	Regula expressão gênica pós-transcricional e epigenética. Atua como esponja, <i>scaffold</i> , ativador/inibidor. Envolvido em crescimento celular e patologias (neurodegenerativas, cânceres).	Degrada miR-7, aumentando CDR1as e diminuindo atividade neuronal. Redução de Cyrano aumenta miR-7 e miR-671, inibindo CDR1as.
CDR1as	Formado por "back- <i>splicing</i> " (ligação covalente das extremidades 3' e 5').	Atua como "esponja" de miRNAs (especialmente miR-7) e proteínas. Regula expressão gênica, tradução de proteínas. Envolvido em câncer e doenças neurodegenerativas.	Clivado por miR-671 (potencializado por miR-7). Possui múltiplos sítios de ligação para miR-7. Níveis aumentam com a degradação de miR-7 por Cyrano.

1.6 Modelo *In Vitro* Para Estudo da DP

Estudos sobre a neurobiologia de distúrbios degenerativos cerebrais utilizam células em cultura como aproximação aos neurônios cerebrais afetados pelas doenças (9). A linhagem celular SH-SY5Y teve origem da linhagem SK-N-SH, que, por sua vez, foi retirada durante uma biópsia da medula óssea de um paciente com neuroblastoma na década de 70 (66). Células SH-SY5Y são frequentemente utilizadas como modelo de neurônios dopaminérgicos, pois possuem a capacidade de sintetizar dopamina (DA), contém transportadores de DA e expressam a tirosina hidroxilase (TH), enzima envolvida na síntese do neurotransmissor dopamina, considerada um marcador dopaminérgico no sistema nervoso central (67). Destaque-se que essa linhagem celular possui dois fenótipos, flutuantes e aderentes, não havendo diferença na viabilidade de utilização de ambas; entretanto, a maioria dos estudos utilizam as aderentes e

descartam as flutuantes (68). Além disso, as células SH-SY5Y possuem dois tipos de morfologia, derivados de células de neuroblastomas ou de células epiteliais. O primeiro tipo (neuroblasto) apresenta características catecolaminérgicas, sendo positivo TH — enzima que catalisa a hidroxilação da tirosina em L-DOPA, que é posteriormente convertida em dopamina — e para a dopamina- β -hidroxilase. Em contraste, o segundo tipo (epitelial) não possui tais atividades. (68,69).

Quanto à toxina escolhida para induzir a neurodegeneração de células SH-SY5Y, optou-se por MPP⁺ (*1-methyl-4-phenylpyridinium*), um metabólito da toxina ambiental MPTP (*1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) utilizada em modelos animais de Parkinson já validados (roedores e primatas) (70,71). No organismo animal, o MPTP é convertido em MPP⁺, uma toxina que inibe o Complexo I mitocondrial. Ainda, MPP⁺ causa estresse oxidativo com aumento dos níveis de ROS, neuroinflamação, gliose e, finalmente, morte celular dopaminérgica (72). Quanto aos efeitos em cultivos celulares *in vitro*, MPP⁺ desencadeia apoptose de células SH-SY5Y, que pode ser atenuada pelo inibidor seletivo de nNOS, 7-NI, em células com alta expressão da enzima NO-sintase neuronal (nNOS) (73). Ademais, estudo anterior de nosso grupo mostrou que interferon gama (IFN-gama) sensibiliza as células SH-SY5Y à lesão induzida por MPP⁺, ocasionando também um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode ser prevenido pela inibição de enzimas NO sintases com L-NAME ou 7-NI (74).

1.7 Justificativa

A justificativa para a seleção dos quatro ncRNAs, o lncRNA Cyrano, o circRNA CDR1as e os miRNAs miR-7 e miR-671, baseia-se em sua relevância no eixo de regulação da proteína α -sinucleína. A participação do miR-7 na patogênese da DP é bem caracterizada, exercendo funções sobre diversos mecanismos celulares, como a regulação da α -sinucleína intracelular, neuroinflamação e função mitocondrial (55). Dada a toxicidade e a indução de morte celular programada associadas ao acúmulo aberrante dessa proteína nas células, entende-se que há relevância nos estudos focados no miR-7 e em fatores que regulam seu conteúdo. Kleaveland *et al.* (2018) descreveu uma rede composta por miR-7, miR-671, Cyrano e CDR1as (58). Essa rede correlaciona esses quatro RNAs de forma que: (i) Cyrano é altamente complementar a miR-7, gerando degradação de miR-7; (ii) miR-671, potencializado por miR-

7, cliva CDR1as e; (iii) CDR1as é regulado por Cyrano. Em outras palavras, o lncRNA Cyrano apresenta potencial para degradar miR-7, o que aumenta os níveis de CDR1as e diminui a atividade neuronal. Contudo, quando o nível de Cyrano é reduzido, tanto miR-7 quanto miR-671 aumentam, levando à inibição conjunta de CDR1as e, conseqüentemente, ao aumento da atividade neuronal (75–77). Portanto, a pergunta biológica da presente pesquisa consistiu em avaliar se o modelo *in vitro* de DP, por células dopaminérgicas submetidas à injúria por MPP+, apresenta alterações na expressão da rede de ncRNAs estudada.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão da rede regulatória de RNAs não codantes que inclui miR-7, juntamente com miR-671, Cyrano e CDR1as, na degeneração de células dopaminérgicas SH-SY5Y induzida por MPP+.

2.2 Objetivos Específicos

- (a) Determinar a curva dose-resposta da neurotoxina MPP+ sobre a viabilidade de células SH-SY5Y, avaliando concentração que induz efeito significativo para demais ensaios do atual projeto;
- (b) Determinar estresse oxidativo, alterações morfológicas e apoptose de células SH-SY5Y expostas ao MPP+;
- (c) Determinar, por RT-qPCR, os níveis de expressão de miR-7, miR-671, Cyrano e CDR1as em células SH-SY5Y expostas ao MPP+;
- (d) Avaliar os efeitos da suplementação do conteúdo de miR-7 e miR-671 sobre a viabilidade de células SH-SY5Y expostas ao MPP+.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

A linhagem celular SH-SY5Y foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Células SH-SY5Y em cultura foram utilizadas como modelos de neurônios dopaminérgicos, sendo posteriormente submetidas à injúria por MPP⁺. A técnica de cultivo celular ocorreu pela suplementação e manutenção com o meio *Dulbecco's Modified Medium + F12* (DMEM/F12 Gibco™, Cat. N° 12400-024), sendo adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Cat. N° 12657-029), 1% de *Glutamax*[™]I (Gibco™, Cat. N° 35050-061) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (*Sigma-Aldrich*®, Cat. N° A5955), com incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.2 Injúria com MPP⁺

Para o plaqueamento, utilizou-se uma garrafa de 75 cm² com confluência de 90% para cada número experimental. O meio foi removido, sendo adicionado 1 mL de tripsina e incubado por 3 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionado 1mL de *DMEM/F12* para interromper a ação da tripsina. Em seguida, o conteúdo foi vertido para um falcon de 15 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS por pipetagem em *up/down*. A partir dessa solução com as células, foi adicionado, em um eppendorf de 0,6 mL, 30 µL da solução com células mais 90 µL de PBS e homogeneizado. Por fim, utilizou-se 10 µL dessa diluição para contagem na câmara de Neubauer e calculado para a densidade 2,5×10⁴ por poço.

Para determinar a concentração ideal de MPP⁺ (*Sigma-Aldrich*®, *St. Louis, MO, EUA*), foi realizado um ensaio de curva dose-resposta, avaliando-se as concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM, conforme previamente descrito na literatura. Inicialmente, foi preparado uma solução estoque de MPP⁺ a 50 mM em 300 µL de água *Milli-Q*. A partir desta solução, diluições seriadas foram realizadas em meio *DMEM/F12* para obter as concentrações finais empregadas nos ensaios funcionais subsequentes. A viabilidade celular foi então determinada por meio do ensaio colorimétrico de MTT a 595 nm.

3.3 Viabilidade Celular pelo Método de MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é uma técnica que mede a viabilidade celular de forma indireta. O método se baseia na capacidade de

células metabolicamente ativas de converter sais de tetrazólio, composto de coloração amarela, em formazan, que possui coloração de cor púrpura. Essa transformação ocorre pela ação de enzimas mitocondriais. A quantidade de formazan produzida é então medida pela absorbância, o que reflete o número de células viáveis (78).

Para o plaqueamento, utilizou-se uma garrafa de 75 cm² com confluência de 90% para cada número experimental. O meio foi removido, sendo adicionado 1 mL de tripsina e incubado por 3 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionado 1 mL de *DMEM/F12* para interromper a ação da tripsina. Em seguida, o conteúdo foi vertido para um falcon de 15 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS por pipetagem em *up/down*. A partir dessa solução com as células, foi adicionado, em um eppendorf de 0,6 mL, 30 µL da solução com células mais 90 µL de PBS e homogeneizado. Utilizou-se 10 µL dessa diluição para contagem na câmara de Neubauer e calculado para a densidade $2,5 \times 10^4$ por poço.

Para a realização dos ensaios de MTT, $2,5 \times 10^4$ células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, a partir de uma solução de estoque de 50 mM, as células foram tratadas com MPP⁺ nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM por um período de 24 horas para avaliar a resposta celular. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 150 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, possibilitando a formação dos cristais de formazan. Após a incubação, o meio foi cuidadosamente removido e os cristais de formazan foram solubilizados em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para a normalização dos resultados, 150 µL de DMSO foram adicionados a poços sem células, que serviram como controles. A absorbância foi determinada em um leitor de microplacas multimodal *Varioskan™ LUX (Thermo Scientific™, EUA)* a 595 nm. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, em relação ao grupo controle não tratado.

3.4 Ensaio de Estresse Oxidativo por DCFH-DA

A quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares foi realizada empregando-se o corante fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Após a internalização celular, o DCFH-DA é inicialmente convertido em um composto não

fluorescente que, na presença de peróxido, hidroxila e outras ROS, é subsequentemente oxidado para gerar o produto fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF).

Inicialmente, foi preparada uma solução de estoque de 20 nM de DCFH-DA (*Sigma-Aldrich*®, *St. Louis, MO, EUA*) em 1 mL de água destilada. Células SH-SY5Y foram semeadas em placa de 96 poços com a densidade de $2,5 \times 10^4$ por poço. Após 24h, realizou-se o tratamento com MPP+ conforme desenho experimental. Em seguida, prosseguiu-se com a incubação com meio sem soro fetal bovino (SFB), contendo 10 μ M de DCFH-DA, a 37 °C por 30 minutos e, então, lavadas com meio PBS três vezes. Após 10 minutos, foi adicionado a solução de trabalho para o grupo do peróxido (136 μ L de peróxido e 864 μ L de água destilada), aguardando os 20 minutos restantes. A fluorescência foi observada utilizando um leitor de microplacas multimodal *Varioskan™ LUX* (*Thermo Scientific™*, EUA), com absorvância de excitação a 485 nm e emissão a 538 nm. Após a leitura da absorvância, o meio foi removido e, então, adicionado 25 μ L de tripsina em cada poço da placa e incubado por 3 minutos na estufa. Por fim, prosseguiu-se com uma adição de 25 μ L de PBS em cada poço, posteriormente foram agrupados os conteúdos dos poços por grupos experimentais nos seus respectivos eppendorfs, homogeneizados e contados na câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram calibrados com o cálculo de absorvância ponderada, demonstrado na fórmula abaixo. Em seguida, foram convertidas em porcentagens dos valores de controle e analisados no programa *GraphPAD Prism 9*.

Fórmula de absorvância ponderada:

$$\text{Absorvância ponderada} = \frac{\% \text{ absorvância do grupo experimental} \times n^{\circ} \text{ de células do grupo controle}}{n^{\circ} \text{ de células do grupo experimental}}$$

3.5 Contracoloração Nuclear para Microscopia de Fluorescência e Contagem de Núcleos Apoptóticos (Hoechst 33342)

Inicialmente, foi realizada uma solução de estoque de Hoechst 33342 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) a 50 mg/mL. A solução estoque de Hoechst a 50 mg/mL pode ser armazenada entre 2 e 6 °C por até 6 meses ou a ≤ -20 °C por períodos mais longos. Células SH-SY5Y foram semeadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ por poço em placas de 24 poços e incubadas em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Os grupos incluíram as seguintes concentrações de MPP+: 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, bem como células sem tratamento (controle). Após 24h com

o MPP+, o meio de cultura foi removido e, então, adicionado 500 µL de PBS mais 5 µL de solução de Hoechst 33342 para cada poço, incubando por 10 minutos, protegidos da luz. Após a incubação, a solução de coloração foi removida e as células foram lavadas três vezes em PBS. Finalmente, procedeu-se à captura de imagens das células utilizando microscopia de fluorescência no equipamento *Evos Flouid* (Invitrogen). A apoptose celular, determinada pela coloração de Hoechst 33342, foi analisada pelo *ImageJ*.

3.6 Análise de Expressão Gênica em Células SH-SY5Y

Para o plaqueamento, foi utilizada 1 garrafa de 75 cm² com confluência de 90% para cada número experimental. O meio foi removido, sendo adicionado 1 mL de tripsina para cada garrafa e incubado por 3 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionado 1mL de *DMEM/F12* para interromper a ação da tripsina. Em seguida, o conteúdo foi vertido para um falcon de 15 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS por pipetagem em *up/down*. A partir dessa solução com as células, foi adicionado, em um eppendorf de 0,6 mL, 30 µL da solução com células mais 90 µL de PBS e homogeneizado. Utilizou-se 10 µL dessa diluição para contagem na câmara de Neubauer e calculado para a densidade $2,5 \times 10^5$ por poço em placa de 6 poços. Após 24h, as células foram tratadas com MPP+ na concentração de 1 mM e, para o grupo de células sem tratamento, houve apenas a substituição por um novo meio *DMEM/F12*.

A quantificação da expressão gênica de miR-7, miR-671, Cyrano e de CDR1as em linhagens de células SH-SY5Y foi realizada utilizando a técnica de RT-qPCR em tempo real (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real com Transcrição Reversa). As células foram cultivadas sob condições controladas e em seguida expostas a 1,0 mM de MPP+ no tempo de 24 horas. Um grupo controle, não submetido a qualquer tratamento, foi mantido em paralelo para fins comparativos. As células foram obtidas mediante centrifugação, conforme publicação anterior (79).

3.6.1 Extração e quantificação

O RNA total foi extraído e purificado a partir dos pellets de células SH-SY5Y utilizando o kit *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para Cyrano e CDR1as, e kit *mirVana miRNA Isolation* (Applied Biosystems) para os microRNAs miR-7 e miR-671, de acordo com

instruções dos fabricantes. Após extraídas, as amostras foram armazenadas a -80°C por pelo menos 24h até a quantificação.

A quantificação dos RNAs extraídos foi realizada por fluorometria, utilizando os kits *Qubit[®] microRNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)* para miRNAs e *Qubit[®] RNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)* para RNA total, conforme as recomendações dos fabricantes. A leitura foi realizada no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)*.

3.6.2 RT-qPCR de microRNAs (miR-7 e miR-671)

A expressão de microRNAs (miRNAs) foi avaliada por RT-qPCR, empregando kits e reagentes conforme instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription*, conforme instruções do fabricante. As reações foram preparadas com 0,075 μL de dNTP (100 mM), 0,5 μL de enzima Multiscribe RT (50 U/ μL), 0,75 μL de buffer 10x RT, 0,095 μL de inibidor de RNase (20 U/ μL) e 2,08 μL de água livre de RNase. Foram transferidos 3,5 μL da solução descrita acima para microtubos de 0,2 μL , aos quais foram adicionados 2,5 μL de miRNA (1,25 ng/ μL) e 1,5 μL do RT Primer (5x) de interesse. Após 5 minutos em gelo, as reações foram levadas ao termociclador (*MyCycler, Bio-Rad*) nos tempos e temperaturas a seguir: 30 minutos a 16°C , 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C . O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior uso no ensaio de qPCR.

A qPCR foi sucedida com o sistema *TaqMan Fast Advanced Master Mix* e iniciadores 20X *TaqMan MicroRNA Assay* específicos para cada miRNA, vide Tabela 2 abaixo. As misturas de reação foram preparadas de forma independente contendo 5 μL de *TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems*), 3,84 μL de água livre de nuclease e 0,5 μL do primer (20x) de interesse, correspondente ao primer utilizado na RT. A partir dessa solução, 9,34 μL foram dispensadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL, Applied Biosystems*), sendo adicionado 0,67 μL cDNA das amostras em seus respectivos poços, conforme desenho experimental, totalizando 10 μL por poço (com margem de erro de pipetagem). As placas foram seladas com adesivo filme (*MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems*), centrifugadas (*Mini Plate Spinner, Labnet*) e levadas ao termociclador (*QuantStudio 12K Flex Real Time PCR 35 System, Applied Biosystems*) com a ciclagem a seguir: 2 minutos a 50°C , 20 segundos a 95°C , seguidos de 40 ciclos de 2 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C .

Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica, e os ensaios incluíram RNAs de referência endógeno e exógeno para normalização, bem como um controle negativo (NTC) sem adição de cDNA. A análise dos dados foi realizada utilizando-se a média dos valores do ciclo de quantificação (Cq ou Ct) para cada amostra. A determinação da expressão gênica relativa foi calculada empregando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Inicialmente, os dados foram normalizados subtraindo o Ct do gene de referência do Ct do gene-alvo, resultando no valor de ΔCt . Em seguida, o ΔCt de cada grupo experimental foi comparado ao ΔCt do grupo controle negativo não tratado, gerando o $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, o valor de $\Delta\Delta Ct$ foi exponenciado na base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para calcular a expressão gênica relativa. Esse método considera a amplificação logarítmica do cDNA em cada ciclo de PCR e estabelece a relação inversa entre o valor de Ct e a quantidade inicial de RNA na amostra. Considerou-se apenas os dados com Ct < 30 (80).

Tabela 2 - Sequência nucleotídicas dos alvos utilizados nos ensaios de expressão de miR-7 e miR-671

Nome	ID	Sequência do miRNA maduro
miR-7	hsa-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
miR-671	hsa-miR-671	UUUGGUUUCUUCUUCUUCAGUGA
miR-21	hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
RNU24	hsa-rnu24	ATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGACATTTTAAACCACCAAGA
miR-39	cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

3.6.3 RT-qPCR de RNAs circulares e RNAs longos não codantes (CDR1as e Cyrano)

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o sistema de transcrição reversa SuperScript II First-Strand (*SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), de acordo com as orientações do fabricante. A partir de uma concentração inicial de 12,5 ng/ μ L de RNA total, foram utilizados 4 μ L de RNA mais 4 μ L de água livre de RNase, totalizando 8 μ L (6,25 ng/ μ L), 1 μ L de dNTPs e 1 μ L de *Random Hexamers* (50 ng/ μ L). Em seguida, a mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e, após a incubação, transferida para gelo por 1 minuto. Posteriormente, foi preparado o mix de reação, contendo 2 μ L de tampão 10X RT Buffer, 4 μ L de MgCl₂, 2 μ L de DTT e 1 μ L de RNaseOUT. A solução foi incubada a 25°C por 2 minutos antes da adição de 1 μ L da enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase*. No controle negativo, a enzima foi substituída por água livre de RNase. A reação de transcrição reversa foi incubada no termociclador nas seguintes condições: 42°C por 50 minutos, seguido

de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Ao final da incubação, o cDNA foi diretamente utilizado nas reações de qPCR.

Os produtos de amplificação foram detectados via intercalação do corante fluorescente *SYBR Green*. As reações de qPCR foram realizadas conforme protocolo a seguir: 10 µL de *Fast SYBR Green Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA*), 5,2 µL de água livre de RNase, 1,4 µL de primer forward e 1,4 µL de primer reverse específico para o gene alvo (Cyano, CDR1as, beta-actina, GAPDH e GPB1) e 2 µL de cDNA, com volume final de 20 µL por poço. A qPCR foi realizada em placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL, Applied Biosystems*) no equipamento *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, sob as condições de amplificação de 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. Cada reação foi realizada em triplicata técnica e um controle negativo (NTC - No Template Control) foi incluído, utilizando água livre de RNase no lugar do cDNA. As sequências dos *primers forward* e *reverse* para amplificação de Cyano, CDR1as e respectivos genes de referência (beta-actina, GPB1 e GAPDH) estão descritos na Tabela 3. Considerou-se como válidos apenas valores de Ct < 30 ciclos. A metodologia adotada para avaliar a expressão relativa foi a de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), descrita por Lyvak *et al.* (2001) (80).

Tabela 3 - Sequência de nucleotídeos utilizados nos ensaios de expressão de Cyano e CDR1as

Nome	ID	Forward	Reverse
Cyano	OIP5 antisense RNA 1	TGCGAAGATGGCGGAGTAAG	TAGTTCCTCTCCTCTGGCCG
CDR1as	Cerebellar degeneration-related protein 1	GTGTCTGCAATATCCAGGGTT	ACTGGAAGACTTGGAGCTTCTTG
Beta-actina	Actin beta	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
GPB1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1	TCACTTGAGGCAGAACACAGA	AGCACATGTTTCCATTTTCAC
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CTCCTGTTCGACAGTCAGCC	CCCAATACGACCAAATCCGTTG

3.7 Transfecção Celular com Imitadores Sintéticos de microRNAs (Mimics)

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em placas de 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ por poço. O procedimento de transfecção foi realizado 24 horas após o plaqueamento das células, assegurando uma confluência entre 30% e 70%, de acordo com as especificações do fabricante (*INTERFERin, Polyplus-transfection*). O *INTERFERin* é um

polímero catiônico em solução hidroalcoólica, desenvolvido para otimizar a transfecção de miRNAs. Sua principal vantagem é a alta eficiência alcançada mesmo com baixas concentrações de material genético, aliada à sua reduzida toxicidade celular.

Os oligonucleotídeos utilizados foram o api-miR-7-5p *mimic* e hsa-miR-671-5p (*mirVana™ miRNA Mimic, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), conforme a Figura 4. Para a formação do complexo de transfecção, os miRNAs *mimic* foram diluídos em 50 µL de meio *Opti-MEM* (*Gibco™*) para atingir a concentração final de 30 nM, de acordo com os protocolos de otimização previamente utilizados pelo grupo de pesquisa, sendo então misturados com 0,5 µL de *INTERFERin*. Após homogeneização em vórtex por 10 segundos, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para a completa formação dos complexos. O meio de cultura dos poços foi substituído por 100 µL de meio fresco pré-aquecido a 37°C. Por fim, 50 µL do complexo de transfecção foram adicionados aos poços dos grupos experimentais, enquanto os poços do grupo controle receberam 50 µL de *Opti-MEM*, com um volume final de 150 µL por poço.

Finalmente, 48 horas após a transfecção dos *mimics*, as células foram expostas ao MPP+ na concentração de 1mM. O impacto da neurotoxina foi avaliado após 24 horas de incubação, utilizando o ensaio de MTT para determinar a viabilidade celular. A absorbância foi determinada em um leitor de microplacas multimodal *Varioskan™ LUX* (*Thermo Scientific™, EUA*) a 595 nm. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Tabela 4 - Sequência dos miRNAs maduros dos imitadores de miR-7 e miR-671

Nome	ID	Sequência do miRNA maduro
miR-7	api-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
miR-671	hsa-miR-671-5p	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUGGAG

3.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística mediante o uso do programa *GraphPAD Prism 9*. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade. Para comparações entre múltiplos grupos, utilizou-se a Análise de Variância (*one-way ANOVA*), seguida do teste *post-hoc* de *Tukey*. Para testes paramétricos entre dois grupos experimentais com distribuição normal, utilizou-se o teste t de *Student*. Os dados paramétricos foram

expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do MPP+ na Viabilidade Celular

Inicialmente, verificou-se que a neurotoxina MPP+ foi capaz de reduzir a viabilidade de células SH-SY5Y, permitindo utilizar-se tal preparação como modelo de injúria de células dopaminérgicas. Assim, a exposição das células dopaminérgicas ao agente de injúria MPP+ causou redução significativa e dose-dependente de viabilidade celular, conforme apresentado na Figura 6. Os valores de viabilidade foram reduzidos para 87,30%, 81,20%, 58,7%, 34,2% e 15%, respectivamente, para as concentrações de MPP+ a 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM. Nesse sentido, optou-se pela concentração de 1mM de MPP+ para os ensaios seguintes de expressão gênica, por ter ocasionado uma redução de viabilidade próxima de 50%.

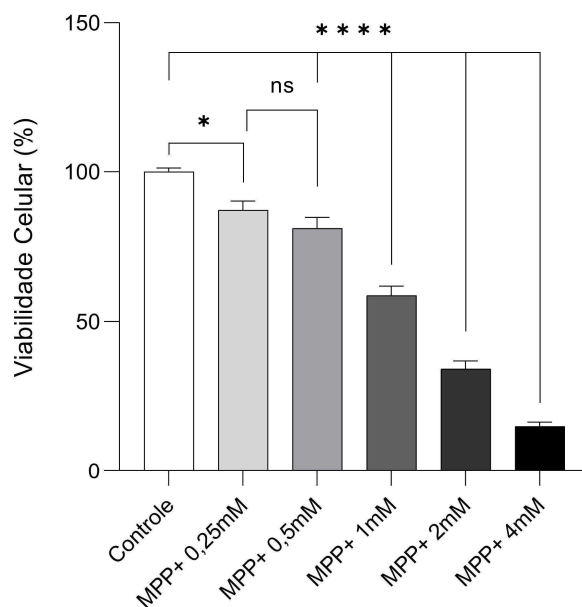


Figura 6. Viabilidade celular por atividade mitocondrial em células SH-SY5Y expostas ao MPP+ pelo método de MTT. O tratamento com a neurotoxina MPP+ causou redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, após 24 horas de exposição. A viabilidade do grupo controle foi atribuída arbitrariamente como 100%, com os seguintes resultados obtidos: 0,25 mM (87,30%), 0,5 mM (81,20%), 1,0 mM (58,7%), 2,0 mM (34,2%) e 4,0 mM (15%). As barras representam a média EPM (Erro Padrão da Média) dos resultados de MTT. A análise estatística foi realizada via *one-way ANOVA*, seguido de pós-teste de *Tukey*. Os níveis de significância estatística comparados ao grupo controle são indicados por asteriscos: * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

4.2 Estresse Oxidativo (ROS) pelo Método de DCFH-DA

A exposição à neurotoxina MPP⁺ desempenhou aumento na produção de ROS no modelo *in vitro* de neurônio dopaminérgico. O tratamento com MPP⁺ por 24 horas revelou um aumento significativo de estresse oxidativo nas células SH-SY5Y nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM em comparação com o grupo que não recebeu nenhum tratamento (controle), conforme mostra a Figura 7. Sabe-se que níveis baixos de ROS são necessários para a sinalização celular normal, entretanto, concentrações elevadas de ROS causam danos ao DNA, lipídios e proteínas, levando à morte celular, o que corrobora com o presente estudo.

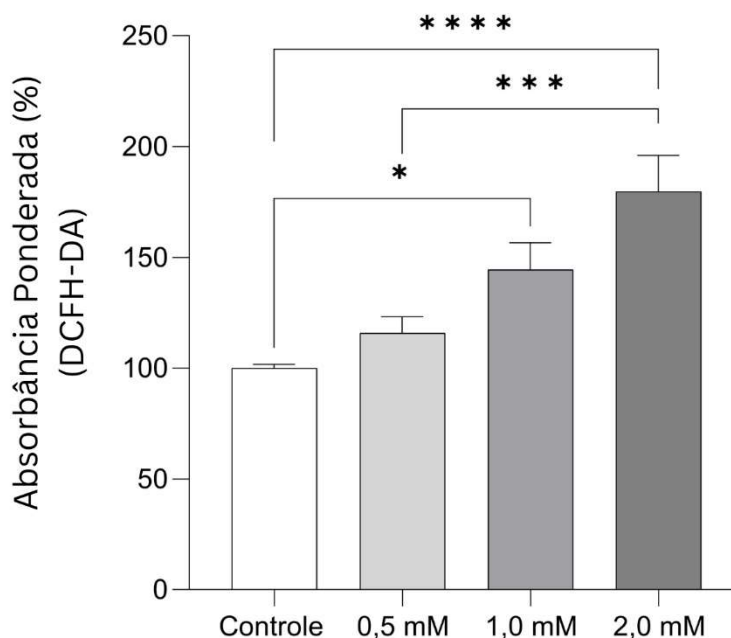


Figura 7. Análise de Estresse Oxidativo (ROS) pelo método de DCFH-DA em células SH-SY5Y expostas ao MPP⁺. A produção intracelular de ROS foi quantificada pelo ensaio DCFH-DA (-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato). O tratamento com MPP⁺ por 24 horas aumentou significativamente a produção de ROS em comparação ao controle (100%), com os seguintes valores obtidos: 0,5 mM (115,6%), 1,0 mM (135,2%) e 2,0 mM (179,7%). A análise estatística seguiu a verificação de normalidade pelo teste de D'Agostino-Pearson, com diferença significativa entre os grupos pelo teste *one-way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Os níveis de significância estatística comparados ao grupo controle são indicados por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3 Morfologia Nuclear e Contagem de Alterações Apoptóticas das Células

SH-SY5Y (Hoechst 33342)

A indução de estresse oxidativo pelo MPP⁺ demonstrou ser altamente citotóxico, o que é corroborado pelas análises morfológicas e quantitativas da morte celular. O tratamento de células SH-SY5Y com MPP⁺ nas concentrações de 1,0 mM e 2,0 mM induziu alterações morfológicas típicas de apoptose, visíveis por coloração com Hoechst 33342. Essas alterações incluíram condensação e fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos, retração citoplasmática e bolhas na membrana plasmática, conforme ilustrado na Figura 8 (b-c). Os dados apresentaram distribuição normal, conforme verificado pelo teste de *Shapiro-Wilk*. A análise da contagem de núcleos apoptóticos revelou um aumento dependente da concentração. Em média, 68,4% das células expostas a 1 mM apresentaram apoptose, enquanto essa porcentagem subiu para 87,5% em células tratadas com 2 mM em relação ao grupo controle, com significância estatística ($P < 0,01$) confirmada por *one-way ANOVA* ($p = 0,0015$). Esses achados confirmam que a exposição ao MPP⁺ induz mudanças morfológicas típicas associadas à apoptose de células SH-SY5Y.

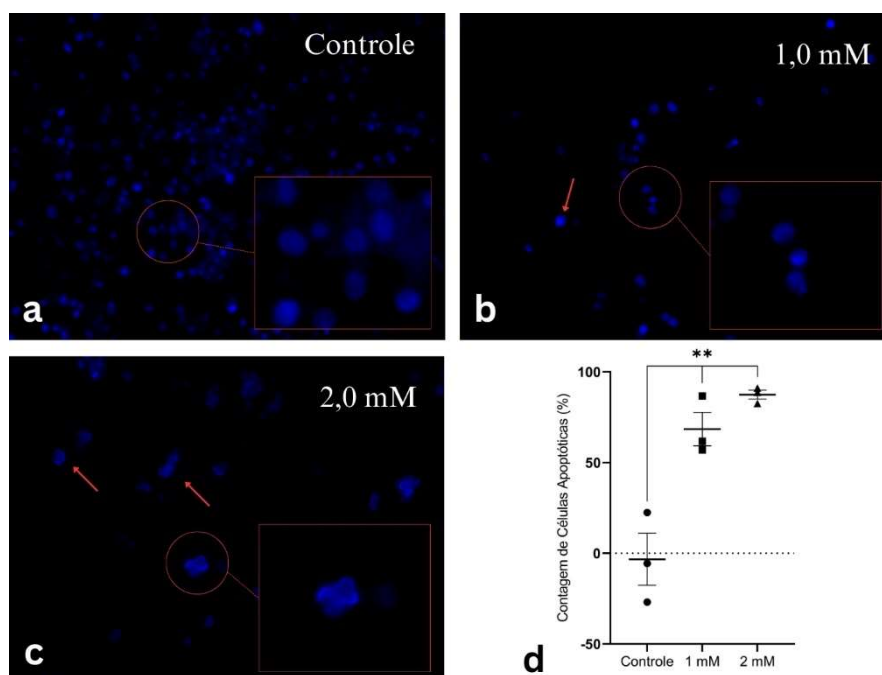


Figura 8 - Detecção e quantificação de apoptose em células SH-SY5Y por coloração com Hoechst 33342. A coloração com Hoechst 33342 foi utilizada após o tratamento com MPP⁺ por 24 horas nas concentrações de 1,0 mM e 2,0 mM para visualizar as alterações morfológicas de apoptose celular. (b-c) mostram alterações morfológicas de apoptose celular, como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos no comparado ao grupo controle: (a) Células controle (sem tratamento) e células tratadas com (b) 1,0 mM e (c) 2,0

mM de MPP+. (d) Gráfico da contagem de células apoptóticas (em porcentagem) nos grupos controle, 1,0 mM (68,4%) e 2,0 mM (87,5%). A análise estatística indicou distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e diferença significativa entre os grupos pela análise de variância *one-way ANOVA* ($p=0,0015$). O nível de significância estatística comparado ao grupo controle é indicado por asteriscos: ** $p<0,01$.

4.4 Expressão Gênica da Rede Regulatória de miR-7 em Células SH-SY5Y Expostas ao MPP+

Expressão gênica de miR-7 na injúria por MPP+

Na sequência da caracterização da neurotoxicidade, a expressão de miR-7 foi avaliada, visto seu papel na regulação da α -sinucleína e na proteção neuronal. Assim, a injúria por MPP+ causou mudança no conteúdo de miR-7, conforme revela o presente ensaio. A análise foi realizada por RT-qPCR nas células SH-SY5Y expostas ao MPP+, utilizando miR-21, RNU24 e miR-39 como genes de referência. Após a confirmação da distribuição normal dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk*, o teste t de *Student* foi aplicado, revelando que a redução de 38,7% (0,613-fold) de miR-7 foi estatisticamente significativa entre os grupos controle e MPP+ ($p=0,0078$), conforme apresentado na Figura 9.

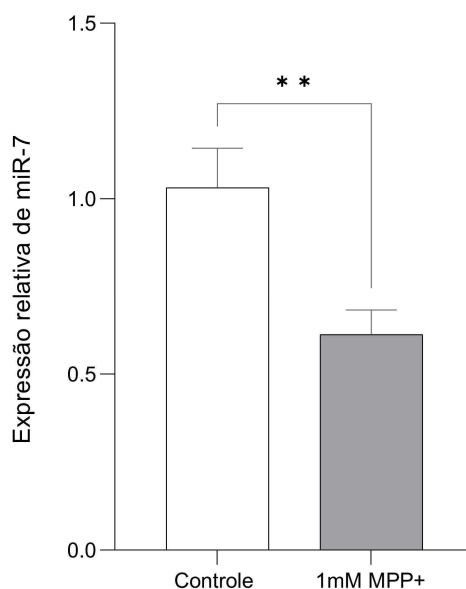


Figura 9. Expressão relativa de miR-7 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+. A expressão foi avaliada após tratamento com 1 mM de MPP+. Os dados foram normalizados utilizando os genes de referência miR-21, RNU24 e miR-39 ($n=7$). A normalidade da distribuição dos dados foi confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, permitindo a análise pelo teste t de *Student*, que demonstrou uma redução significativa na expressão gênica do miR-7 de 38,7% (0,613-fold) em comparação ao grupo controle ($p=0,0078$). O nível de significância estatística comparado ao grupo controle é indicado por asteriscos: ** $p<0,01$.

Expressão gênica de Cyrano na injúria por MPP+

Outro alvo de interesse foi o lncRNA Cyrano, considerado um componente relevante da rede regulatória de ncRNAs e hipoteticamente envolvido na modulação do miR-7 e, potencialmente, da α -sinucleína na DP. A análise da expressão relativa de Cyrano em células SH-SY5Y expostas ao MPP+ a 1 mM indicou um aumento de 1,1 vezes na expressão gênica no tempo de 24 horas, conforme representado na Figura 10. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,3573$).

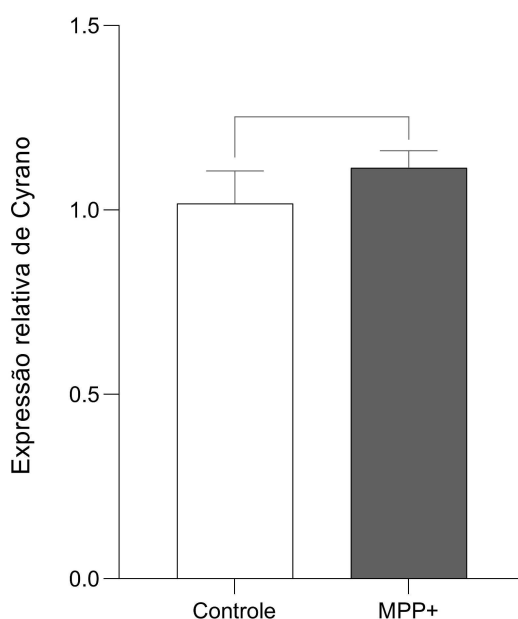


Figura 10. Expressão relativa de Cyrano em células SH-SY5Y expostas ao MPP+. A expressão do lncRNA Cyrano foi avaliada após tratamento com 1 mM de MPP+. A normalização dos dados foi realizada utilizando os genes de referência beta-actina, GPB1 e GAPDH. A normalidade da distribuição dos dados foi confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, seguida do teste t de *Student*. A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,3573$).

Expressão gênica de miR-671 na injúria por MPP+

Considerando o papel de miR-671 como principal modulador da degradação de CDR1as no eixo regulatório de interesse, sua expressão foi subsequentemente analisada. A normalidade da distribuição dos dados foi estabelecida preliminarmente pelo teste de *Shapiro-Wilk*, o que fundamentou a aplicação do teste t de *Student*. O microRNA miR-671 apresentou uma diminuição de 56,1% (0,439-fold) em células tratadas com MPP+ quando comparadas ao grupo sem tratamento, com diferença significativa com valor de $p=0,0026$ (Figura 11).

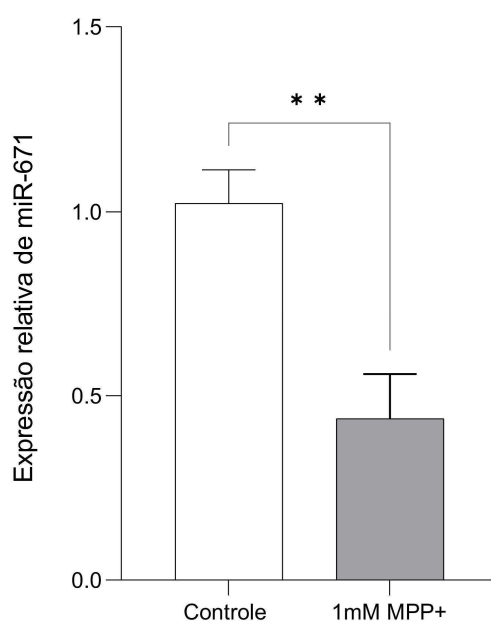


Figura 11. Expressão relativa de miR-671 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+. A expressão de miR-671 foi avaliada após tratamento com 1 mM de MPP+ (n=7). A normalização dos dados utilizou os genes de referência miR-21, RNU24 e miR-39. A normalidade da distribuição foi confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e a análise pelo teste t de *Student* demonstrou uma diminuição significativa na expressão gênica do miR-671 de 56,1% (0,439-fold) em relação ao grupo controle (p=0,0026). O nível de significância estatística comparado ao grupo controle é indicado por asteriscos: ** p<0,01.

Expressão gênica de CDR1as na injúria por MPP+

Finalmente, foi avaliado se a injúria por MPP+ nas células SH-SY5Y causaria alteração na expressão do circRNA CDR1as, que foi previamente identificado como esponja de miR-7 e descrito como altamente expresso no tecido cerebral. Os dados de expressão relativa, que seguiram o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram validados pelo teste t de *Student*, mostram que a exposição das células a 1 mM de MPP+ por 24 horas resultou em um aumento significativo de 104% (2,04-fold) no conteúdo de CDR1as em comparação com o grupo controle (p= 0,0083) (Figura 12).

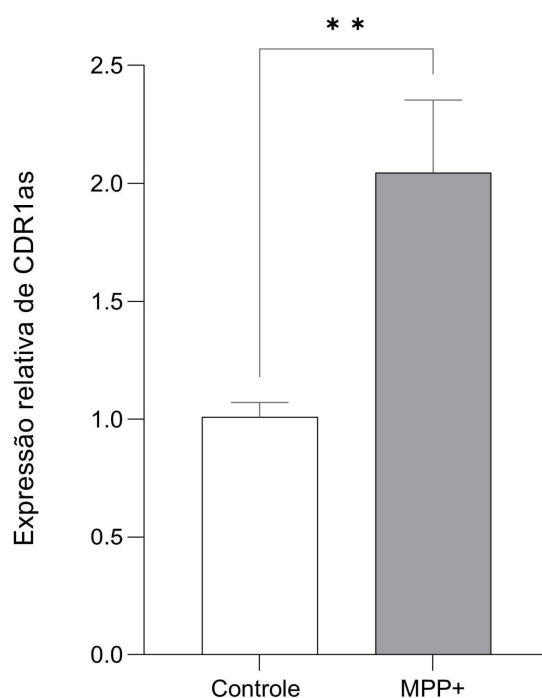


Figura 12. Expressão relativa de CDR1as em células SH-SY5Y expostas ao MPP+. O tratamento com 1 mM de MPP+ em 24 horas induziu um aumento aberrante de 104% (2,04-fold) na expressão do circRNA CDR1as em comparação com o grupo controle ($p= 0,0083$). Os dados foram normalizados utilizando os genes de referência beta-actina e GPB1. O nível de significância estatística comparado ao grupo controle é indicado por asteriscos: ** $p<0,01$.

4.5 Transfecção com miR-7 e miR-671 mimic

Os ensaios de expressão gênica citados acima mostraram uma diminuição significativa da expressão de miR-7 e miR-671 em células expostas à injúria por MPP+, sugerindo que essa redução poderia ter contribuído para a perda de viabilidade. Nesse sentido, optou-se por realizar um ensaio piloto para avaliar se a suplementação desses miRNAs reverteria a perda de viabilidade celular após a exposição ao MPP+. Para isso, as células foram transfectadas com imitadores sintéticos dos miRNAs miR-7 e miR-671. A viabilidade celular do grupo controle positivo exposto ao MPP+ (1 mM) foi de 68,2%. As transfecções com os imitadores de miR-7 e de miR-671 resultaram em reduções de viabilidade de 63,1% e 53,8%, respectivamente, porém sem diferença significativa entre os grupos. Conforme mostra a Figura 13, esses resultados preliminares indicam que a suplementação com os imitadores não causou proteção significativa contra a citotoxicidade induzida por MPP+ nas condições testadas.

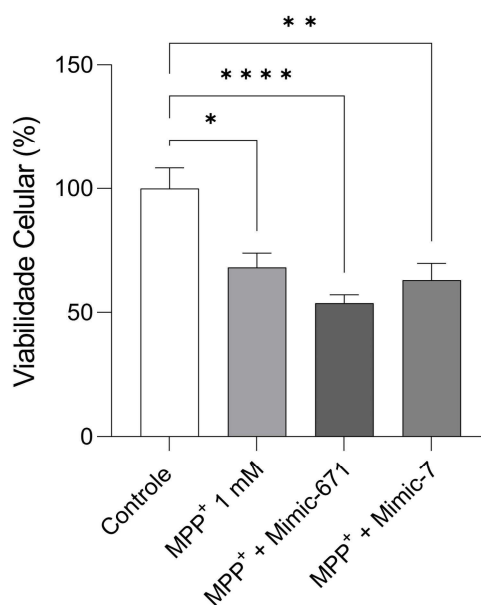


Figura 13. Viabilidade celular após suplementação (transfecção) com imitadores de miR-671 e miR-7 em células SH-SY5Y. A transfecção celular com imitadores de miR-671 e miR-7 não causou efeito neuroprotetor. Os valores de viabilidade celular em percentuais foram: grupo controle positivo MPP⁺ isolado (68,2%); MPP⁺ com imitador de miR-671 (53,8%); e MPP⁺ com imitador de miR-7 (63,1%). Após seguir o padrão de normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk*, foram realizados o *one-way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Os níveis de significância estatística dos grupos submetidos a MPP⁺ comparados ao grupo controle negativo são indicados por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

Para a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares subjacentes à patogênese da DP, é necessária a utilização de protocolos padronizados e modelos de pesquisa validados. Uma vez que o isolamento e a manutenção de neurônios dopaminérgicos humanos primários são complexos, a linhagem humana de neuroblastoma SH-SY5Y tem sido amplamente utilizada e foi a selecionada para o atual estudo (81). Esta linhagem celular, derivada de um neuroblastoma metastático obtido na década de 1970, é valorizada por sua origem humana, simplicidade de manipulação e, principalmente, por seu fenótipo catecolaminérgico (81,82). Tal característica é conferida pela presença de enzimas como a tirosina hidroxilase e dopamina beta-hidroxilase –essenciais para a síntese de L-dopa, dopamina e noradrenalina, o que apoia sua utilização como modelo representativo de neurônios dopaminérgicos (81–83).

Pelo fato de a linhagem SH-SY5Y não ser puramente dopaminérgica e apresentar aberrações oncogênicas, existem diversos protocolos para induzir sua diferenciação, utilizando agentes como ácido retinóico (AR), tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ou fator neurotrófico

derivado do cérebro (BDNF) (83,84). Entretanto, cerca de 81,5% dos trabalhos publicados sobre a DP optaram por não diferenciar as células (82). Alguns autores, justificam que a ausência de diferenciação pode comprometer a validade biológica do modelo ao não simular um neurônio terminal maduro, limitando, assim, a representatividade dos achados frente à patogênese da DP, especialmente em estudos que visem avaliar disfunções neuroprotetoras, considerando que o próprio AR pode conferir proteção celular (82,83). Por outro lado, o processo de diferenciação, mediado por agentes químicos, poderia introduzir alterações no padrão de expressão dos ncRNAs investigados no estudo com MPP+. Portanto, optou-se por não induzir a diferenciação celular.

Sabe-se que a estratégia farmacológica é a abordagem mais comum empregada para mimetizar a DP em modelos *in vitro* utilizando células SH-SY5Y, sendo o MPP+ um dos principais indutores toxicológicos escolhidos pela sua capacidade de inibir o Complexo I da cadeia de transporte de elétrons, levando à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (82). Contudo, é importante ressaltar que nem todos os aspectos da fisiopatologia da DP podem ser estudados em células SH-SY5Y, como observações de anormalidades eletrofisiológicas ou disfunções neuroquímicas em nível sináptico, requerendo, assim, modelos mais complexos, como culturas primárias de neurônios dopaminérgicos ou cortes de cérebro *ex vivo* (82–84).

A indução do fenótipo de parkinsonismo no modelo celular da SH-SY5Y foi realizada pela exposição ao MPP+ a 1 mM por 24 horas, conforme publicação anterior do grupo (74). Esta concentração foi selecionada para mimetizar o limiar patológico da DP, visto que a sintomatologia motora clássica se manifesta apenas após a perda de, aproximadamente, 50% dos neurônios dopaminérgicos (18,19). Os dados da literatura confirmam a adequação desta dose para atingir o nível desejado de toxicidade, uma vez que a exposição ao MPP+ a 1 mM por 24 horas resultou em viabilidade celular de aproximadamente 57,7%, 50,1%, 53,2% e 50%, respectivamente, Song *et al.* (2021), Kim *et al.* (2018); Lee *et al.* (2011) e Zhao *et al.* (2016) (85–88). Adicionalmente, este valor está próximo da IC50 (Concentração Inibitória Média) para o MPP+ nas células SH-SY5Y, que foi determinada em 1,233 mM (89).

A eficácia desta concentração de MPP+ também é comprovada pelo aumento significativo na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, confirmando a indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (85,89). Ademais, como consequência direta do estresse, a ativação da via apoptótica é apresentada em estudos anteriores, onde o tratamento com MPP+ em células SH-SY5Y resultou em alterações morfológicas nucleares consistentes

com a apoptose, como a cromatina altamente condensada (88). Limboonreung *et al.* (2020) observaram que a exposição ao MPP⁺ induziu as alterações morfológicas típicas associadas à apoptose e aumentou significativamente o número de núcleos apoptóticos em 273,60% em comparação com o grupo controle (90). Portanto, a presença de estresse oxidativo e a contagem de núcleos apoptóticos observadas no presente estudo estão em consonância com os desfechos citotóxicos descritos na literatura para este modelo experimental.

A técnica de RT-qPCR é amplamente utilizada para medir os níveis de expressão de ncRNAs quando o número de genes-alvo é moderado, visto que se configura como um método mais acessível, rápido e tecnicamente menos complexo em comparação com abordagens de alto número de análises como microarrays e sequenciamento de nova geração, mantendo, ainda, altos índices de sensibilidade, precisão e reprodutibilidade (91,92). Existem dois métodos de quantificação por RT-qPCR: a quantificação absoluta, que infere o número de transcritos a partir de uma curva padrão (construída com diluições seriadas de cDNA conhecido), e a quantificação relativa, que mede a expressão do gene-alvo em função da expressão de um gene de referência interno à amostra (93). Para este estudo, foi utilizada a quantificação relativa. Para a validação dos resultados de quantificação relativa, os genes de referência devem exibir níveis de expressão constantes, independentemente das condições experimentais (94,95). Contudo, as classes de ncRNAs recentemente estudadas, como os lncRNAs e circRNAs, ainda não possuem genes de referência bem estabelecidos na literatura. Dessa forma, embora os genes testados neste estudo tenham sido calibrados com base em genes de referência estáveis para RNAm, a busca por genes de referência mais estáveis e ideais às condições dos alvos estudados se faz necessária para refinar a calibração e a precisão dos resultados obtidos.

A participação de miR-7 na patogênese da DP é caracterizada por sua função sobre diversos mecanismos celulares, incluindo a regulação da α -sinucleína, neuroinflamação, função mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose, via glicolítica e expressão gênica (96). Estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram níveis reduzidos de miR-7 em regiões cerebrais relacionadas à neuropatologia, notadamente na substância negra, e essa depleção está correlacionada ao aumento da expressão de α -sinucleína, perda de neurônios dopaminérgicos e depleção de dopamina estriatal (44,45,97). Tais achados são complementados por evidências de neuroproteção, nas quais o aumento da expressão de miR-7, assim como de miR-153, demonstrou capacidade de proteger de forma significativa neurônios primários da morte celular, bem como evidenciado em modelos *in vitro* de DP induzida por MPP⁺ (97–99).

Estudos demonstram que os circRNAs estão significativamente enriquecidos no sistema nervoso e tendem a se acumular com a idade, o que é atribuído à alta importância do *splicing* alternativo e à expressão da maioria dos genes produtores desses RNAs no cérebro (62,100–103). CDR1as atua como uma esponja de miR-7 no tecido cerebral, devido à sua alta expressão, estabilidade, circularidade e aos múltiplos sítios de ligação conservados (61). Embora o sequestro do miR-7 seja sua função principal, achados sugerem que CDR1as possui funções adicionais, podendo atuar como *scaffold* para proteínas ou regular outros RNAs, modulando, assim, a concentração local de diversos fatores moleculares (61). No presente estudo, a análise de expressão gênica de CDR1as revelou um aumento significativo de 104% (2,04-fold) nas células SH-SY5Y expostas a 1 mM de MPP+ por 24 horas em relação ao grupo controle, enquanto miR-7 e miR-671 revelaram uma diminuição de expressão de 38,7% (0,613-fold) e 56,1% (0,439-fold), respectivamente, corroborando sua relevância patológica com achados já descritos. O microRNA miR-671 é capaz de induzir a clivagem de CDR1as, processo dependente da enzima Ago2. A consequente redução de CDR1as provoca uma diminuição correlata nos níveis do RNA-alvo de CDR1as (75).

Quanto aos alvos, Kleaveland *et al.* (2018) descreveu, pela primeira vez, uma rede regulatória pós-transcricional, estabelecida pela interação entre quatro RNAs não codificantes: o lncRNA Cyrano, o circRNA CDR1as e os microRNAs miR-7 e miR-671 (58). Utilizando camundongos geneticamente modificados, os autores demonstraram que Cyrano atua como um regulador chave de miR-7, promovendo sua degradação por meio de um sítio de ligação altamente complementar. Ao diminuir os níveis de miR-7, Cyrano alivia a repressão sobre seus mRNAs-alvo e permite o acúmulo de CDR1as em neurônios. Em contrapartida, a ausência de Cyrano resulta em um excesso de miR-7, o que leva à desestabilização e degradação de CDR1as, um processo que é potencializado pelo aumento do processamento de CDR1as mediado pelo segundo microRNA da rede, miR-671. Esses achados se alinham com as observações funcionais de Piwecka *et al.* (2017), destacando que CDR1as é um dos transcritos mais alvejados por microRNAs no cérebro, associado à modulação sensório-motora e à transmissão sináptica (56). A concordância entre os estudos, sugere que Cyrano, CDR1as e miR-671 são moléculas importantes no equilíbrio dinâmico, na concentração e na biodisponibilidade de miR-7 para as funções neuronais. Contudo, a divergência metodológica do nosso modelo experimental de MPP+ em relação ao estudo de Piwecka pode explicar a ausência de mudança significativa na viabilidade celular com a suplementação de miR-7 e miR-671. Devido às limitações inerentes ao modelo empregado, investigações futuras utilizando

modelos de superexpressão de α -sinucleína, como vetores virais ou fibrilas pré-formadas, poderão elucidar de forma mais precisa esses papéis.

Entre as limitações do presente estudo estão a ausência de diferenciação celular. Embora seja uma abordagem metodológica para aproximar as células SH-SY5Y de neuroblastoma de um fenótipo de neurônio dopaminérgico, esse procedimento pode introduzir vieses, como a alteração do padrão de expressão de ncRNAs ou a indução de proteção celular artificial. Assim, optou-se por manter a condição celular original da linhagem SH-SY5Y em vez de diferenciá-la. Além disso, as limitações centrais do estudo decorrem da própria natureza da linhagem SH-SY5Y. Por ser derivada de um neuroblastoma, a célula apresenta aberrações oncogênicas que limitam as conclusões do nosso estudo. Ademais, o modelo não representa disfunções sinápticas nem processos complexos da neuropatologia do Parkinson, como a neuroinflamação e a formação dos corpos de Lewy.

Os principais achados mostram que o circRNA CDR1as apresentou aumento significativo de 2,04 vezes, enquanto miR-7 e miR-671 tiveram suas expressões reduzidas em 0,613 e 0,439, respectivamente. Contudo, dados preliminares utilizando imitadores de miR-7 e miR-671 não demonstraram efeito neuroprotetor, o que limita a comprovação de um papel funcional dessas moléculas no modelo de MPP+. Por fim, o presente estudo confirmou que a preparação experimental com MPP+ a 1mM em células SH-SY5Y está adequada como modelo para estudo de injúria de células dopaminérgicas, uma vez que foi capaz de induzir estresse oxidativo e morte celular em níveis comparáveis aos da literatura.

6 CONCLUSÃO

A perda de viabilidade de células dopaminérgicas SH-SY5Y, com aumento de estresse oxidativo e fragmentação nuclear indicativa de apoptose é acompanhada de mudanças no padrão de expressão gênica dos RNAs não-codantes CDR1as, miR-7 e miR-671. Por se tratar de moléculas com papel biológico relevante e que formam uma rede regulatória, esses achados sugerem seu envolvimento na morte de neurônios dopaminérgicos e, assim, novos estudos funcionais em modelos *in vivo* são relevantes para aprofundar o conhecimento sobre a neurobiologia da doença de Parkinson.

7 CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS

A principal contribuição deste trabalho está em mostrar, pela primeira vez, que a rede regulatória de miR-7 se altera no modelo *in vitro* de neurodegeneração dopaminérgica induzida por MPP+. Embora nosso ensaio piloto de suplementação destes microRNAs não tenha conferido proteção celular, novos ensaios com sistemas de expressão mais robustos e doses de estruturas sintéticas são relevantes no mesmo modelo *in vitro* de DP. Uma perspectiva importante para a continuidade da pesquisa será testar o papel destes ncRNAs em modelos *in vivo* e, portanto, mais robustos de Parkinson, incluindo aqueles com superexpressão de α sinucleína por meio de vetor viral e os derivados de fibrilas pré-formadas, a fim de elucidar o papel funcional desta rede regulatória em um contexto patológico mais representativo da doença. Por fim, a aplicabilidade clínica de utilizar-se estes ncRNAs como biomarcadores deve ser buscada mediante análise da expressão gênica em amostras biológicas de pacientes com DP.

REFERÊNCIA

1. PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223– 236, May 2002. ISSN 0895-0172, 1545-7222. Disponível em: <https://psychiatryonline.org/doi/10.1176/jnp.14.2.223>.
2. GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a008862– a008862, September 2011. ISSN 2157-1422. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a008862>.
3. HOEHN, M. M.; YAHR, M. D. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. **Neurology**, v. 17, n. 5, p. 427– 427, May 1967. ISSN 0028-3878, 1526-632X. Disponível em: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.17.5.427>.
4. GIBB, W. R.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 745– 752, June 1988. ISSN 0022-3050. Disponível em: <https://jnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnp.51.6.745>.
5. GIBB, W. R.; LEES, A. J. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 388– 396, May 1991. ISSN 0022-3050. Disponível em: <https://jnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnp.54.5.388>.
6. TORSNEY, K. M.; STOKER, T. B. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: **Parkinson's Disease: Pathogenesis and clinical aspects**. [S.l.]: Codon Publications, 2018. p. 3– 26. ISBN 978-0-9944381-6-4.
7. ERKKINEN, M. G.; KIM, M.; GESCHWIND, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, April 2018. ISSN 1943-0264. Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a033118>.
8. IBGE– INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2022: população por idade e sexo. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/trabalho/22827-censo-demografico-2022.html?edicao=38166&t=resultados>.
9. SLANZI, A. et al. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, May 2020. ISSN 2296-634X. Publisher: Frontiers Media SA. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00328/full>.
10. DOXAKIS, E. Insights into the multifaceted role of circular RNAs: implications for Parkinson's disease pathogenesis and diagnosis. **npj Parkinson's Disease**, v. 8, n. 1, January 2022. ISSN 2373-8057. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41531-021-00265-9>.

11. POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, March 2017. ISSN 2056-676X. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201713>.
12. POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease: MDS-PD Clinical Diagnostic Criteria. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1591– 1601, October 2015. ISSN 0885-3185. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/mds.26424>.
13. TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. microRNA signatures in prodromal REM sleep behavior disorder and early Parkinson's disease as noninvasive biomarkers. **Sleep Medicine**, v. 78, p. 160– 168, February 2021. ISSN 1389-9457. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389945720305621>.
14. KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896– 912, August 2015. ISSN 0140-6736. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614613933>.
15. FAHN, S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, n. 1, p. 1– 14, June 2003. ISSN 0077-8923, 1749-632. Publisher: Wiley. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x>.
16. ESTEVINHO, F.; SOARES-FORTUNATO, J. Dopamina E Receptores. Revista Portuguesa de Psicossomática. **Dopamina E Receptores.**, v. 5., p. 21– 31, June 2003. ISSN 0874-4696.
17. CORREIA, M. et al. Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. v. 1(2), n. Caderno De Graduação- Ciências Biológicas E Da Saúde- UNIT- SERGIPE, p. 57– 65, 2013. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/cadernobiologicas/article/view/290>.
18. FREED, C. R.; ZHOU, W.; BREEZE, R. E. Dopamine Cell Transplantation for Parkinson's Disease: The Importance of Controlled Clinical Trials. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 4, p. 549– 561, October 2011. ISSN 18787479. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878747923017828>.
19. GORDIÁN-VÉLEZ, W. J. et al. Restoring lost nigrostriatal fibers in Parkinson's disease based on clinically-inspired design criteria. **Brain Research Bulletin**, v. 175, p. 168– 185, October 2021. ISSN 03619230. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923021002227>.
20. BAMFORD, A.; HENDERSON, E. J. Parkinson's disease in older people. **Medicine**, v. 49, n. 1, p. 56– 61, January 2021. ISSN 13573039. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303920302668>.
21. BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197– 211, March 2003. ISSN 01974580. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458002000659>.
22. ANISZEWSKA, A. et al. Modeling Parkinson's disease-related symptoms in alpha-synuclein overexpressing mice. **Brain and Behavior**, v. 12, n. 7, July 2022. ISSN 2162-3279, 2162-3279. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/brb3.2628>.

23. HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1497– 1499, October 2001. ISSN 00283878, 1526-632X. Disponível em: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.57.8.1497>.
24. MUNHOZ, R. P. et al. The clinical diagnosis of Parkinson's disease. **Arquivos de Neuro Psiquiatria**, v. 82, n. 06, p. 001– 010, June 2024. ISSN 0004-282X, 1678-4227. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-1777775>.
25. CAPRONI, S.; COLOSIMO, C. Diagnosis and Differential Diagnosis of Parkinson Disease. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 13– 24, February 2020. ISSN 0749-0690. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749069019300898>.
26. AGAMANOLIS, D. Chapter 9- DEGENERATIVE DISEASES. In: **Neuropathology. PARKINSON'S DISEASE**. [s.n.], 2024. Disponível em: <https://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9dPD.html>.
27. MARTINEZ-MARTIN, P. et al. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 3, p. 399– 406, February 2011. ISSN 0885-3185, 1531-8257. Disponível em: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.23462>.
28. ZHANG, H. et al. The Role of Non-Coding RNAs in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Recent Advancement. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 7, June 2022. ISSN 1424-8247.
29. ZARATIEGUI, M.; IRVINE, D. V.; MARTIENSSSEN, R. A. Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 763– 776, February 2007. ISSN 00928674. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407001894>.
30. COSTA, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, v. 410, n. 1, p. 9– 17, February 2008. ISSN 03781119. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111907006208>.
31. HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509– 524, August 2014. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3838>.
32. LEE, H. et al. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. **Protein & Cell**, v. 7, n. 2, p. 100 – 113, February 2016. ISSN 1674800X, 1674-8018. Publisher: Oxford University Press (OUP). Disponível em: <https://academic.oup.com/proteincell/article/7/2/100/6794460>.
33. SHAHEEN, N. et al. MicroRNAs regulation in Parkinson's disease, and their potential role as diagnostic and therapeutic targets. **npj Parkinson's Disease**, v. 10, n. 1, October 2024. ISSN 2373-8057. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41531-024-00791-2>.
34. BROUGHTON, J. P. et al. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. **Molecular Cell**, v. 64, n. 2, p. 320– 333, October 2016. ISSN 10972765. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276516305214>.

35. VASUDEVAN, S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. **WIREs RNA**, v. 3, n. 3, p. 311– 330, May 2012. ISSN 1757-7004, 1757-7012. Disponível em: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wrna.121>.
36. FREITAS, A. S.; FREITAS, R. K. C. O papel dos microRNAs na regulação gênica e implicações em doenças neurodegenerativas. **STUDIES IN HEALTH SCIENCES**, v. 5, n. 4, November 2024. ISSN 2764-0884. Publisher: Brazilian Journals. Disponível em: <https://ojs.studiespublicacoes.com.br/ojs/index.php/shs/article/view/10185>.
37. FU, G. et al. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5519– 5544, March 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/5519>.
38. TÜFEKCI, K. U. et al. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. In: YOUSEF, M.; ALLMER, J. (Ed.). **miRNomics: MicroRNA biology and computational analysis**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 33– 50. ISBN 978-1-62703-747-1 978-162703-748-8. Series Title: Methods in Molecular Biology. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-748-8_3.
39. PAUL, P. et al. Interplay between miRNAs and human diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 2007– 2018, March 2018. ISSN 0021-9541, 1097-4652. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.25854>.
40. WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNAs as Biomarkers and Diagnostics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 1, p. 25– 30, January 2016. ISSN 0021-9541, 1097-4652. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.25056>
41. HUANG, W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. In: HUANG, J. et al. (Ed.). **Bioinformatics in MicroRNA Research**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 57– 67. ISBN 978-1-4939-7044-5 978-1-4939-7046-9. Series Title: Methods in Molecular Biology. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7046-9_4.
42. KUO, M. et al. The role of noncoding RNAs in Parkinson’s disease: biomarkers and associations with pathogenic pathways. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, December 2021. ISSN 1423-0127. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12929-021-00775-x>.
43. ZHANG, J. et al. MicroRNA-7 Protects Against Neurodegeneration Induced by Synuclein Preformed Fibrils in the Mouse Brain. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 4, p. 2529– 2540, October 2021. ISSN 1878-7479. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878747923007213>.
44. MCMILLAN, K. J. et al. Loss of MicroRNA-7 Regulation Leads to-Synuclein Accumulation and Dopaminergic Neuronal Loss In Vivo. **Molecular Therapy**, v. 25, n.10, p. 2404– 2414, October 2017. ISSN 1525-0016. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001617303799>.

45. JUNN, E. et al. Repression of synuclein expression and toxicity by microRNA-7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 13052– 13057, August 2009. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0906277106>.
46. CHOI, D. C. et al. MicroRNA-7 facilitates the degradation of alpha-synuclein and its aggregates by promoting autophagy. **Neuroscience Letters**, v. 678, p. 118123, June 2018. ISSN 0304-3940. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394018303367>.
47. CHAUDHURI, A. D. et al. MicroRNA-7 Regulates the Function of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Targeting VDAC1 Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 12, p. 6483– 6493, March 2016. ISSN 0021-9258. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192582044339X>.
48. GOH, S. Y. et al. Role of MicroRNAs in Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, November 2019. ISSN 1422-0067.
49. CHATTERJEE, P.; ROY, D. Comparative analysis of RNA-Seq data from brain and blood samples of Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 484, n. 3, p. 557– 564, March 2017. ISSN 0006291X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17301808>.
50. UWATOKO, H. et al. Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, December 2019. ISSN 1756-6606. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-019-0471-2>.
51. WOOTEN, S.; SMITH, K. N. Long non-coding RNA OIP5-AS1 (Cyrano): A context-specific regulator of normal and disease processes. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 1, January 2022. ISSN 2001-1326, 2001-1326. Publisher: Wiley. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ctm2.706>.
52. GUTTMAN, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 223– 227, March 2009. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07672>.
53. PONTING, C. P.; BELGARD, T. G. Transcribed dark matter: meaning or myth? **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R2, p. R162– R168, October 2010. ISSN 0964-6906, 1460-2083. Publisher: Oxford University Press (OUP). Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddq362>.
54. ZHANG, K. et al. The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. **Gene**, v. 547, n. 1, p. 1– 9, August 2014. ISSN 0378-1119. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914007070>.
55. TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. et al. Delivery of miRNA-Targeted Oligonucleotides in the Rat Striatum by Magnetofection with Neuromag®. **Molecules**, v. 23, n. 7, July 2018. ISSN 1420-3049. Publisher: MDPI AG. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/7/1825>.

56. PIWECKA, M. et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. **Science**, v. 357, n. 6357, September 2017. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Publisher: American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aam8526>.
57. ULITSKY, I. et al. Conserved Function of lincRNAs in Vertebrate Embryonic Development despite Rapid Sequence Evolution. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1537– 1550, December 2011. ISSN 0092-8674. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411014504>.
58. KLEAVELAND, B. et al. A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. **Cell**, v. 174, n. 2, p. 350– 362.e17, July 2018. ISSN 0092-8674. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418306342>.
59. SONG, Z.; XIE, B. LncRNA OIP5-AS1 reduces-synuclein aggregation and toxicity by targeting miR-126 to activate PLK2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 740, January 2021. ISSN 0304-3940. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394020307527>.
60. KRISTENSEN, L. S. et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 675– 691, November 2019. ISSN 1471-0056, 1471-0064. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41576-019-0158-7>.
61. MEMCZAK, S. et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 333– 338, March 2013. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11928>.
62. ASHWAL-FLUSS, R. et al. circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing. **Molecular Cell**, v. 56, n. 1, p. 55– 66, October 2014. ISSN 1097-2765. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276514006741>.
63. REN, L. et al. Mechanisms of circular RNA degradation. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, December 2022. ISSN 2399-3642. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-04262-3>.
64. HANSEN, T. B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 384– 388, March 2013. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11993>.
65. LU, S. et al. Current status and potential role of circular RNAs in neurological disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 150, n. 3, p. 237– 248, August 2019. ISSN 0022-3042, 1471-4159. Publisher: Wiley. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.14724>.
66. BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer Research**, v. 33, n. 11, p. 2643– 2652, November 1973. ISSN 0008-5472.

67. LUSTOSA, C. V. dos S. F.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. **Interferência de RNA para silenciamento gênico da enzima NO sintase neuronal (nNOS) no modelo in vitro de neurodegeneração por interferon gama.** [s.n.], 2013. Disponível em: <http://educapes.capes.gov.br/handle/capes/969996>.
68. KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 9– 21, 2013. ISSN 1940-6029.
69. DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1– 12, April 2011. ISSN 00039861. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611000514X>.
70. LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates—clinical and experimental aspects. **Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 100, p. 49– 54, 1984. ISSN 0065-1427.
71. BLESÁ, J.; PRZEDBORSKI, S. ParkinsonâCTMs disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, December 2014. ISSN 1662-5129. Publisher: Frontiers Media SA. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00155/abstract>.
72. GAKI, G. S.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease. **NeuroMolecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 217– 230, June 2014. ISSN 1535-1084, 1559-1174. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12017-014-8294-x>.
73. BRZOZOWSKI, M. J. et al. The effect of nNOS inhibitors on toxin-induced cell death in dopaminergic cell lines depends on the extent of enzyme expression. **Brain Research**, v. 1404, p. 21– 30, August 2011. ISSN 0006-8993. Publisher: Elsevier BV. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899311010201>.
74. TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. et al. Interferon Gamma Potentiates the Injury Caused by MPP+ on SH-SY5Y Cells, Which is Attenuated by the Nitric Oxide Synthases Inhibition. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 12, p. 2452– 2464, December 2014. ISSN 0364-3190, 1573-6903. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-014-1449-1>.
75. HANSEN, T. B. et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA: miRNA mediated cleavage of circular antisense RNA. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 21, p. 4414– 4422, November 2011. ISSN 0261-4189. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.359>.
76. NAN, A. et al. A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, MiR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 1671– 1684, April 2017. ISSN 0340-5761, 1432-0738. Publisher: Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1837-1>.

77. WANG, S. et al. Research progress on the role and mechanism of miR-671 in bone metabolism and bone-related diseases. **Frontiers in Oncology**, v. 12, January 2023. ISSN 2234-943X. Publisher: Frontiers Media SA. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.1018308/full>.
78. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55– 63, December 1983. ISSN 00221759. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>.
79. TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. **Current Gene Therapy**, v. 18, n. 3, p. 143– 153, June 2018. ISSN 1566-5232. Publisher: Bentham Science Publishers Ltd. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/161677/article>.
80. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402– 408, December 2001. ISSN 10462023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>.
81. LOPEZ-SUAREZ, L. et al. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. **NeuroToxicology**, v. 92, p. 131– 155, September 2022. ISSN 0161813X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X22001231>.
82. XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, December 2017. ISSN 1750-1326. Disponível em: <http://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-017-0149-0>.
83. IOGHEN, O. C.; CEAFALAN, L. C.; POPESCU, B. O. SH-SY5Y Cell Line In Vitro Models for Parkinson Disease Research—Old Practice for New Trends. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 22, n. 1, January 2023. ISSN 0219-6352, 1757-448X. Disponível em: <https://www.imrpress.com/journal/JIN/22/1/10.31083/j.jin2201020>.
84. LÓPEZ-CARBALLO, G. et al. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25297– 25304, July 2002. ISSN 00219258. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819664872>.
85. SONG, Q.; PENG, S.; ZHU, X. Baicalein protects against MPP+/MPTP-induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress in SH-SY5Y cells and mouse model of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 87, p. 188– 194, December 2021. ISSN 0161813X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X21001236>.
86. KIM, H. et al. Sophora flavescens Aiton Decreases MPP+-Induced Mitochondrial Dysfunction in SH-SY5Y Cells. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, April 2018.

ISSN 1663-4365. Disponível em:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2018.00119/full>.

87. LEE, D.; KIM, C.; LEE, Y. J. Astaxanthin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 271 – 280, January 2011. ISSN 02786915. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151000654X>.
88. ZHAO, Q. et al. Protection against MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells by tormentic acid via the activation of PI3-K/Akt/GSK3 pathway. **Neurochemistry International**, v. 97, p. 117 – 123, July 2016. ISSN 01970186. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018616300365>.
89. KIM, C.; PARK, S. IGF-1 protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 3, p. 443– 455, March 2018. ISSN 2049-3614.
90. LIMBOONREUNG, T.; TUCHINDA, P.; CHONGTHAMMAKUN, S. Chrysoeriol mediates mitochondrial protection via PI3K/Akt pathway in MPP⁺ treated SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 714, January 2020. ISSN 03043940. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394019306482>.
91. LOWE, R. et al. Transcriptomics technologies. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 5, May 2017. ISSN 1553-7358. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>.
92. BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611 – 622, April 2009. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>.
93. VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-Five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis. **BioTechniques**, v. 44, n. 5, p. 619 – 626, April 2008. ISSN 0736-6205, 1940-9818. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2144/000112776>.
94. VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, June 2002. ISSN 1474-760X. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
95. RAMHØJ, L.; AXELSTAD, M.; SVINGEN, T. Validation of endogenous reference genes in rat cerebral cortex for RT-qPCR analyses in developmental toxicity studies. **PeerJ**, v. 7, June 2019. ISSN 2167-8359. Disponível em: <https://peerj.com/articles/7181>.
96. TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. et al. The Promise and Challenges of Developing miRNA-Based Therapeutics for Parkinson's Disease. **Cells**, v. 9, n. 4, March 2020. ISSN 2073-4409. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/841>.
97. CHOI, D. C. et al. MicroRNA-7 Protects against 1-Methyl-4-Phenylpyridinium- Induced Cell Death by Targeting RelA. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 38, p. 12725 – 12737,

- September 2014. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em:
<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0985-14.2014>.
98. FRAGKOULI, A.; DOXAKIS, E. miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP+-induced cell death via upregulation of mTOR pathway. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, July 2014. ISSN 1662-5102. Disponível em:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00182/abstract>.
99. DOXAKIS, E. Post-transcriptional Regulation of α -Synuclein Expression by mir-7 and mir-153. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12726 – 12734, April 2010. ISSN 00219258. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820550539>.
100. RYBAK-WOLF, A. et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. **Molecular Cell**, v. 58, n. 5, p. 870 – 885, June 2015. ISSN 10972765. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727651500218X>.
101. YOU, X. et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 603 – 610, April 2015. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/nn.3975>.
102. GRUNER, H. et al. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, December 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/srep38907>.
103. CHEN, W.; SCHUMAN, E. Circular RNAs in Brain and Other Tissues: A Functional Enigma. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 9, p. 597 – 604, September 2016. ISSN 01662236. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223616300698>.