

LETÍCIA DIAS S. SILVA

EXPRESSÃO DE PARP1 E MIR-7 NO MODELO IN VITRO DE DEGENERAÇÃO
INDUZIDO POR MPP+ EM CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

BRASÍLIA

2025

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

LETÍCIA DIAS S. SILVA

EXPRESSÃO DE PARP1 E MIR-7 NO MODELO IN VITRO DE DEGENERAÇÃO
INDUZIDO POR MPP+ EM CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida
Coorientadora: Dra. Simoneide Souza T. de Almeida

BRASÍLIA

2025

LETÍCIA DIAS S. SILVA

EXPRESSÃO DE PARP1 E MIR-7 NA LESÃO CELULAR DOPAMINÉRGICA
INDUZIDA POR MPP+

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Felipe Von Glehn Silva (membro titular)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fernando Francisco B. Resende (membro titular)
Universidade de Brasília

Dra. Clara Luna Freitas Marina (membro suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a todos os meus pacientes, que me inspiram a buscar constantemente a evolução, com o propósito de, de alguma forma, contribuir para o bem-estar do próximo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu alicerce, minha fortaleza e meu refúgio. Nele encontro força nos dias difíceis, direção nas incertezas e conforto em cada desafio. Sua presença me guia, me inspira e me sustenta, permitindo-me trilhar este caminho com fé, esperança e propósito.

Agradeço à minha mãe, cuja dedicação, cuidado e amor incondicional sempre foram meu porto seguro. Sua presença me fortaleceu nos momentos mais desafiadores, e seu apoio irrestrito foi essencial para que eu pudesse crescer e conquistar meus objetivos. Seu amor e exemplo me impulsionam a evoluir constantemente. Ao meu pai, um verdadeiro exemplo de retidão, força e perseverança. Sua trajetória de vida e seus ensinamentos foram fundamentais para moldar minha caminhada, inspirando-me a perseguir meus sonhos com integridade, coragem e determinação. Assim como você luta incansavelmente todos os dias, aprendi a enfrentar desafios com resiliência e dedicação. Eu te admiro profundamente. Aos meus amados irmãos, que, ao lado dos nossos pais, representam a minha maior riqueza. São um tesouro inestimável, que me fortalece e me enche de gratidão. Estarei sempre aqui para tudo o que precisarem. Sou profundamente grata à Luzia e ao Jeremias por cuidarem com tanto carinho e dedicação dos meus pais.

Ao meu orientador, Ricardo, sou grata pela confiança, pelo respeito e pelo direcionamento. Obrigada por contribuir para minha evolução acadêmica e profissional. Sua orientação abriu caminhos e oportunidades que ampliaram meus horizontes. À Simoneide, minha eterna gratidão pelo apoio constante e pelo suporte fundamental em toda esta jornada. Agradeço a orientação, pelos momentos de "cafés com ciência" e pelos "cafés para a vida". Obrigada pelo carinho, respeito e por ser uma supermãe. Sua dedicação, incentivo e amor pelo que faz fizeram toda a diferença em minha caminhada. Agradeço à Franciele, cuja amizade e parceria foram indispensáveis. As trocas de ideias, as reflexões compartilhadas e os momentos de aprendizado enriqueceram profundamente minha trajetória. Obrigada pelos cafés, pelas conversas e pela generosidade ao dividir seu conhecimento comigo. Agradeço à Sabrina, minha companheira desde o início do mestrado, por sua amizade sincera, pelas conversas revigorantes, pelas corridas, pela natação e pelos momentos que tornaram essa caminhada mais leve e especial. Que nossa amizade se fortaleça ainda

mais ao longo dos anos. Ao Daniel, meu parceiro de bancada e amigo, minha gratidão pela cumplicidade, pelo apoio e pelas trocas valiosas de experiências, que enriqueceram tanto minha jornada acadêmica.

Aos amigos do laboratório: Deborah, Guilherme e Mary Ann, sou imensamente grata. O companheirismo, as discussões científicas e os momentos de descontração tornaram essa jornada muito mais especial. A Hayana, pelos cafés da manhã, trocas, sorrisos e momentos compartilhados. Agradeço ao professora Ângela Patrícia e a Emília pela disponibilidade de equipamentos do LAMAL. Aos meus colegas de trabalho do PROBE-PD: Pedro, Talita, Gustavo, Isabel, Clarisse, Bárbara, Carol, Flávia, Juliana e Milena, minha gratidão. A parceria, o comprometimento e os momentos compartilhados tornaram cada desafio mais leve e cada conquista mais significativa. Agradeço aos meus colegas de clínica: Julia, Pedro, André, Luísa, Isadora e Inácio. Minha profunda gratidão pela parceria. À Socorro, que sempre cuidou de tudo com carinho e dedicação, tornando os dias longos mais leves com seu cuidado e seus cafés acolhedores.

À professora Grace Kelly Magalhães, pelo gesto generoso de fornecer um reagente crucial para a concretização do meu trabalho. Ao professor Bergman Moraes Ribeiro, minha sincera gratidão por disponibilizar gentilmente o espaço físico e os equipamentos de seu laboratório para a realização dos meus ensaios. Aos colegas do Laboratório de Instituto de Biologia Central, minha gratidão especial à Patrícia, por sua disposição, generosidade e pelo compartilhamento de experiências que contribuíram para minha pesquisa.

Aos meus queridos grandes amigos, que, mesmo distantes, permaneceram ao meu lado, compreendendo e apoiando cada renúncia que precisei fazer ao longo deste período. Sua amizade é um presente inestimável.

Ao Geovanni, que estive ao meu lado nos momentos mais desafiadores, sendo minha fortaleza e meu amparo. Obrigada pela paciência, pela presença constante em finais de semana, feriados e madrugadas de laboratório. Seu apoio e proteção foram essenciais.

Por fim, às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPDF, por tornarem este trabalho possível, garantindo o suporte financeiro necessário para sua execução.

“A ciência só pode produzir conhecimento verdadeiro quando é iluminada pela fé. É a fé que nos dá o propósito e a motivação para seguir buscando a cura e o entendimento.”

— **Gregor Mendel**

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa progressiva que afeta uma parcela significativa da população idosa mundial, caracterizando-se pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra, resultando em sintomas motores como tremores, rigidez e bradicinesia. O diagnóstico da doença ocorre em estágios avançados, com 40-60% de perda neuronal já presente. O tratamento padrão, que envolve a reposição de dopamina com L-dopa, é eficaz apenas nos estágios iniciais e pode resultar em efeitos colaterais motores. Fármacos modificadores da doença com base em MicroRNAs (miRNAs) têm emergido como potenciais alvos terapêuticos na DP devido à sua capacidade de regular a expressão gênica pós-transcricionalmente. PARP1 é uma enzima envolvida na reparação do DNA e na resposta ao estresse oxidativo. Sua hiperatividade tem sido associada à morte neuronal e à progressão da DP. Inibidores de PARP, como o olaparibe, têm demonstrado efeitos neuroprotetores em modelos experimentais da doença, sugerindo seu potencial terapêutico. Este estudo investigou o papel da PARP1 e do miR-7 na neurotoxicidade induzida pelo MPP⁺ em células SH-SY5Y, com foco na viabilidade celular. A inibição farmacológica de PARP com olaparibe demonstrou prevenir a morte celular induzida por MPP⁺ em células SH-SY5Y, sugerindo um efeito neuroprotetor significativo. A redução na morte celular foi observada em diferentes concentrações do olaparibe (0,025 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M, 5 μ M e 30 μ M), com valores de proteção variando de 31% a 88%. Além disso, a expressão relativa de miR-7 em células expostas a 1 mM e 2 mM de MPP⁺ foi reduzida para 0,56 e 0,42 vezes, respectivamente, em comparação com controles. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle, para as concentrações de 1 mM e 2 mM. Um ensaio piloto realizado para avaliar a reposição de miR-7 mostrou resultados promissores, recuperando a viabilidade celular. Esses achados sugerem que a modulação da PARP1 e a reposição de miR-7 podem representar abordagens terapêuticas inovadoras para a Doença de Parkinson (DP), oferecendo novas perspectivas para seu tratamento.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson; SHSY5Y; olaparibe; PARP1; miR-7; MicroRNAs.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a progressive neurodegenerative condition that affects a significant portion of the elderly population worldwide. It is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, leading to motor symptoms such as tremors, rigidity, and bradykinesia. The diagnosis of the disease typically occurs in advanced stages, with 40–60% neuronal loss already present. The standard treatment, which involves dopamine replacement with L-dopa, is effective only in the early stages and may lead to motor side effects. Disease-modifying drugs based on microRNAs (miRNAs) have emerged as potential therapeutic targets in PD due to their ability to regulate gene expression post-transcriptionally. PARP1 is an enzyme involved in DNA repair and oxidative stress response, and its hyperactivity has been associated with neuronal death and PD progression. PARP inhibitors, such as olaparib, have demonstrated neuroprotective effects in experimental models of the disease, suggesting their therapeutic potential. This study investigated the role of PARP1 and miR-7 in MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, focusing on cell viability. Pharmacological inhibition of PARP with olaparib was shown to prevent MPP⁺-induced cell death in SH-SY5Y cells, suggesting a significant neuroprotective effect. Reduced cell death was observed at different concentrations of olaparib (0.025 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M, 5 μ M, and 30 μ M), with protection values ranging from 31% to 88%. Additionally, relative miR-7 expression in cells exposed to 1 mM and 2 mM of MPP⁺ was reduced to 0.56-fold and 0.42-fold, respectively, compared to controls. A statistically significant difference was observed compared to the control, for 1 mM and 2 mM MPP⁺. A pilot assay testing miR-7 replenishment yielded promising results, restoring cell viability. These findings suggest that PARP1 modulation and miR-7 replenishment may represent innovative therapeutic approaches for Parkinson's Disease (PD), offering new perspectives for its treatment.

Keywords: Parkinson's Disease; SHSY5Y; Olaparib; PARP1; miR-7; MicroRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da neurodegeneração dopaminérgica na Doença de Parkinson.	18
Figura 2. Representação química do inibidor farmacológico de PARP – olaparibe..	21
Figura 3. Biogênese de microRNAs e mecanismo de regulação de mRNA por imitadores sintéticos miRNA mimic	25
Figura 4. Microscopia de linhagem celular SH-SY5Y utilizada no presente estudo..	28
Figura 5. Viabilidade celular em linhagem SHSY5Y após injúria com MPP+ MTT..	40
Figura 6. Viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y após injúria com MPP+ nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM e 2 mM, CCK8.....	41
Figura 7. Expressão da enzima PARP1 em SHSY5Y após injúria com MPP+.....	42
Figura 8. Expressão da proteína PARP1 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+, nas concentrações de 1 mM e 2 mM, avaliadas por Western Blotting	43
Figura 9. Viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y após tratamento com olaparibe e injúria com MPP+	45
Figura 10. Expressão relativa de miR-7 em células SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de MPP+.	46
Figura 11. Efeito da transfeção de miR-7 mimic na viabilidade de células SH-SY5Y expostas ao MPP+.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs	32
Tabela 2. Alvos utilizados nos ensaios de expressão gênica de PARP1.....	34
Tabela 3. Grupos experimentais dos ensaios com olaparibe	35
Tabela 4. Grupos experimentais dos ensaios de western blotting	36
Tabela 5. Grupos e condições experimentais do ensaio funcional de transfecção...	38
Tabela 6. Imitadores sintéticos utilizados no estudo.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO – Proteína Argonauta

α -SYN – Alfa-sinucleína

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

BSA – Albumina de Soro Bovino

CCK8 – Cell Counting Kit-8

cDNA – DNA complementar

Cq – Ciclo de quantificação

DA – Dopamina

DAT – Transportador de Dopamina

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

EMA – European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

GAPDH – Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GPB1 – Fosforilase B de Glicogênio

IgG – Imunoglobulina G

L-DOPA – Levodopa

MAO-B – Monoamina Oxidase B

miRNAs – MicroRNAs

MPP+ – 1-Metil-4-fenilpiridônio

MPTP – 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MPTPR – Provavelmente um erro ou variação de MPTP

mRNAs – RNAs mensageiros

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NAD+ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NA – Noradrenalina

PAR – Poly (ADP-ribose)

PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS – Tampão Salino Fosfatado

pre-miRNA – MicroRNA precursor

pri-miRNA – MicroRNAs primários

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RIPA – Tampão RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer)

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – RNA Ribossomal

RT – Transcrição reversa

SH-SY5Y – Linhagem celular representativa de neurônios dopaminérgicos

SNC – Sistema Nervoso Central

SNpc – Substância negra pars compacta

TH – Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	16
1.2	ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	17
1.4	MIRNAs	23
1.5	PAPEL NEUROPROTETOR DO MIR-7 NA DOENÇA DE PARKINSON	26
2	OBJETIVOS DO ESTUDO	27
2.1	GERAL	27
2.2	ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
3.2	INJÚRIA COM MPP+ PARA PADRONIZAÇÃO DE MODELO <i>IN VITRO</i> DA DOENÇA DE PARKINSON	29
3.3	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	29
3.4	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CCK8	30
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	30
3.5.1	Extração e quantificação	31
3.5.2	RT-qPCR	31
3.5.3	Expressão de miRNAs por RT qPCR via sistema TaqMan	31
3.5.4	Expressão relativa de PARP1 via sistema SYBRgreen	33
3.6	INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PARP COM OLAPARIBE	34
3.7	DETECÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOTTING	35
3.7.1	Desenho experimental e quantificação de proteínas	35
3.7.2	Western blotting	36
3.7.3	Separação e Transferência de Proteínas	36
3.7.4	Bloqueio e Incubação com Anticorpos	37
3.7.5	Detecção	37
3.8	TRANSFEÇÃO CELULAR COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MICRORNAS (MIMICS)	38
4	RESULTADOS	39
4.1	CURVA DOSE RESPOSTA DE MPP+	39

4.2	EXPRESSÃO RELATIVA DE PARP1 EM CÉLULAS EXPOSTAS AO MPP+	42
4.3	ENSAIO PILOTO DA PROTEÍNA PARP1	43
4.4	INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PARP	44
4.6	ENSAIO PILOTO DE TRANSFEÇÃO DE miR-7 MIMICS NA INJÚRIA POR MPP+	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	53
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) foi inicialmente descrita em 1817 pelo médico James Parkinson que relatou seis casos, descrevendo características como tremores involuntários, tendência a curvar o tronco para frente e um padrão de marcha acelerada (1). O entendimento patológico da doença se iniciou em 1912, com a identificação dos corpos de Lewy, estruturas proteicas anômalas presentes nos neurônios de pacientes com a doença. Posteriormente, em 1919, foram identificadas alterações na substância negra, incluindo despigmentação, perda neuronal e gliose (2). A hipótese do envolvimento da dopamina no desenvolvimento da DP foi proposta em 1957 e confirmada em 1960, quando se evidenciou a depleção dessa substância nos cérebros de pacientes com a doença. Esse avanço levou à introdução da reposição de Levodopa (L-DOPA), um precursor da dopamina, que se tornou o tratamento padrão ouro para esta desordem neurológica. Outro marco significativo ocorreu em 1997, quando Spillantini e colaboradores identificaram a alfa-sinucleína (α -syn) como um componente-chave da DP. Eles demonstraram a presença dessa proteína nos corpos de Lewy, associando seu acúmulo ao desenvolvimento da doença (3). Esses achados contribuíram para a compreensão dos mecanismos neurodegenerativos da DP e impulsionaram novas abordagens terapêuticas e diagnósticas.

A DP é a segunda condição neurodegenerativa mais prevalente no mundo, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer. Estima-se que a DP afete cerca de 1% da população acima dos 60 anos, com sua prevalência aumentando progressivamente com o envelhecimento (4). Globalmente, a prevalência da DP ultrapassou 6 milhões de casos em 2016, impulsionada pelo envelhecimento populacional, avanços no diagnóstico, mudanças nos padrões demográficos e pela exposição a fatores de risco ambientais, como pesticidas e poluentes industriais (5,6). Além disso, a DP apresenta maior incidência, prevalência e risco de mortalidade em homens do que em mulheres, com uma razão aproximada de 1,4:1 (7).

No Brasil, a prevalência da DP é semelhante à de países de alta renda, afetando cerca de 3,3% da população acima de 64 anos, de acordo com estudos

regionais (8). No entanto, variações regionais e subdiagnósticos são frequentes, especialmente em áreas com menor acesso a serviços de saúde especializados. Estudos utilizando métodos porta-a-porta destacam que, apesar dessas disparidades, a prevalência da DP no Brasil está dentro dos padrões globais (7, 8).

1.2 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

A maioria dos casos de DP apresentam uma etiologia multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. Estudos demonstram que a exposição a agentes químicos tóxicos, como pesticidas, e traumas cranianos aumentam o risco de desenvolvimento da DP, enquanto alguns hábitos de vida, como a prática regular de exercícios físicos e o consumo de cafeína, têm sido apontados como fatores de proteção (5). Embora o diagnóstico da DP seja primariamente clínico, a confirmação definitiva requer evidência patológica, tradicionalmente obtida por meio de exame post-mortem durante a autópsia (9).

As características neuropatológicas da DP são marcadas pela neurodegeneração da substância negra pars compacta (SNpc) e pelo acúmulo de alfa-sinucleína, o que leva à perda da liberação de dopamina no corpo estriado (10). Essa depleção dopaminérgica ocorre devido à morte progressiva dos neurônios da via nigroestriatal, resultando assim, na diminuição dos níveis de dopamina. Os neurônios dessa via dopaminérgica possuem corpos celulares localizados na SNpc e projetam seus axônios para o caudado e o putâmen, regiões cerebrais que compõem o estriado. Com a morte dessas células, há uma diminuição nos níveis de neuromelanina, resultando na despigmentação da SNpc (11,12). A progressão da doença é agravada pelo diagnóstico tardio, frequentemente realizado quando a degeneração dopaminérgica já alcançou entre 40% e 60% das células (12).

Essa alteração desencadeia disfunções motoras características da DP, como tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, que constituem critérios centrais para o diagnóstico clínico da doença (13). Além disso, destaca-se a anosmia que pode surgir anos antes dos sintomas motores e afeta até 90% dos pacientes (14). Entretanto, os sintomas da DP não se limitam apenas às disfunções motoras. A doença também está associada a uma ampla gama de manifestações não

motoras, como declínio cognitivo, depressão, ansiedade, distúrbios do sono e disautonomia, que podem ser igualmente debilitantes (15).

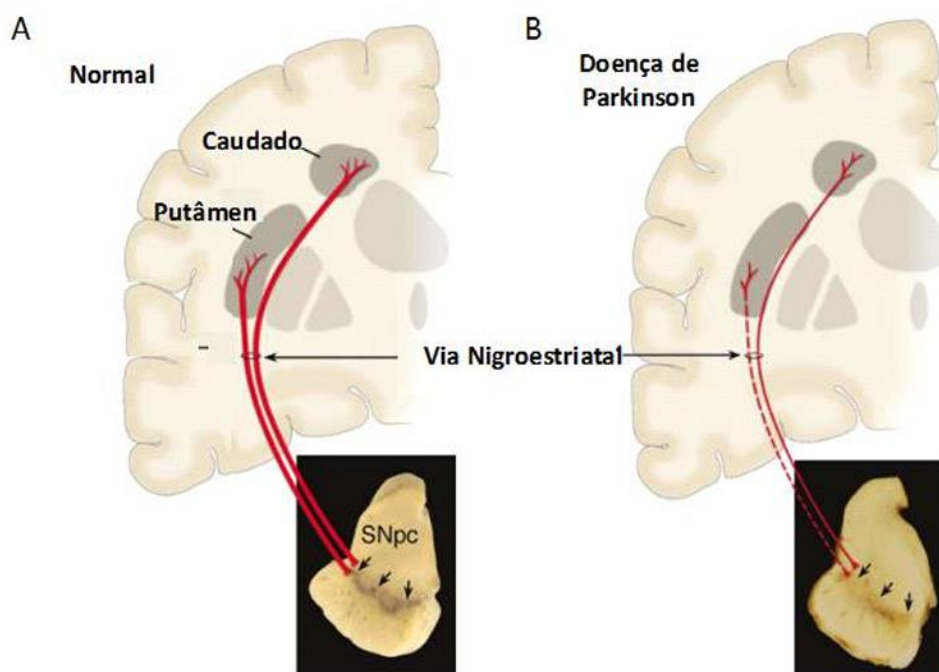


Figura 1. Esquema representativo da neurodegeneração dopaminérgica na Doença de Parkinson. (A) Na via nigroestriatal de indivíduos saudáveis, os neurônios dopaminérgicos, com seus corpos celulares localizados na substância negra pars compacta (SNpc), projetam-se (representadas em vermelho) para o estriado, composto pelo caudado e putâmen. A pigmentação normal da SNpc é visível. (B) Na Doença de Parkinson, a neurodegeneração resulta na perda de neurônios da substância negra, evidenciada pela diminuição da pigmentação de neuromelanina na SNpc. O comprometimento da transmissão dopaminérgica estriatal, mostrado pelas linhas vermelhas (pontilhada e fina), junto à redução das terminações axônicas no estriado, leva ao surgimento dos sintomas motores característicos da doença (Adaptado de Dauer e Przedborski, 2003).

Embora a patologia de Lewy seja geralmente encontrada na SNpc, também é observada em muitos neurônios seletivamente vulneráveis em todo o sistema nervoso central (SNC) nos estágios finais da DP. Essa disseminação está associada ao desenvolvimento da Demência com Corpos de Lewy (DCL) e Demência Associada à DP (DP-D). A patologia pode afetar diversas regiões, incluindo a medula espinhal; tronco encefálico (bulbo, ponte, mesencéfalo, diencefalo); prosencéfalo basal, amígdala, bulbo olfatório; além do córtex límbico e das áreas corticais de associação de ordem superior (16–18). Além disso, a patologia de Lewy também foi identificada no sistema nervoso autônomo periférico, afetando neurônios do plexo entérico do trato

gastrointestinal, gânglios autonômicos paravertebrais, fibras nervosas simpáticas na glândula adrenal e no coração, bem como nervos cutâneos (16–18).

A levodopa, como citado anteriormente, é amplamente reconhecida por sua eficácia na melhora dos sintomas e na ampliação da expectativa de vida dos pacientes com DP. Sendo um precursor da dopamina, esse fármaco auxilia na reposição dos níveis estriatais desse neurotransmissor (13), permanecendo até os dias atuais, como o tratamento de padrão ouro para essa condição. No entanto, o uso prolongado da levodopa está associado a complicações motoras, incluindo discinesia e flutuações motoras na resposta ao medicamento (12,19). Como resultado, o desenvolvimento de terapias que possam mitigar esses efeitos adversos tornou-se uma prioridade na pesquisa sobre a DP.

Nos últimos anos, as pesquisas genéticas sobre a DP avançaram significativamente, levando à identificação de pelo menos 23 loci e 19 genes associados à patologia. Esses genes nomeados pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* como causadores da DP (19), são classificados em três principais grupos: (i) herança autossômica dominante, incluindo PARK-SNCA, PARK-LRRK2, PARK-VPS35 (20,21); (ii) herança autossômica recessiva, abrangendo PARK-PARKIN, PARK-DJ1 e PARK-PINK1 (22–24) e (iii) genes associados a formas complexas de parkinsonismo de herança monogênica, como PARK-ATP13A2, PARK-DNAJC6, PARK-SYNJ1, PARK-FBXO2 (20,21,25). Seis genes estão mais fortemente correlacionados com o desenvolvimento da DP precoce: *FBXO7*, *PINK1*, *DJ-1*, *PRKN*, *ATP13A2* e *PLA2G6*. Por outro lado, os genes *SNCA*, *LRRK2* e *VPS35* estão vinculados às formas dominantes da doença, que geralmente se manifesta após os 60 anos. Além disso, predisposições genéticas específicas podem modular a resposta do organismo a fatores ambientais, influenciando tanto o risco quanto a gravidade da DP (26,27).

Apesar dos avanços na compreensão da DP, sua fisiopatologia ainda não está completamente elucidada. Estudos sugerem que o processo degenerativo envolve uma série de mecanismos complexos, incluindo neurodegeneração progressiva, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neuroinflamação (28). No entanto, a descoberta de que a α -syn mal dobrada é um componente, bem como sua presença em estruturas neuronais alteradas como os neuritos de Lewy, transformou o entendimento da patogênese da doença (29). Essas descobertas consolidaram a

classificação da DP como uma sinucleinopatia e contribuíram para um novo modelo explicativo sobre a formação e o papel da α -syn na morte neuronal (29).

A alfa-sinucleína (α -syn) é uma proteína formada por 140 aminoácidos que apresenta repetições em tandem na região amino-terminal, permitindo sua interação com membranas lipídicas. Essa proteína é amplamente distribuída no cérebro, sendo encontrada de forma predominante nos terminais sinápticos dos neurônios, onde desempenha papel essencial no transporte vesicular e na liberação de neurotransmissores (26). Os corpos de Lewy representam a fase final de um processo celular, em que pequenos agregados iniciais de α -syn se acumulam no citoplasma neuronal. Esses agregados se fundem gradualmente, originando estruturas difusas conhecidas como corpos pálidos. Esse processo é seguido pela formação de uma "semente de agregação", que desencadeia a organização difusa da α -syn em filamentos. Esses filamentos, por sua vez, dão origem aos corpos de Lewy (30). Estudos demonstram que a superexpressão da α -syn provoca alterações mitocondriais que, por sua vez, levam à geração de radicais livres e aumento do estresse oxidativo, o que interfere na cadeia respiratória mitocondrial e contribui para a morte neuronal (31).

As mitocôndrias desempenham papel crucial na neurodegeneração da DP, sendo responsáveis pela produção de energia celular e pela regulação de sinais que determinam a sobrevivência ou degeneração celular (32). Danos sinápticos e disfunção mitocondrial são eventos iniciais na DP, associados ao aumento de espécies reativas de oxigênio, desequilíbrio de cálcio intracelular e menor produção de ATP (33).

1.2.1 poli (ADP-ribose) polimerase 1

A família de poli (ADP-ribose) - polimerases humanas (PARPs) é composta por pelo menos 17 proteínas que possuem um domínio catalítico conservado, responsável por transferir unidades de ADP-ribose para proteínas-alvo (34,35). Entre essas, as enzimas PARP1 e PARP2 se destacam como os membros mais importantes, sendo a PARP1 responsável pela maior parte da atividade enzimática, cerca de 85 – 90%.

A poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) regula diversos processos celulares, incluindo o reparo de danos no DNA, manutenção da estabilidade genômica,

proliferação celular, diferenciação e apoptose (34,36). Sua ativação está associada a doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento, contribuindo para processos patológicos como neuroinflamação, desregulação da autofagia e comprometimento da função mitocondrial (37). Na DP, a enzima PARP1 desempenha um papel crítico em diversos processos patológicos essenciais para a progressão da doença, com envolvimento na detecção de quebras no DNA, sendo essencial para a manutenção da estabilidade genômica. Sua principal função é utilizar NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) para adicionar polímeros de ADP-ribose a proteínas-alvo, promovendo a sinalização e o recrutamento de proteínas de reparo. O NAD⁺ é crucial para a função mitocondrial, especialmente nas reações da cadeia de transporte de elétrons que geram ATP.

O primeiro inibidor de PARP identificado foi a nicotinamida, um subproduto gerado durante a síntese do polímero poli (ADP-ribose) (PAR), a partir do NAD⁺ (38). Com base nessa descoberta, novos inibidores foram desenvolvidos tendo como modelo a estrutura da nicotinamida, incorporando um grupo carboxamida ligado a um anel aromático. Esses compostos atuam competindo com o NAD⁺ pelo sítio catalítico da enzima, inibindo sua atividade (38). Em 2021, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e a European Medicines Agency (EMA) aprovaram quatro inibidores de PARP como terapias para tratamento de câncer de mama e ovário: Olaparib (IC₅₀ = 13 nM), Rucaparib (IC₅₀ = 80 nM), Niraparib (IC₅₀ = 35 nM) e Talazoparib (IC₅₀ = 3 nM) (38,39).

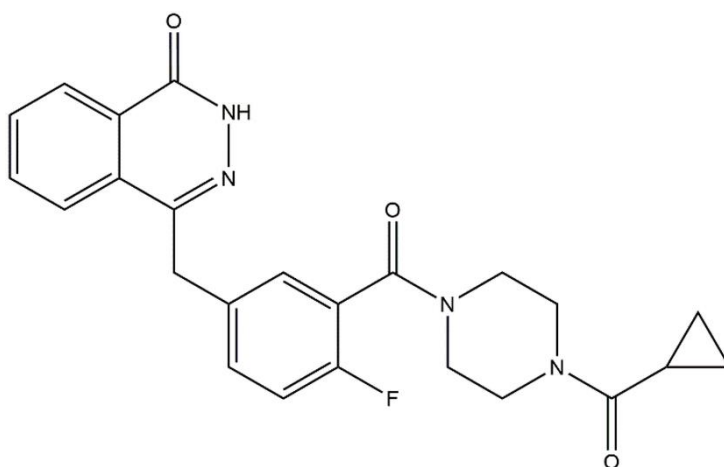


Figura 2. Representação química do inibidor farmacológico de PARP – olaparibe

1.3 CÉLULAS SH-SY5Y EXPOSTAS AO MPP+ COMO MODELO IN VITRO

Nos modelos experimentais de DP, como os induzidos pelo uso de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPP+), a enzima PARP1 desempenha papel central. O uso de MPP+ nos modelos experimentais iniciou-se com a descoberta do MPTP (1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina), marco significativo na compreensão da doença. Em 1982, um grupo de usuários de drogas sintéticas apresentou sintomas típicos da Doença de Parkinson após o consumo de uma substância desconhecida, o que levou à investigação de J. William Langston e sua equipe. A pesquisa revelou que o MPTP, uma droga ilícita, é metabolizado no corpo em MPP+ (1-metil-4-fenilpiridínio), que possui a capacidade de destruir seletivamente os neurônios dopaminérgicos na substância negra (40).

O MPTP é uma substância neurotóxica que consegue atravessar a barreira hematoencefálica e, uma vez no cérebro, é convertido em MPP+, seu composto ativo. O MPP+ penetra nos neurônios dopaminérgicos por meio do transportador de dopamina (DAT), que facilita a entrada de dopamina nas células nervosas. Dentro desses neurônios, o MPP+ interfere nos complexos I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, que são essenciais para a produção de energia celular. A inibição desses complexos resulta na redução da produção de ATP, o que compromete a função celular e contribui para a morte neuronal, um evento central na Doença de Parkinson (32). Em razão de seus impactos na cadeia respiratória, que leva à perda da função bioenergética, estresse oxidativo e comprometimento da homeostase de cálcio (41), o MPTP é atualmente considerado o "modelo padrão" para a modelagem da Doença de Parkinson em modelos animais. O MPP+ gera estresse oxidativo, causando danos aos neurônios dopaminérgicos e reproduzindo características patológicas essenciais da DP, culminando na morte celular por via dos parthanatos. Além disso, a enzima PARP1 ativada amplifica a agregação de α -syn, um dos principais marcadores neuropatológicos da DP, intensificando a neurotoxicidade do MPP+. A ativação excessiva de PARP1, induzida pelo MPP+, acelera a morte neuronal e agrava outros processos patológicos, como a desregulação da mitofagia e a neuroinflamação, contribuindo para a progressão da doença (42, 43). Sua inibição tem se mostrado uma estratégia terapêutica promissora para reduzir os danos neuronais e retardar a progressão da doença (34, 42, 43).

Na busca pela compreensão da fisiopatologia da DP e desenvolvimento de terapias mais eficazes, diversos modelos experimentais têm sido empregados. Esses modelos, que incluem tanto roedores quanto primatas não humanos, bem como culturas celulares, utilizam-se estratégias como a exposição a neurotoxinas ambientais e sintéticas ou a expressão de genes mutantes associados à DP em humanos. Além disso, muitos desses modelos têm explorado os impactos da disfunção mitocondrial, um fator central no desenvolvimento da DP.

O modelo *in vitro* mais utilizado para DP é o cultivo de linhagens celulares imortalizadas, seguidas da exposição a neurotoxinas. A linhagem celular *SH-SY5Y* é a linhagem mais utilizada para o estudo da doença. É uma sublinhagem clonada da linha *SK-N-SH*, derivada originalmente de um neuroblastoma metastático de medula óssea de uma criança de 4 anos em 1970 (44). Apresenta uma morfologia mista, com propriedades de crescimento tanto em aderência quanto em suspensão. Essa linhagem celular tem sido amplamente usada como modelo de neurônios desde o início dos anos 1980. Isso se deve ao fato de possuírem muitas propriedades bioquímicas e funcionais de neurônios, apresentando capacidade para sintetizar dopamina (DA) e noradrenalina (NA) por expressarem as enzimas tirosina-hidroxilase e dopamina- β -hidroxilase (45). Além disso, expressam o transportador de dopamina (DAT), uma proteína exclusiva dos neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso central, essencial para a regulação da homeostase da dopamina, por meio de sua recaptação e armazenamento específicos. Como o DAT é indispensável para a incorporação de MPP⁺ nos neurônios, as células *SH-SY5Y* têm sido amplamente empregadas no estudo dos mecanismos de neurotoxicidade induzida por MPP⁺ e da patogênese associada aos mimetizadores da DP (45,46).

1.4 MIRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, composto 22 nucleotídeos. Esses reguladores pós-transcricionais desempenham papéis cruciais na regulação da expressão gênica. Estima-se que até 40% das sequências codificadoras de miRNAs em mamíferos estejam localizadas em íntrons — conhecidos como miRtrons — e exons de genes que codificam diversas proteínas. Além disso, aproximadamente 10% dos miRNAs encontram-se em íntrons de

transcrições longas de RNAs não codificantes (ncRNAs), ressaltando sua ampla distribuição e importância funcional no genoma. Até agora, quase 2.000 moléculas de miRNA foram caracterizadas no *Homo sapiens* (47).

O processo biológico natural dos microRNAs tem início no núcleo celular, onde o miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito pela RNA polimerase II, a partir de regiões intergênicas ou intrônicas de genes alvo. O pri-miRNA é então identificado pelo complexo enzimático Drosha/DGCR8, que o processa em um precursor de miRNA (pre-miRNA) com estrutura característica de hairpin (48). O pre-miRNA é posteriormente transportado para o citoplasma pela exportina-5, onde passa por uma etapa final de maturação realizada pela enzima Dicer. Essa etapa resulta em um duplex de RNA de cerca de 22 nucleotídeos. O duplex é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual a proteína Argonauta (AGO) separa as duas fitas do miRNA, descartando a fita sense e mantendo apenas a fita guia (49,50). Essa fita guia direciona o complexo RISC ao RNA mensageiro (RNAm) alvo, promovendo a ligação à região 3' não traduzida (3'UTR) do RNAm. Esse acoplamento desencadeia a redução da estabilidade do RNAm e inibe sua tradução, em um processo conhecido como silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (48).

Tal mecanismo é indispensável para a regulação de processos celulares fundamentais, além de estar diretamente envolvido em funções fisiológicas e em condições patológicas, incluindo o desenvolvimento celular e a progressão de doenças neurodegenerativas (51,52).

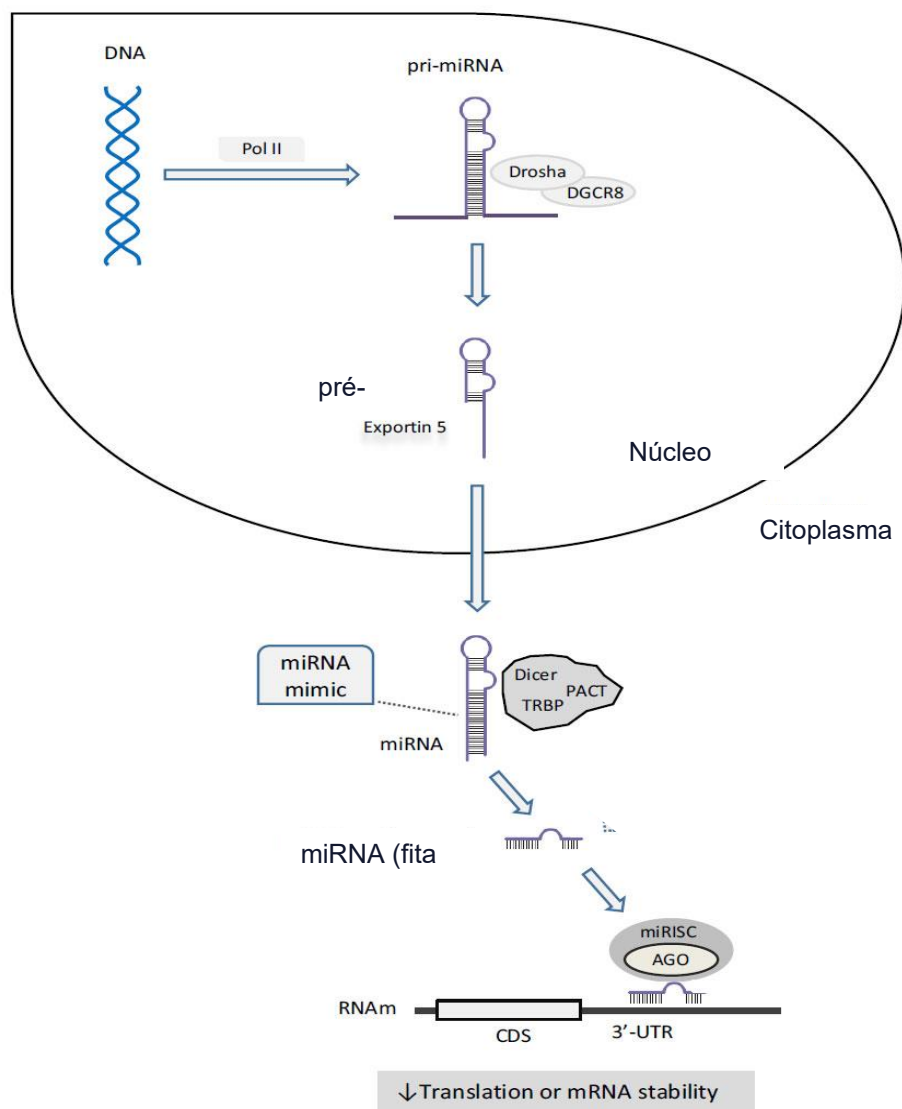


Figura 3. Biogênese de microRNAs e mecanismo de regulação de mRNA por imitadores sintéticos miRNA mimic (adaptada). Os microRNAs primários são transcritos pela RNA polimerase II e processados pelo complexo Drosha/DGCR8, formando os pre-miRNAs. A seguir, são transportados para o citoplasma via exportina 5, sendo posteriormente clivados pela Dicer para a formação dos microRNAs maduros. Os microRNAs, por sua vez, se ligam ao complexo RISC para identificação do RNA mensageiro alvo. O miRNA neste momento em fita simples acopla-se de forma parcial à região 3'-UTR do RNAm mediante pontes de hidrogênio, diminuindo a sua tradução ou estabilidade. Tal fenômeno é denominado silenciamento gênico (48).

1.5 PAPEL NEUROPROTETOR DO MIR-7 NA DOENÇA DE PARKINSON

A regulação pós-transcricional da α -Sinucleína tem se consolidado como um fator crucial no controle de sua expressão, com os miRNAs desempenhando um papel central nesse processo. Dentre eles, o miR-7 se destaca por sua capacidade de regular negativamente os níveis de α -syn. Estudos recentes têm evidenciado que a redução dos níveis de miR-7 em modelos celulares e animais expostos ao MPTP contribui diretamente para o aumento do acúmulo de α -Syn, sugerindo que o miR-7 desempenha uma função protetora essencial na prevenção da formação de agregados tóxicos dessa proteína (53,54). Além disso, a reposição do miR-7 não apenas resulta na diminuição dos níveis de α -syn, mas também exerce um efeito neuroprotetor, ao mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo e pela disfunção do proteassoma, processos amplamente envolvidos na neurodegeneração (53). A evidência de que os níveis de miR-7 estão reduzidos na substância negra de pacientes com DP reforça a hipótese de que a depleção desse miRNA está diretamente associada à perda de neurônios dopaminérgicos, à diminuição da dopamina e ao acúmulo exacerbado de α -Sinucleína (55). Dessa forma, a modulação da expressão de miRNAs, como o miR-7, surge como uma estratégia terapêutica promissora para regular a α -syn e mitigar os danos neuronais característicos da DP (53).

O miR-7 está envolvido na regulação de genes associados ao estresse oxidativo e à apoptose neuronal, processos fundamentais na patogênese da DP. O miR-7 pode modular a expressão da enzima PARP1, reduzindo sua atividade e, consequentemente, protegendo os neurônios dopaminérgicos da degeneração característica da DP. Essa interação sugere que terapias baseadas na modulação do miR-7 e da enzima PARP1 podem oferecer novas abordagens para retardar a progressão da DP (34,48).

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 GERAL

Investigar a expressão da enzima PARP1 e do microRNA-7 na injúria de células SH-SY5Y por MPP+.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1 Padronizar o modelo *in vitro* de injúria por MPP+ e analisar a viabilidade celular pelos métodos de MTT e CCK8.
- 2 Avaliar as alterações na expressão relativa da enzima PARP1 células SH-SY5Y expostas ao MPP+.
- 3 Analisar as variações na expressão de miR-7 em células SH-SY5Y submetidas a injúria por MPP+.
- 4 Investigar se a enzima PARP1 exerce papel na injúria de células SH-SY5Y, mediante inibição farmacológica com olaparibe.
- 5 Identificar o impacto da reposição de miR-7 na viabilidade de células SH-SY5Y expostas ao MPP+.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas células da linhagem de neuroblastoma humano *SH-SY5Y*, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Figura 4). A linhagem foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* + F12 (DMEM/F12, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 1% de GlutaMAX (Gibco) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

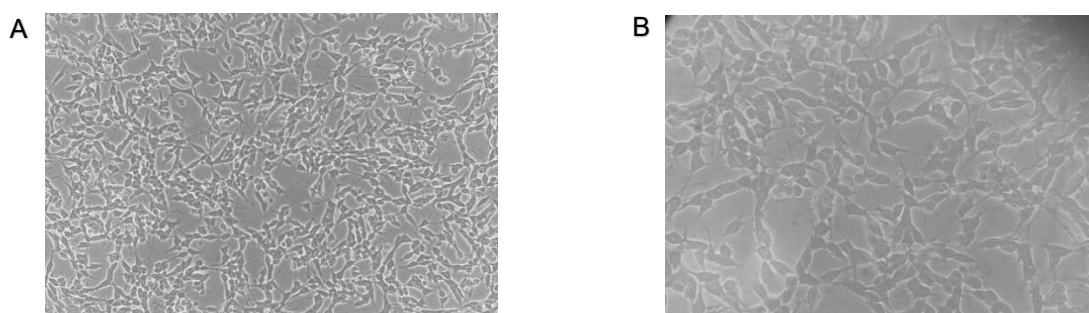


Figura 4. Microscopia de linhagem celular SH-SY5Y utilizada no presente estudo. Imagens capturadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100), (A) Aumento de 40X e (B) Aumento de 20X.

As células foram inicialmente cultivadas em frascos específicos para cultivo celular (25 cm² ou 75 cm²), até atingirem uma confluência de 70% a 90%. Em seguida, foram lavadas duas vezes com tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline, Laborclin Ltda.*) e descoladas com solução de Tripsina/EDTA 0,25% (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*) por 3 minutos a 37°C. Para inativação da tripsina, adicionou-se um volume equivalente de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (*SFB, Gibco, Thermo Fisher Scientific*).

As células foram transferidas para um tubo de polipropileno e submetidas à centrifugação a 300×g por 3 minutos. Em seguida, o pellet celular foi ressuspensionado em PBS e as células foram quantificadas utilizando a Câmara de Neubauer. A contagem de células viáveis foi empregada para determinar a densidade celular adequada aos ensaios experimentais deste estudo.

3.2 INJÚRIA COM MPP+ PARA PADRONIZAÇÃO DE MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON

A toxina 1-Metil-4-fenilpiridínio iodeto (MPP+) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*) foi inicialmente dissolvido em água Milli-Q para a preparação de uma solução estoque a 50 mM. A partir dessa solução, foram realizadas diluições sucessivas em meio DMEM/F12 para obtenção das concentrações finais utilizadas nos ensaios funcionais subsequentes, pelos métodos de MTT e CCK-8.

3.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

O ensaio MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil brometo de tetrazolina*) baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzir os sais de tetrazólio (amarelo) ao produto formazan (púrpura), por meio da atividade de enzimas mitocondriais, permitindo a quantificação indireta da viabilidade celular a partir dos valores de absorbância.

Para os ensaios de MTT foram semeadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em placas de poliestireno de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Após esse período, as células foram tratadas com MPP+, nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM. Os tratamentos foram mantidos por 24h para avaliação da resposta celular, em seguida, o meio de cultura foi substituído por 150 µL de solução contendo 0,5 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, permitindo a formação dos cristais de formazan.

Após a incubação, os cristais de formazan foram solubilizados em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para a normalização dos resultados, foram adicionados 150 µL de DMSO aos poços sem células, que serviram como controles “brancos”. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas Varioskan LUX multimodal plate reader (Thermo Fisher Scientific), utilizando o comprimento de onda de 595 nm e os dados foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular, em relação ao valor obtido no grupo controle sem tratamento.

3.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CCK8

O ensaio *Cell Counting Kit-8* (CCK-8, *Sigma-Aldrich*) foi empregado por ser um método sensível e conveniente, permitindo a detecção precisa da atividade metabólica celular. Este ensaio avalia indiretamente a viabilidade das células com base em sua atividade metabólica, utilizando o composto WST-8, um tetrazólio solúvel em água, que é reduzido por desidrogenases presentes em células metabolicamente ativas. A redução do WST-8 gera o composto formazan, de coloração alaranjada, cuja intensidade é proporcional à quantidade de células viáveis. A produção de formazan reflete a atividade metabólica celular, proporcionando uma estimativa precisa do número de células vivas no momento da análise.

Para os ensaios de viabilidade celular utilizando o método de CCK-8, foram semeadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em placas de poliestireno de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Após este período, as células foram tratadas com MPP+ nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM e 2 mM, para avaliar a viabilidade celular em resposta ao tratamento nas condições experimentais. Decorridas 24 horas, foi adicionada 10% do volume total de CCK-8 por poço, o que corresponde a 10 μ L. As placas foram, então, incubadas por 4 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂) e em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 450 nm. Os valores de absorbância dos grupos experimentais foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle.

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão gênica foi realizada sob as mesmas condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular por CCK-8, permitindo correlacionar a expressão de PARP1 e miR-7 com a viabilidade das células. Para isso, $2,5 \times 10^4$ células foram semeadas por poço em placas de poliestireno de 6 poços, utilizando três poços para cada unidade experimental. Após os tempos de tratamento estabelecidos, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Os pellets celulares foram ressuspensos em tampão PBS, novamente centrifugados, e, após o descarte do sobrenadante, armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

3.5.1 Extração e quantificação

Para os ensaios que avaliaram a expressão de miRNAs, o RNA foi extraído e purificado a partir dos pellets de células SH-SY5Y utilizando o kit *mirVana miRNA Isolation* (Applied Biosystems). Para os ensaios de expressão relativa de PARP1, o RNA total foi extraído dos pellets utilizando o *RNeasy Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da utilização.

A quantificação foi realizada pelo método fluorométrico, utilizando o reagente *Qubit microRNA Assay Kit* (Invitrogen) para miRNAs e *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen) para RNA total, em tubos translúcidos específicos para essa finalidade, com as leituras efetuadas no equipamento *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

3.5.2 RT-qPCR

A análise da expressão gênica foi conduzida por PCR em tempo real (qPCR), precedida pela síntese de cDNA através da transcrição reversa (RT), ambas realizadas no mesmo dia. As amostras de RNA foram previamente diluídas em água livre de RNase até uma concentração de 20 ng/μL, padronizando os ensaios e garantindo a quantidade máxima de material necessária pelo kit de transcrição reversa (10 ng em 5 μL).

3.5.3 Expressão de miRNAs por RT qPCR via sistema TaqMan

Nos ensaios de expressão de miRNAs, a síntese de cDNA foi realizada com o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) e a qPCR foi realizada utilizando o *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems), juntamente com iniciadores específicos (*primers*) para os miRNAs em estudo (*TaqMan MicroRNA Assay* - Applied Biosystems), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de expressão de miRNAs.

Nome do ensaio	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
hsa-rnu24	ATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGACATTTTAAACCA CCAAGA
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

Inicialmente, preparou-se uma única solução para todas as reações, com as seguintes quantidades por reação: 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*), sendo submetidas aos seguintes tempos e temperaturas: 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.

Para a realização da qPCR, foram preparadas soluções independentes para cada gene alvo, contendo os seguintes reagentes e quantidades por reação: 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. Dessa solução, 9,34 µL foram transferidos para placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL, Applied Biosystems*), e 0,67 µL de cDNA foram adicionados, totalizando 9,34 µL por reação. As placas foram seladas com filme adesivo (*MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems*), centrifugadas (*Mini Plate Spinner, Labnet*) e submetidas ao termociclador (*QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR 35 System, Applied Biosystems*).

Os ciclos de amplificação adotados foram: 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. Cada ensaio foi realizado com amostras em triplicata técnica, incluindo um RNA de referência (endógeno) para normalização dos resultados e um controle negativo NTC (no-template control), que continha todos os reagentes, exceto o cDNA, substituído por água livre de nuclease.

3.5.4 Expressão relativa de PARP1 via sistema SYBRgreen

Nos ensaios de expressão relativa de PARP1, a síntese de cDNA foi realizada com o kit SuperScript First-Strand Synthesis System (Applied Biosystems) e a qPCR com Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As informações referentes aos primers utilizados nesta etapa, bem como as sequências, estão detalhadas na tabela 2.

Para cada reação de transcrição reversa, foi utilizado 10 µg de RNA total, com os seguintes reagentes: 8 µL de RNA total, 1 µL de dNTPs e 1 µL de Oligo (dT). A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, transferida para gelo por 1 minuto. Posteriormente, foi preparado o mix de reação, contendo 2 µL de tampão 10X RT Buffer, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de DTT e 1 µL de RNaseOUT. A solução foi incubada a 42°C por 2 minutos antes da adição de 1 µL da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase*. No controle negativo, a enzima foi substituída por água livre de RNase. A reação de transcrição reversa foi realizada nas seguintes condições térmicas: 42°C por 50 minutos, seguido de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Após a finalização do protocolo, o cDNA foi diretamente utilizado nas reações de qPCR.

Após a síntese do cDNA, as reações de qPCR foram realizadas: com as seguintes quantidades por reação: 10 µL de *Fast SYBR Green Master Mix* (2X), 6,6 µL de água livre de nuclease, 0,7 µL de primer forward e 0,7 µL de primer reverse específico para o gene alvo (*PARP1*, *GAPDH*, *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 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Cada reação foi realizada em triplicata técnica, e um controle negativo (NTC - No Template Control) foi incluído, utilizando água livre de nuclease no lugar do cDNA. Para a normalização dos resultados, utilizou-se o gene *GAPDH* como referência endógena devido à sua expressão estável entre os grupos experimentais.

Os resultados foram avaliados com base na média dos valores dos ciclos de quantificação de cada amostra (Cq ou Ct), e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados foram inicialmente normalizados pela variação do Ct do alvo em relação ao Ct do RNA de referência, obtendo-se o ΔCt . O valor de ΔCt de

cada grupo experimental foi posteriormente comparado com o ΔCt do grupo controle negativo não tratado (CN), obtendo-se o $\Delta\Delta Ct$. Este valor de $\Delta\Delta Ct$ foi utilizado para o cálculo da expressão relativa, mediante a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que contempla a expressão logarítmica por duplicação do cDNA a cada ciclo de amplificação, e o sinal negativo que ajusta a relação inversa entre o valor de Ct e o conteúdo de RNA na amostra em teste.

Tabela 2. Alvos utilizados nos ensaios de expressão gênica da enzima PARP1.

Sigla	Sequência	Fornecedor
PARP1	For.:5'-GAGTGGATGAAGTGGCGAAG-3' Rev.: 5'-CAGGTCGTTCTGAGCCTTTAG-3'	Invitrogen
GAPDH	For.:5'-CTCCTGTTCGACAGTCAGCC-3' Rev.: 5'-CCCAATACGACCAAATCCGTTG-3'	Invitrogen
GPB1	For.:5'-TCACTTGAGGCAGAACACAGA-3' Rev.: 5'-AGCACATGTTTCCATTTTCAC-3'	Sigma

3.6 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PARP COM OLAPARIBE

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂, por 24 horas para permitir a adesão. O tratamento com olaparibe (AZD2281, Selleckchem) foi realizado diluindo-se inicialmente o composto em DMSO e, posteriormente, em meio DMEM/F12, de forma a atingir as concentrações finais 0,025 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 5 µM; 30 µM e 60 µM, garantindo que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,1%. As células foram incubadas por 48 horas sob essas condições.

Em seguida, foi realizada a injúria com MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridínio, Sigma-Aldrich), previamente diluído em meio DMEM/F12, nas concentrações finais de 1 mM e 2 mM. O MPP⁺ foi adicionado diretamente aos poços, e as células permaneceram incubadas por mais 24 horas. Ensaios adicionais foram conduzidos para avaliar o efeito citotóxico isolado do olaparibe. Nesses ensaios, as células foram tratadas com

olaparibe nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente e incubadas por 48 horas, sem a adição de MPP+.

Tabela 3. Grupos experimentais dos ensaios com olaparibe.

Grupo	Tratamento
Controle	Meio DMEM/F12 sem tratamento
Células + MPP+	2 mM MPP+
Olaparibe	Olaparibe + MPP
Olaparibe + DMSO	Olaparibe + DMSO + MPP+

Após 24 horas da adição de MPP+, foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando o *kit Cell Counting Kit-8* (CCK-8, Sigma-Aldrich). Para isso, 10 µL da solução de CCK-8 foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas por 4 horas sob condições controladas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 450 nm, e os dados foram normalizados em relação ao MPP+. Cada grupo experimental foi constituído por três amostras biológicas independentes, realizadas em triplicata técnica.

3.7 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOTTING

3.7.1 Desenho experimental e quantificação de proteínas

Para a extração de proteínas, foram seguidas as mesmas condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular, utilizando as concentrações de 1 mM e 2 mM de MPP+, por um período de 24 horas. Este ensaio permitiu a análise do conteúdo da proteína *PARP1* em relação às proteínas totais.

Foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de poliestireno de 6 poços, utilizando três poços para compor cada unidade experimental. Após o período de incubação e tratamento, utilizou-se tampão RIPA com inibidor de protease na proporção de 1:20, adicionando 300 µL de tampão de lise por poço. As células foram incubadas por 5 minutos no gelo e, posteriormente, raspadas e transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. A clarificação foi realizada por centrifugação a 8.000 g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar os restos celulares. O sobrenadante,

contendo as proteínas solúveis, foi cuidadosamente transferido para alíquotas de 100 µL e armazenado a -80°C até o momento da quantificação e análise.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford, que é baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 às proteínas, resultando em um complexo corante-proteína que absorve luz a 595 nm. Para este ensaio, foi utilizado o Kit de Quantificação de Proteínas Bradford (Sigma-Aldrich). Foram pipetados 5 µL de cada amostra diluída 1:2 e 195 µL do reagente Bradford em cada poço de uma placa de 96 poços. Uma curva de calibração foi construída utilizando Albumina Bovina (BSA) diluída em água destilada, nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL. A absorbância foi medida utilizando o leitor de microplacas Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) a um comprimento de onda de 595 nm. Os valores obtidos foram comparados com a curva de calibração para determinar a concentração de proteínas nas amostras.

Tabela 4. Grupos experimentais dos ensaios de western blotting.

Siglas	Grupo	Condições experimentais
I	Controle	Células com meio de cultura
II	MPP+ 1 mM	Células tratadas com MPP+
III	MPP+ 2 mM	Células tratadas com MPP+

3.7.2 Western blotting

Para avaliar a expressão da proteína PARP1 nas células injuriadas com MPP+, foi empregada a técnica de Western Blotting, seguindo os passos descritos a seguir.

3.7.3 Separação e Transferência de Proteínas

As proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE a 12%, na presença de tampão Tris-glicina 1x, voltagem de 50 e 100V por 120 minutos. Após a separação das proteínas, as mesmas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra, Nitrocellulose, Supported, 0. 45 Micron, 20cm x 3m, Roll, utilizando um sistema de transferência semi-seco. A transferência foi realizada por 30 minutos a 15 V, 350 mA e 100 W. Foi utilizada uma quantidade de 24 µg de proteínas totais por

amostra. As proteínas foram desnaturadas na solução de Laemmli, composta por 10% glicerol, 2% SDS, 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8) e 0,002% azul de bromofenol, a 37°C por 15 minutos, antes de serem aplicadas nos poços do gel.

3.7.4 Bloqueio e Incubação com Anticorpos

As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 2 horas em solução de bloqueio contendo 1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado, sob agitação constante, para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário a 24°C por 1h30, também sob agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBST 1x, cada lavagem com duração de 10 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente, seguidas por mais três lavagens de 10 minutos cada. Os anticorpos utilizados foram:

- a) ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody – NA931V
- b) ECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody – LNA934V/AG
- c) PARP1 Rabbit PolyAb – CatNo: 13371-1-AP
- d) Anti-B actina – A3854

3.7.5 Detecção

As membranas foram expostas ao reagente de quimioluminescência (ECL) por 5 minutos, sendo a leitura realizada utilizando equipamento específico para este fim. Após a leitura por ECL, as imagens foram analisadas por densitometria utilizando o software ImageJ. Esta análise permitiu a quantificação precisa das bandas de proteína, proporcionando dados quantitativos para a comparação da expressão da proteína PARP1 entre as amostras com e sem injúria po MPP+.

3.8 TRANSFEÇÃO CELULAR COM IMITADORES SINTÉTICOS DE MICRORNAS (MIMICS)

Os ensaios funcionais com imitadores sintéticos de miRNAs (mimics), avaliados isoladamente, foram conduzidos com base nos grupos experimentais detalhados na tabela 5.

Tabela 5. Grupos e condições experimentais do ensaio funcional de transfecção.

Grupo	Sigla	Condições Experimentais
I	Controle	Células + DMEM
II	Modelo	Células + MPP+
III	SCRB	Células + scramble mimic 50 nM + MPP+
IV	miR-7	Células + miR-7 mimic 50 nM + MPP+

A transfecção foi realizada 24 horas após o plaqueamento das células, quando estas atingiram uma confluência entre 30% e 50%, conforme as recomendações do fabricante do reagente de transfecção (*INTERFERin*, *Polyplus-transfection*). Este reagente é um polímero catiônico em solução hidroalcoólica, desenvolvido para proporcionar alta eficiência de transfecção com baixas concentrações de miRNAs e baixa toxicidade celular.

Os oligonucleotídeos utilizados foram o *miR-7 mimic (hsa-miR-7-5p miRCURY LNA miRNA Mimic, Qiagen)* e o *mimic Controle Negativo - Scramble (Negative Control miRCURY LNA miRNA Mimic)* que possui uma sequência aleatória de nucleotídeos, conforme detalhado na Tabela 3. Os produtos liofilizados foram dissolvidos em água livre de nucleases e aliquotados a 5 µM para a preparação das soluções estoque. Estas soluções foram devidamente aliquotadas e armazenadas de acordo com as especificações do fabricante.

Para os ensaios de viabilidade celular, realizados em placas de 96 poços, os miRNAs mimic foram diluídos a uma concentração final de 50 nM em 50 µL de meio *Opti-MEM (Gibco)* e misturados com 0,5 µL de *INTERFERin* para a formação do complexo de transfecção. A fim de minimizar a variabilidade intra-ensaio, preparou-se uma solução única para todos os poços do mesmo grupo experimental. A mistura foi

homogeneizada em vórtex por 10 segundos e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a formação dos complexos. Durante esse período, o conteúdo dos poços foi substituído por 100 µL de meio de cultura fresco, pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, 50 µL do complexo de transfecção foram adicionados aos poços designados para os grupos tratados com miRNAs, enquanto os poços do grupo controle receberam 50 µL de *Opti-MEM*, totalizando um volume de 150 µL por poço.

Tabela 6. Imitadores sintéticos utilizados no estudo.

Imitador sintético	Sequência da fita guia (guide strand)	Fabricante
Hsa-miR7	5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU-3'	Qiagen
Scramble	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	Qiagen

O tratamento *com* MPP⁺ foi realizado 48 horas após a transfecção com os miRNAs mimic. O MPP⁺ foi dissolvido em meio *DMEM/F12* na concentração final de 2 mM, escolhida com base nos resultados da curva de dose-resposta realizada previamente no mesmo estudo. Decorridas 24 horas do tratamento, a viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de CCK-8, conforme o protocolo descrito anteriormente.

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DOSE RESPOSTA DE MPP⁺

Inicialmente procurou-se definir a concentração de MPP⁺ para estabelecimento do modelo *in vitro* representativo da Doença de Parkinson (DP), com a linhagem celular SH-SY5Y. As células foram expostas às concentrações crescentes de MPP⁺ de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM, com período de exposição de 24 horas.

A análise inicial de viabilidade celular, avaliada por meio do ensaio de MTT, resultou em uma redução significativa da viabilidade, de forma dose-dependente, em relação às células não expostas ao MPP⁺ do grupo controle. Para a menor concentração avaliada (0,25 mM), a viabilidade celular foi reduzida para 87%, enquanto as concentrações crescentes de 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM resultaram em reduções da viabilidade para 81%, 59%, 34% e 15%, respectivamente. A

diminuição progressiva da viabilidade confirma a toxicidade do MPP⁺ e sua capacidade de induzir injúria celular no modelo *in vitro*. Esse comportamento foi considerado ideal para o estabelecimento do modelo, pois possibilitou a indução da injúria sem causar morte celular massiva nas doses intermediárias, viabilizando as análises funcionais subsequentes.

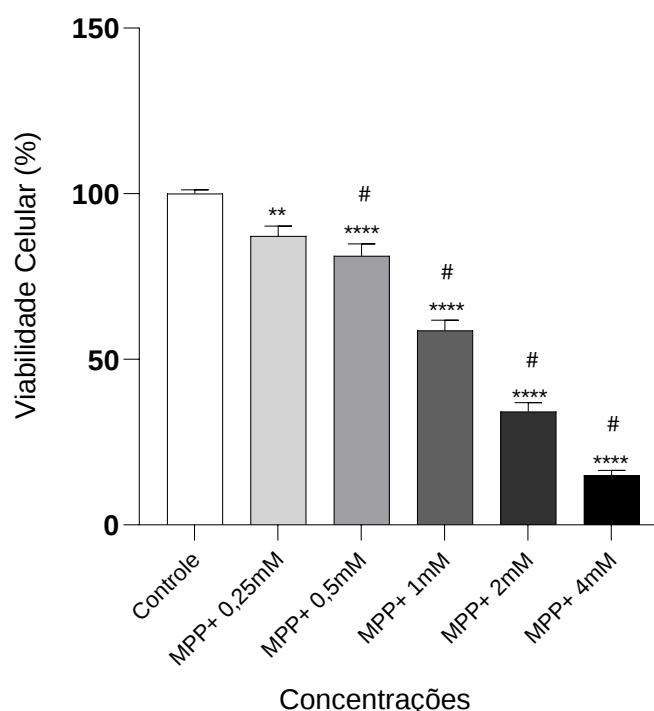


Figura 5. Viabilidade celular em linhagem SHSY5Y após injúria com MPP⁺ MTT. Viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y após injúria com MPP⁺, controle e nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM. A injúria com MPP⁺ reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente e foram observadas reduções para 87%, 81%, 59%, 34% e 15% de viabilidade, respectivamente, apresentando diferença significativamente estatística entre elas (# $p < 0,0001$). Foram realizados quatro ensaios independentes, com três a quatro replicatas por ensaio. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste Tukey. Diferenças estatisticamente significativas foram marcadas em relação ao controle (** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

Com o objetivo de validar os resultados obtidos no ensaio de MTT e devido à necessidade de uma abordagem mais sensível, foi realizado um segundo ensaio pelo método de CCK8, para avaliar a viabilidade celular após a injúria com MPP⁺. Enquanto o MTT é amplamente utilizado e confiável, o CCK8 é mais adequado para quantificação rápida e precisa, além de permitir a análise em condições que podem envolver pequenas diferenças de resposta celular. Isso o torna mais relevante para o objetivo do estudo, que se concentra em detectar variações discretas em possíveis tratamentos neuroprotetores.

Ao comparar os resultados obtidos nos ensaios com CCK8 aos obtidos com MTT, observou-se coerência entre os dois métodos, demonstrando uma redução significativa na viabilidade celular de forma dose-dependente. A exposição ao MPP+ nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM e 2 mM resultou em reduções de viabilidade celular para 82%, 75%, 67% e 56%, respectivamente, apresentando diferença estatisticamente significativa entre elas. Além disso, a análise estatística evidenciou diferenças significativas em todas as concentrações testadas em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), reafirmando a toxicidade do MPP+ em diferentes concentrações.

Com base nos resultados obtidos, as concentrações de 1 mM e 2 mM foram selecionadas como condições ideais para a indução da injúria nos ensaios subsequentes, destinados à investigação de outras hipóteses experimentais. Essas concentrações promoveram reduções moderadas na viabilidade celular, de 67% e 56%, conforme quantificado pelo ensaio CCK-8, sem induzir morte celular massiva.

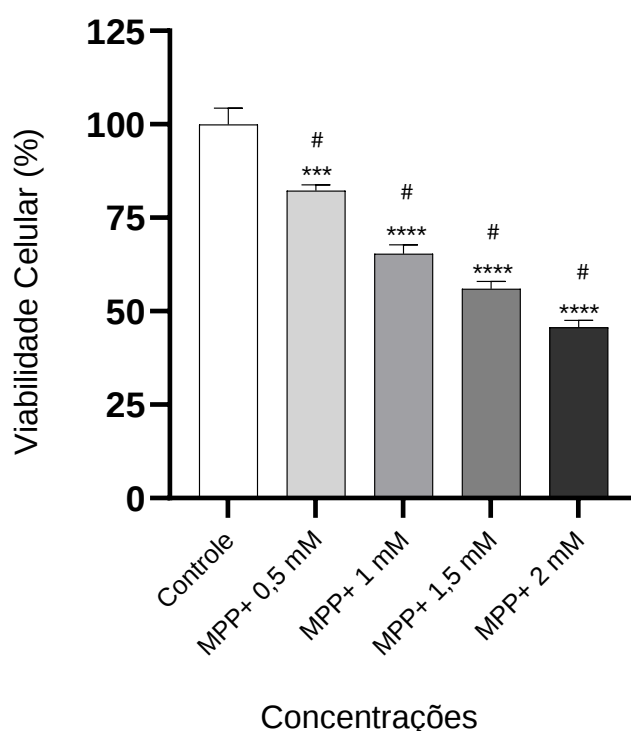


Figura 6. Viabilidade celular da linhagem SH-SY5Y após injúria com MPP+ nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM e 2 mM, CCK8. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio CCK8, após o tratamento com diferentes concentrações de MPP+. Observou-se uma redução significativa na viabilidade celular, de forma dose-dependente, entre as diferentes concentrações de MPP+ a viabilidade foi reduzida para 82%, 65%, 55% e 45%, respectivamente (# $p < 0,0001$). Foram realizados quatro ensaios independentes, com três a quatro replicatas por ensaio. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste Tukey. Diferenças estatisticamente significativas foram marcadas em relação ao controle (*** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

4.2 EXPRESSÃO RELATIVA DE PARP1 EM CÉLULAS EXPOSTAS AO MPP+

Para investigar o papel da enzima PARP1 no modelo de neurotoxicidade induzida pelo MPP+, foi avaliada a expressão relativa do gene PARP1 por meio RT-qPCR, em células SH-SY5Y expostas às concentrações de 1 mM e 2 mM de MPP+. Os resultados mostraram uma redução na expressão de PARP1 em relação às células não expostas ao MPP+, em ambas as condições experimentais, com uma redução de 0,86 na concentração de 1 mM e 0,79 na concentração de 2 mM. Apesar dessa tendência de redução, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, conforme determinado pela análise de ANOVA de uma via.

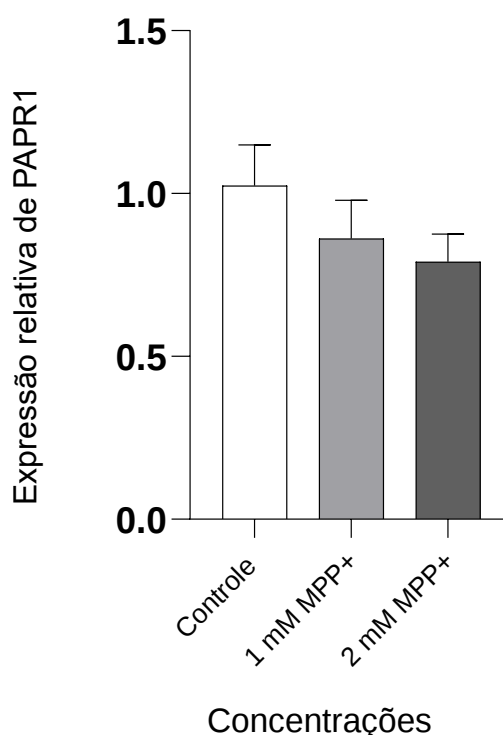


Figura 7. Expressão da enzima PARP1 em SHSY5Y após injúria com MPP+. A expressão da enzima PARP1 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+ foi de 0,86 em 1 mM e 0,79 em 2 mM, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Foram realizados três ensaios independentes. Ensaios de RT-qPCR, normalizados pelos genes de referência GAPDH e GPB1. Expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e dados analisados por ANOVA de uma via.

4.3 ENSAIO PILOTO DA PROTEÍNA PARP1

A expressão da proteína PARP1 foi avaliada por Western Blotting, em células SH-SY5Y expostas ao MPP+, nas concentrações de 1 mM e 2 mM. As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria com o software *ImageJ* e normalizadas com o controle interno β -actina. Observou-se um aumento nos níveis da proteína PARP1 em ambas as concentrações de MPP+, em comparação ao controle. Além disso, nas amostras tratadas com MPP+ a 2 mM é possível observar bandas adicionais abaixo da banda principal o que pode indicar a presença da forma clivada da proteína. A clivagem da enzima PARP1 é um marcador clássico de apoptose e ocorre pela ação de caspases, gerando um fragmento menor da proteína, evidenciado por essas bandas mais finas. Esse achado sugere que a exposição ao MPP+ pode ter induzido um aumento na clivagem da enzima PARP1, especialmente na concentração mais elevada.

A β -actina foi utilizada como controle interno para garantir que as variações observadas na expressão da enzima PARP1 não fossem decorrentes de diferenças na quantidade total de proteína carregada nos poços. As bandas de β -actina apresentaram intensidade homogênea entre as amostras, confirmando a adequada normalização dos resultados.

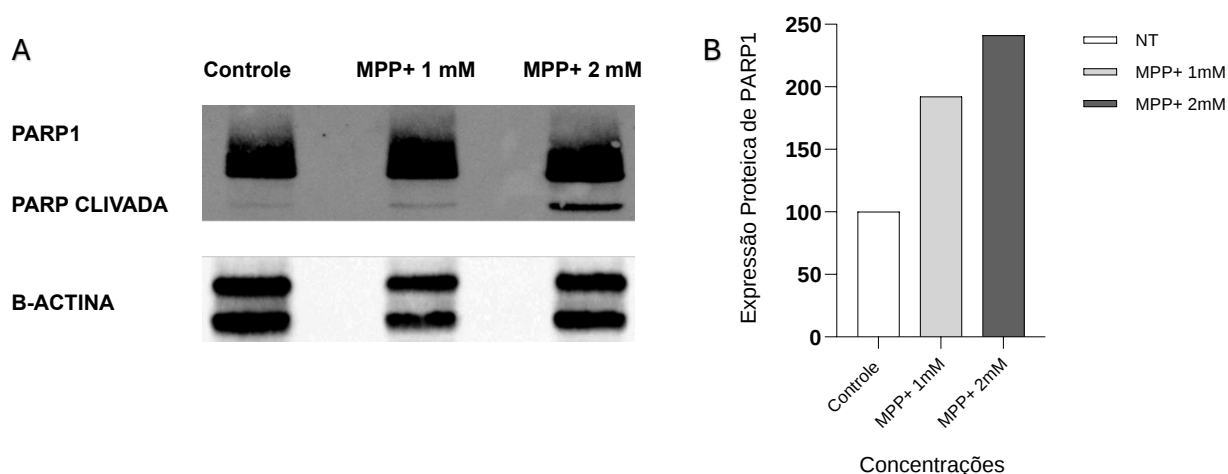


Figura 8. Expressão da proteína PARP1 em células SH-SY5Y expostas ao MPP+, nas concentrações de 1 mM e 2 mM, avaliadas por Western Blotting. A) Observou-se um aumento na expressão de PARP1 nos grupos tratados com MPP+ em comparação ao controle. Na concentração de 2 mM, bandas adicionais abaixo da PARP1 indicam a presença da sua forma clivada. β -actina foi utilizada como controle interno. (B) Resultados expressos em porcentagem relativa ao controle (100%). Observou-se um aumento progressivo na expressão de PARP1 com a exposição ao MPP+, sendo de 192% para 1 mM e 241% para 2 mM, em comparação ao controle. Os dados sugerem uma indução da expressão de PARP1 em resposta à toxicidade do MPP+ e aumento da forma clivada da proteína, com destaque para a concentração de 2 Mm (n=1).

Os resultados preliminares foram considerados promissores, enfatizando a importância da realização de experimentos com maior número de réplicas biológicas, para melhor robustez das análises estatísticas.

4.4 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PARP

Para investigar o papel funcional de PARP1 no modelo *in vitro* de doença de Parkinson, as células SH-SY5Y foram tratadas com o inibidor farmacológico de PARP, olaparibe, nas concentrações de 0,025 μM ; 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,2 μM ; 5 μM ; 30 μM e 60 μM . Observou-se que as concentrações inferiores a 60 μM foram capazes de proteger, de forma significativa, as células contra a morte celular induzida pelo MPP+, sugerindo um efeito neuroprotetor dose dependente. Contudo, na concentração 60 μM , os mesmos efeitos protetivos do olaparibe não foram observados, indicando possível toxicidade ou limitação do mecanismo protetor em concentrações mais altas.

Esses resultados demonstram o potencial do olaparibe como agente neuroprotetor em concentrações específicas, sugerindo que a inibição da enzima PARP pode modular positivamente a viabilidade celular no modelo de injúria por MPP+ em células SH-SY5Y. Estudos futuros devem focar nos mecanismos moleculares subjacentes à proteção mediada por olaparibe, com ênfase nas vias de sinalização associadas à reparação de DNA e ao controle do estresse oxidativo.

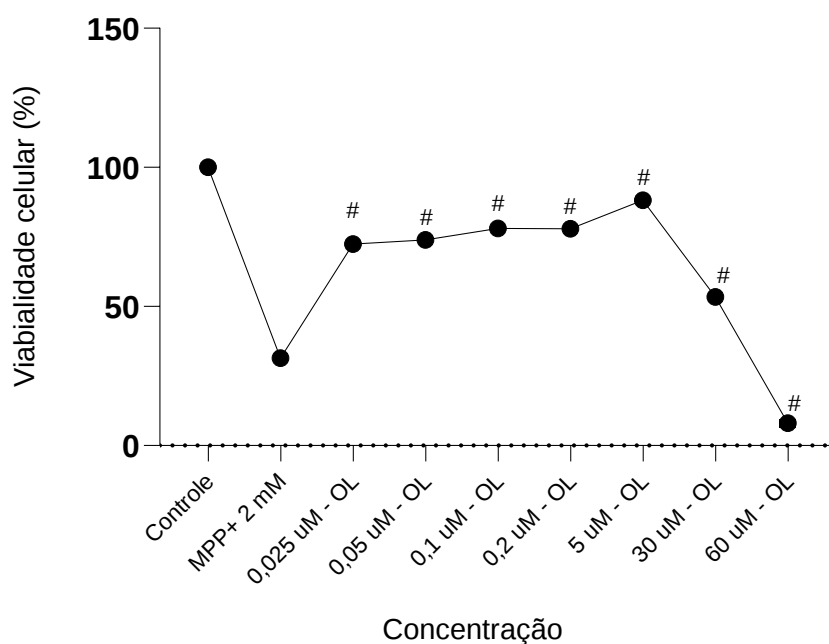


Figura 9. Viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y após tratamento com olaparibe e injúria com MPP+. A avaliação da viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y após tratamento com o inibidor farmacológico olaparibe e injúria induzida por MPP+ a 2 mM demonstrou variações significativas nos diferentes grupos experimentais. No grupo em que as células foram expostas apenas ao MPP+, observou-se uma redução acentuada na viabilidade celular, atingindo 31%. Por outro lado, nos grupos tratados com olaparibe, observou-se um efeito protetor. As células expostas ao inibidor mantiveram uma viabilidade de 72%, 73%, 78%, 77%, 88% e 51% nas concentrações de 0,025 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 5 µM e 30 µM respectivamente. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre concentrações, todos os grupos tratados com olaparibe apresentam diferença significativa quando comparados ao grupo MPP+ ($p < 0,0005$), indicando um efeito protetor ao inibir a enzima PARP1. Entretanto, nas concentrações de 30 µM e 60 µM de olaparibe, observou-se um aumento na morte celular, sugerindo toxicidade do inibidor nessas concentrações mais elevadas. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média (SEM), e os experimentos foram realizados em três ensaios independentes, cada um em triplicata. A análise estatística foi conduzida por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

4.5 EXPRESSÃO DE miR-7 NA INJÚRIA POR MPP+

Com base em estudos anteriores, que demonstraram o papel de miR-7 na regulação negativa da expressão da enzima PARP1, decidiu-se avaliar a expressão do miR-7 em células SH-SY5Y injuriadas com MPP+, nas concentrações de 1 mM e 2 mM. A análise da expressão relativa por RT-qPCR revelou uma redução significativa na expressão de miR-7 nas células expostas ao MPP+, com diminuições significativas de 0,47 vezes na concentração de 1 mM e de 0,61 vezes na concentração de 2 mM, quando comparadas ao grupo controle.

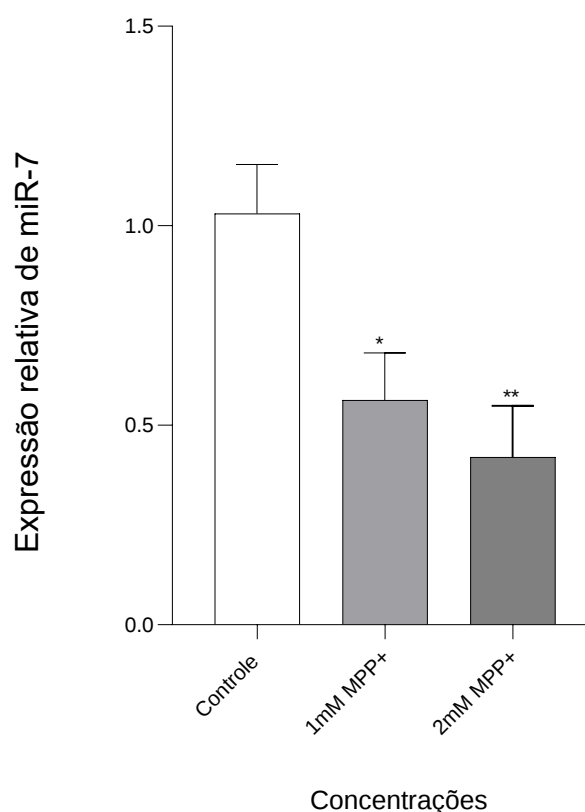


Figura 10. Expressão relativa de miR-7 em células SH-SY5Y expostas a diferentes concentrações de MPP+. A expressão de miR-7 foi avaliada em relação ao controle e normalizada pelos miRNAs de referência RNU24, miR-39-3p e miR-21. Observa-se uma redução na expressão de miR-7 em células expostas ao MPP+ de 0,61 em 1 mM e 0,46 na concentração de 2 mM, apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($p < 0,01$). Os dados foram obtidos por ensaios de RT-qPCR, com a expressão relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e análise estatística realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($n = 5$).

4.6 ENSAIO PILOTO DE TRANSFEÇÃO DE miR-7 MIMICS NA INJÚRIA POR MPP+

Após a observação de que a exposição de células SH-SY5Y ao MPP+ promove uma redução significativa na expressão relativa de miR-7, seguimos com a avaliação do potencial protetivo de miR-7 contra a injúria morte celular causada por MPP+. Para isso, foi realizada a suplementação do conteúdo de miR-7 celular com um imitador sintético (*mimic*), na concentração de 50 nM. No grupo exposto somente ao MPP+, na concentração de 2 mM, a viabilidade celular foi reduzida para 58%. Após a transfecção com o mimic SCRB, na presença do MPP+, a viabilidade observada foi de 59%. Finalmente, no grupo transfectado com miR-7 mimic, associado ao MPP+, a

viabilidade celular foi de 69%, representando uma recuperação de 11 pontos percentuais em comparação ao grupo exposto ao MPP+ isoladamente.

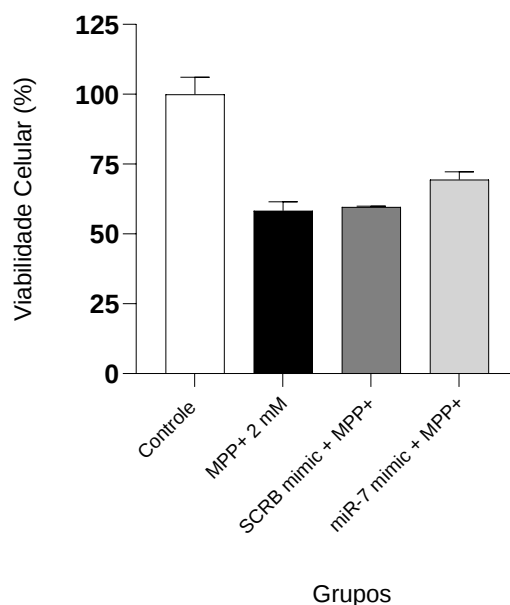


Figura 111. Efeito da transfeção de miR-7 mimic na viabilidade de células SH-SY5Y expostas ao MPP+. Observou-se uma redução significativa na viabilidade celular em todos os grupos tratados com MPP+ 2 mM quando comparados ao controle ($p < 0,005$), confirmando o efeito tóxico do MPP+. Grupo SCRB mimic + MPP+: A viabilidade celular permanece reduzida, semelhante ao grupo tratado apenas com MPP+, sugerindo que o SCRB mimic não interfere na toxicidade do MPP+. No entanto, o grupo tratado com miR-7 mimic + MPP+ apresentou uma tendência de aumento na viabilidade celular em comparação ao grupo MPP+ isolado, sugerindo um possível efeito protetor do miR-7 mimic.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição ao MPP⁺ induziu neurotoxicidade em células SH-SY5Y, levando a uma redução significativa da viabilidade celular de forma dose-dependente. Os ensaios de MTT e CCK8 confirmaram esse efeito, sendo o ensaio CCK8 mais sensível para detectar variações na viabilidade celular. Essa maior precisão no ensaio de CCK8 mostrou-se fundamental, uma vez que a abordagem posterior do estudo visa avaliar potenciais tratamentos neuroprotetores, cujos efeitos esperados podem ser sutis.

Desta forma a escolha das concentrações de 1 mM e 2 mM para os experimentos subsequentes permitiu a indução da injúria sem causar morte celular massiva, possibilitando a análise de mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao dano celular, com o objetivo de investigar o papel da enzima PARP1 e do miR-7 neste modelo. Em situações de estresse celular intenso, como danos extensivos ao DNA, a enzima PARP1 pode ser hiperativada, causando o esgotamento de NAD⁺ e ATP, o que leva a disfunções celulares graves (34). Assim, sua superativação está diretamente relacionada à disfunção mitocondrial e à morte celular.

Parthanatos é a principal via de sinalização de morte celular desencadeada por estressores patológicos e pode ser iniciada por diversos fatores, como isquemia, sinucleinopatias, β -amiloide e ativação excessiva dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Essa forma regulada de morte celular é caracterizada pela ativação da enzima de detecção de danos ao DNA, PARP1. Quando ocorre um dano extenso ao DNA, a enzima PARP1 torna-se hiperativada e produz longos polímeros de poli-ADP-ribose (PAR). O acúmulo de PAR e sua translocação para o citosol desencadeiam uma cascata de eventos, incluindo a ligação do PAR ao fator inibidor de apoptose (AIF), seguido pela translocação do AIF para o citosol. No citosol, o AIF se liga ao fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), formando um complexo que é transportado para o núcleo, onde promove a fragmentação do DNA em larga escala por meio da atividade de nucleases associadas ao MIF, culminando na morte celular (56). A ativação dos parthanatos também intensifica a neurotoxicidade associada à α -syn patológica, funcionando como um ciclo de feedback positivo. O polímero de PAR aumenta diretamente a taxa de fibrilação, promovendo a formação de uma versão mais tóxica da alfa-sinucleína (56), contribuindo para a progressão mais rápida da DP.

Modelos experimentais de Doença de Parkinson utilizando fibrilas pré-formadas ou MPP+ também demonstraram que tanto a inibição de PARP1 (43,57,58), quanto sua deleção genética apresentam capacidade de bloquear a toxicidade associada à α -syn patológica (59) e podem reduzir a progressão da DP (43,58–60). Embora os inibidores de PARP1 sejam atualmente utilizados como terapia direcionada para o tratamento de câncer de mama e de ovário com mutações no gene BRCA, esses tratamentos podem se mostrar valiosos também para o manejo da DP.

Outros estudos detectaram que os níveis de PAR no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP são significativamente mais altos do que em indivíduos saudáveis. A enzima PARP1 é ativada e o polímero PAR se acumula no modelo patológico da doença de Parkinson (DP) associada à α -sinucleína (61) (57).

Observou-se que PARP1 está significativamente ativada no plasma de pacientes com DP. Além disso, foram detectados no plasma humano os fragmentos típicos de clivagem da enzima PARP1, de 25 kDa e 89 kDa, sugerindo um possível marcador da ativação dessa via na doença. No modelo *in vitro*, o MPP+ induziu a ativação da enzima PARP1, a agregação de PAR e a translocação do AIF para o núcleo de maneira dependente da concentração. Ademais, o uso dos inibidores de apoptose Z-VAD-FMK e Nec-1 não reverteu a citotoxicidade induzida pelo MPP+, o que é consistente com o mecanismo de morte celular por parthanatos (62).

No presente estudo, a expressão de PARP1 revelou um resultado paradoxal: enquanto os níveis de expressão gênica estavam reduzidos após exposição ao MPP+, a proteína PARP1 estava aumentada, conforme evidenciado por Western Blotting. Essa discrepância entre transcrição e tradução sugere a presença de mecanismos regulatórios pós-transcricionais, como regulação por microRNAs, ou estabilização proteica em resposta ao estresse celular. Especificamente, miR-7 pode regular PARP1, e sua expressão reduzida no modelo de neurotoxicidade por MPP+ pode ter contribuído para o aumento da proteína PARP1, favorecendo a ativação dessa via (63). Esses achados reforçam a complexidade da regulação de PARP1 e indicam que, além da ativação enzimática, mecanismos pós-transcricionais podem desempenhar um papel fundamental na manutenção da homeostase celular e na progressão da neurodegeneração induzida pelo MPP+.

PARP1 é amplamente reconhecida como um mediador crítico na resposta ao dano ao DNA e morte celular programada, particularmente em contextos de neurotoxicidade e doenças neurodegenerativas. Dessa forma, mesmo reduções

modestas em sua expressão podem refletir alterações funcionais importantes no modelo *in vitro*. Essas evidências ressaltam a relevância da enzima PARP1 na neurotoxicidade induzida pelo MPP⁺ e sugerem que sua ativação exacerbada pode contribuir para a degeneração neuronal na Doença de Parkinson. Nesse contexto, reforça-se a importância do equilíbrio da atividade de PARP1 na DP e sua relação com a neurodegeneração induzida pelo MPP⁺.

Estudos anteriores demonstraram que a inibição da enzima PARP1 pode reduzir o acúmulo de α -SYN, preservar os níveis de dopamina e seus metabólitos e conferir neuroproteção em diferentes modelos experimentais (64–66). Diante disto, o presente estudo investigou a inibição farmacológica da PARP com olaparibe como uma possível estratégia neuroprotetora. Os resultados indicaram que concentrações intermediárias do inibidor foram capazes de recuperar significativamente a viabilidade celular, sugerindo que a hiperativação da PARP contribui para a morte celular induzida pelo MPP⁺, confirmando o envolvimento da via dos parthanatos. Entretanto, observamos que na concentração de 60 μ M não houve recuperação celular, possivelmente devido aos efeitos tóxicos ou à inibição excessiva de PARP, comprometendo mecanismos celulares essenciais, como a resposta ao dano ao DNA. Esse achado corrobora a literatura ao indicar que, embora a inibição da enzima PARP1 seja uma estratégia promissora, seu uso deve ser ajustado para evitar efeitos adversos decorrentes da supressão excessiva da sua atividade.

A expressão precisa de miR-7 é essencial para o desenvolvimento adequado e a manutenção da fisiologia do sistema nervoso central; uma deficiência em miR-7 pode contribuir para distúrbios cerebrais, incluindo DP (48). O presente estudo avaliou a expressão gênica do miR-7 e observou uma redução significativa dessa expressão nas células SH-SY5Y injuriadas com MPP⁺, um achado que corrobora seu papel na proteção neuronal e na regulação da enzima PARP1. Considerando que miR-7 atua como um regulador de PARP1, sua diminuição no modelo experimental pode estar contribuindo para o aumento da proteína PARP1, intensificando a neurotoxicidade induzida pelo MPP⁺.

Para testar essa hipótese, foi realizado um ensaio piloto com a reposição do miR-7 por meio de um imitador sintético. Embora não tenha sido observado um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular, como hipótese, os resultados indicaram uma tendência de melhora. A ausência de um efeito significativo pode estar relacionada ao número de experimentos, à concentração do mimic

utilizado, ao tempo de exposição ou a outros fatores experimentais, os quais precisam ser ajustados e otimizados em estudos futuros.

O miR-7 é um microRNA essencial com estrutura típica de “haste e alça”, contendo nucleotídeos pareados na região da haste, alguns desajustes e uma curta sequência desemparelhada que formando a alça. Em humanos, ele é codificado pelos genes *miR-7-1*, *miR-7-2* e *miR-7-3*, localizados em regiões distintas do genoma, incluindo íntrons dos genes *HNRNPK* e *PGSF1a* e uma região intergênica no cromossomo 15 (48,67,68). Apesar das variações nos precursores, essas variantes compartilham a mesma sequência madura, reforçando sua importância evolutiva. O miR-7 desempenha funções críticas no sistema nervoso central, regulando processos como neurogênese, diferenciação neuronal e equilíbrio osmótico no hipotálamo (69).

Diversos estudos têm explorado a regulação do miR-7 e seus efeitos neuroprotetores, particularmente em relação à DP. Em modelos de roedores e amostras de pacientes, a redução da expressão do miR-7 foi associada ao agravamento dos sintomas da PD, sugerindo seu papel essencial na modulação de genes críticos envolvidos na neurodegeneração. O miR-7 regula negativamente o VDAC1, uma proteína mitocondrial associada à apoptose celular, o que contribui para a preservação da integridade mitocondrial e redução do estresse oxidativo nas células neuronais (53,70,71). Além disso, o miR-7 tem demonstrado efeitos protetores ao modular o fator de transcrição NF- κ B, especificamente o componente RelA, diminuindo a inflamação neuronal e aumentando a resistência ao estresse induzido por toxinas (71). A ativação da via glicolítica também foi observada, com o miR-7 facilitando a produção de ATP e favorecendo a sobrevivência celular durante condições de estresse energético, como a induzida pela neurotoxina MPP⁺ (71). Esses achados ressaltam o potencial terapêutico do miR-7, não apenas na regulação da α -syn, mas também em outras vias celulares essenciais para a saúde neuronal, destacando a importância de futuras investigações sobre o uso do miR-7 no tratamento da PD (72,73).

A relação entre enzima PARP1 e miR-7 observada neste estudo é de grande importância para o entendimento da neurodegeneração na doença de Parkinson (DP). Estudos anteriores indicam que a hiperativação da enzima PARP1 pode contribuir para a morte neuronal em doenças neurodegenerativas, enquanto a redução do miR-7 tem sido associada à progressão da DP e ao aumento do estresse oxidativo (48,74). Nesse sentido, os achados deste estudo sugerem que a modulação dessas vias pode

ser uma estratégia promissora para mitigar a morte neuronal induzida pela neurotoxicidade do MPP+.

Esses achados abrem novas possibilidades no entendimento de terapêuticas baseadas em terapias genéticas, oferecendo um caminho promissor para o desenvolvimento de intervenções direcionadas à modulação da expressão de miR-7 e à regulação da atividade de PARP1. A utilização de técnicas como a transfecção de imitadores sintéticos de miR-7 pode representar uma estratégia inovadora para mitigar a neurotoxicidade e, assim, oferecer alternativas no tratamento da Doença de Parkinson.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados sugerem que tanto a inibição de PARP com olaparibe quanto a reposição de miR-7 podem promover neuroproteção no modelo de Doença de Parkinson induzido por MPP+. A inibição de PARP com olaparibe demonstrou potencial para reduzir a neurotoxicidade, enquanto a reposição de miR-7 parece contribuir para a melhora da viabilidade celular. Dessa forma, a combinação dessas abordagens pode representar uma estratégia terapêutica promissora para modular as vias envolvidas na neurodegeneração da DP.

Em estudos futuros, pretende-se avaliar se a exposição de células ao MPP+ e transfectadas com um imitador sintético de miR-7 exerce um efeito protetor, além de modular a expressão da proteína PARP1. Adicionalmente, será possível investigar o potencial neuroprotetor do olaparibe, um inibidor farmacológico de PARP, ampliando a compreensão de seus mecanismos de ação no contexto da neurodegeneração. Esses estudos visam otimizar as terapias baseadas em modulação genética e farmacológica, visando aumentar a eficácia das abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Parkinson J. NEUROPSYCHIATRY CLASSICS An Essay on the Shaking Palsy Member of the Royal College of Surgeons PREFACE. Vol. 14, J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2002.
2. Engelhardt E, Gomes M da M. Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. *Dementia e Neuropsychologia*. 2017;11(2):198–201.
3. Langley CH, Charlesworth B. Nature © Macmillan Publishers Ltd 1997 expansion of xenotransplantation. 1997.
4. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. Vol. 132, American Journal of Medicine. Elsevier Inc.; 2019. p. 802–7.
5. Deliz JR, Tanner CM, Gonzalez-Latapi P. Epidemiology of Parkinson's Disease: An Update. Vol. 24, Current Neurology and Neuroscience Reports. Springer; 2024. p. 163–79.
6. Ray Dorsey E, Elbaz A, Nichols E, Abd-Allah F, Abdelalim A, Adsuar JC, et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 1o de novembro de 2018;17(11):939–53.
7. Ben-Shlomo Y, Darweesh S, Llibre-Guerra J, Marras C, Luciano MS, Tanner C. The epidemiology of Parkinson's disease [Internet]. 2024. Disponível em: www.thelancet.
8. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MCQ, Guerra HL, Lima-Costa MF, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). *Movement Disorders*. junho de 2006;21(6):800–8.
9. Ronald B. Postuma MD. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders* [Internet]. outubro de 2015 [citado 20 de janeiro de 2025];30(12):1591–601. Disponível em: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.26424>

10. Berg D, Postuma RB, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, et al. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2014;29(4):454–62.
11. William Dauer^{1,3} and Serge Przedborski. Parkinson's Disease Review. 11 de setembro de 2003;39(*Neuron*):889–909.
12. Marsden CD. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* [Internet]. 1983;19:121—141. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/6321645>
13. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism. *Neurology* [Internet]. 1967;17(5):427. Disponível em: <https://www.neurology.org/doi/abs/10.1212/WNL.17.5.427>
14. Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease - A multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord*. agosto de 2009;15(7):490–4.
15. Cabreira V, Massano J. Parkinson's disease: Clinical review and update. *Acta Med Port*. 2019;32(10):661–70.
16. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. Vol. 8, *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2009. p. 1150–7.
17. Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M, et al. Analysis of the Adrenal Gland Is Useful for Evaluating Pathology of the Peripheral Autonomic Nervous System in Lewy Body Disease [Internet]. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnen/article/66/5/354/2916812>
18. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, et al. Lewy Body Pathology Involves Cutaneous Nerves [Internet]. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnen/article/67/10/945/2916897>
19. Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. Vol. 42, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 72–85.

20. Klein C, Hattori N, Marras C. MDSGene: Closing data gaps in genotype-phenotype correlations of monogenic Parkinson's disease. Vol. 8, Journal of Parkinson's Disease. IOS Press; 2018. p. S25–30.
21. Wittke C, Petkovic S, Dobricic V, Schaake S, Arzberger T, Compta Y, et al. Genotype–Phenotype Relations for the Atypical Parkinsonism Genes: MDSGene Systematic Review. Vol. 36, Movement Disorders. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1499–510.
22. Kay DM, Stevens CF, Hamza TH, Montimurro JS, Zabetian BCP, Factor SA, et al. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2 [Internet]. 2010. Disponível em: www.neurology.org
23. Jones AC, Yamamura Y, Almasly L, Bohlega S, Elibol B, Hubble J, et al. Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism Maps to 6q25.2-q27 in Four Ethnic Groups: Detailed Genetic Mapping of the Linked Region. Vol. 63, Am. J. Hum. Genet. 1998.
24. Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, et al. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. Ann Neurol. 2001;50(3):293–300.
25. Liu EA, Schultz ML, Mochida C, Chung C, Paulson HL, Lieberman AP. Fbxo2 mediates clearance of damaged lysosomes and modifies neurodegeneration in the Niemann-Pick C brain. JCI Insight. 15 de outubro de 2020;5(20).
26. Schweighauser M, Shi Y, Tarutani A, Kametani F, Murzin AG, Ghetti B, et al. Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. Nature. 17 de setembro de 2020;585(7825):464–9.
27. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. Vol. 36, Clinics in Geriatric Medicine. W.B. Saunders; 2020. p. 1–12.
28. Hauser DN, Hastings TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. Vol. 51, Neurobiology of Disease. 2013. p. 35–42.

29. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. Vol. 62, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2013. p. 132–44.
30. Braak H, Tredici K Del, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Vol. 24, *Neurobiology of Aging*. 2003.
31. Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, et al. α -synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *American Journal of Pathology*. 2000;157(2):401–10.
32. Grünewald A, Kumar KR, Sue CM. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. Vol. 177, *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 73–93.
33. Nicoletti V, Palermo G, Del Prete E, Mancuso M, Ceravolo R. Understanding the Multiple Role of Mitochondria in Parkinson's Disease and Related Disorders: Lesson From Genetics and Protein–Interaction Network. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
34. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. Vol. 289, *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 2013–24.
35. Gupte R, Liu Z, Kraus WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. 2017; Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.291518>.
36. Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. Vol. 39, *Molecular Cell*. 2010. p. 8–24.
37. Narne P, Pandey V, Simhadri PK, Phanithi PB. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: The death knell tolls for neurons. Vol. 63, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press; 2017. p. 154–66.
38. Steffen JD, Brody JR, Armen RS, Pascal JM. Structural implications for selective targeting of PARPs. Vol. 3 DEC, *Frontiers in Oncology*. 2013.

39. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 3 de outubro de 2020;19(10):711–36.
40. Langston JW. The MPTP story. Vol. 7, *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press; 2017. p. S11–9.
41. Desai VG, Feuers RJ, Hart ' RW, Tv SFA. MPP⁺-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport. Vol. 7, *Brain Research*. 1996.
42. Brighina L, Riva C, Bertola F, Fermi S, Saracchi E, Piolti R, et al. Association analysis of PARP1 polymorphisms with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* novembro de 2011;17(9):701–4.
43. Outeiro TF, Grammatopoulos TN, Altmann S, Amore A, Standaert DG, Hyman BT, et al. Pharmacological inhibition of PARP-1 reduces α -synuclein- and MPP⁺-induced cytotoxicity in Parkinson's disease in vitro models. *Biochem Biophys Res Commun.* 8 de junho de 2007;357(3):596–602.
44. Biedler JL, HL, & SBA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. 1973;11(33):2643–52.
45. Xie HR, Hu L Sen, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Vol. 123, *Chinese Medical Journal*. 2010. p. 1086–92.
46. Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. m *Journal of Neural Transmission* Uptake of a neurotoxin-eandidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. Vol. 98, *J Neural Transm.* 1994.
47. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. Vol. 51, *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 11–7.
48. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Gene Ther.* 1o de maio de 2018;18(3):143–53.
49. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA.* novembro de 2012;18(11):2083–92.

50. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 15 de dezembro de 2003;17(24):3011–6.
51. Szelągowski A, Kozakiewicz M. A Glance at Biogenesis and Functionality of MicroRNAs and Their Role in the Neuropathogenesis of Parkinson's Disease. Vol. 2023, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2023.
52. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Vol. 136, *Cell*. 2009. p. 215–33.
53. Junn E, Lee KW, Seon Jeong B, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of-synuclein expression and toxicity by microRNA-7 [Internet]. 2009. Disponível em: <http://www.targetscan.org/>
54. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of α -synuclein expression by mir-7 and mir-153. *Journal of Biological Chemistry*. 23 de abril de 2010;285(17):12726–34.
55. McMillan KJ, Murray TK, Bengoa-Vergniory N, Cordero-Llana O, Cooper J, Buckley A, et al. Loss of MicroRNA-7 Regulation Leads to α -Synuclein Accumulation and Dopaminergic Neuronal Loss In Vivo. *Molecular Therapy*. 4 de outubro de 2017;25(10):2404–14.
56. Yang L, Guttman L, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: Mechanisms, modulation, and therapeutic prospects in neurodegenerative disease and stroke. Vol. 228, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2024.
57. Kam TI, Mao X, Park H, Chou SC, Karuppagounder SS, Umanah GE, et al. Poly(ADP-ribose) drives pathologic α -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* (1979). 2 de novembro de 2018;362(6414).
58. Mao K, Chen J, Yu H, Li H, Ren Y, Wu X, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents neurodegeneration and promotes α -synuclein degradation via transcription factor EB-dependent autophagy in mutant α -synucleinA53T model of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 1o de junho de 2020;19(6).
59. Park H, Kam TI, Dawson TM, Dawson VL. Poly (ADP-ribose) (PAR)-dependent cell death in neurodegenerative diseases. Em 2020. p. 1–29.

60. Yokoyama H, Kuroiwa H, Tsukada T, Uchida H, Kato H, Araki T. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor can attenuate the neuronal death after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *J Neurosci Res.* 15 de maio de 2010;88(7):1522–36.
61. Kam TI, Mao X, Park H, Chou SC, Karuppagounder SS, Umanah GE, et al. Poly(ADP-ribose) drives pathologic α -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* (1979). 2 de novembro de 2018;362(6414).
62. Hu J, Wu J, Wan F, Kou L, Yin S, Sun Y, et al. Calcitriol Alleviates MPP+- and MPTP-Induced Parthanatos Through the VDR/PARP1 Pathway in the Model of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 30 de julho de 2021;13.
63. Huang S, Zeng Z, Sun Y, Cai Y, Xu X, Li H, et al. Association study of hsa_circ_0001946, hsa-miR-7-5p and PARP1 in coronary atherosclerotic heart disease. *Int J Cardiol.* 1o de abril de 2021;328:1–7.
64. Outeiro TF, Grammatopoulos TN, Altmann S, Amore A, Standaert DG, Hyman BT, et al. Pharmacological inhibition of PARP-1 reduces α -synuclein- and MPP+-induced cytotoxicity in Parkinson's disease in vitro models. *Biochem Biophys Res Commun.* 8 de junho de 2007;357(3):596–602.
65. Puentes LN, Lengyel-Zhand Z, Reilly SW, Mach RH. Evaluation of a Low-Toxicity PARP Inhibitor as a Neuroprotective Agent for Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 31 de agosto de 2021;58(8):3641–52.
66. Mao K, Chen J, Yu H, Li H, Ren Y, Wu X, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents neurodegeneration and promotes α -synuclein degradation via transcription factor EB-dependent autophagy in mutant α -synucleinA53T model of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 31 de junho de 2020;19(6).
67. Horsham JL, Ganda C, Kalinowski FC, Brown RAM, Epis MR, Leedman PJ. MicroRNA-7: A miRNA with expanding roles in development and disease. Vol. 69, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* Elsevier Ltd; 2015. p. 215–24.
68. Kalinowski FC, Brown RAM, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, et al. MicroRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. Vol. 54,

- International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd; 2014. p. 312–7.
69. Lee HJ, Palkovits M, Scott Young III W. miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation [Internet]. 2006. Disponível em: www.ebi.
 70. Zhou Y, Lu M, Du RH, Qiao C, Jiang CY, Zhang KZ, et al. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 16 de abril de 2016;11(1).
 71. Chaudhuri AD, Choi DC, Kabaria S, Tran A, Junn XE. MicroRNA-7 regulates the function of mitochondrial permeability transition pore by targeting vdac1 expression. *Journal of Biological Chemistry*. 18 de março de 2016;291(12):6483–93.
 72. Fragkouli A, Doxakis E. miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP+-induced cell death via upregulation of mTOR pathway. *Front Cell Neurosci*. 3 de julho de 2014;8(JULY).
 73. Kabaria S, Choi DC, Chaudhuri AD, Jain MR, Li H, Junn E. MicroRNA-7 activates Nrf2 pathway by targeting Keap1 expression. *Free Radic Biol Med*. 1o de dezembro de 2015;89:548–56.
 74. Citterio LA, Mancuso R, Agostini S, Meloni M, Clerici M. Serum and Exosomal miR-7-1-5p and miR-223-3p as Possible Biomarkers for Parkinson's Disease. *Biomolecules*. 1o de maio de 2023;13(5).