

## SUMÁRIO DO ARTIGO

## NEURODEGENERAÇÃO

## Expressão de microRNAs em células SH-SY5Y expostas a Iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+)

Duarte CDM, Sabrina Simplicio A R Ferrari, Guilherme M O Gomes, Leticia Dias dos S. Silva, Franciele Schlemmer, Mary-Ann Elvina Xavier, Simoneide titze de almeida, Ricardo Titze de Almeida

**INTRODUÇÃO:** A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa comum, afetando principalmente pessoas entre 65 e 70 anos. Caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na região da substância negra, gera sintomas debilitantes como tremores e rigidez.

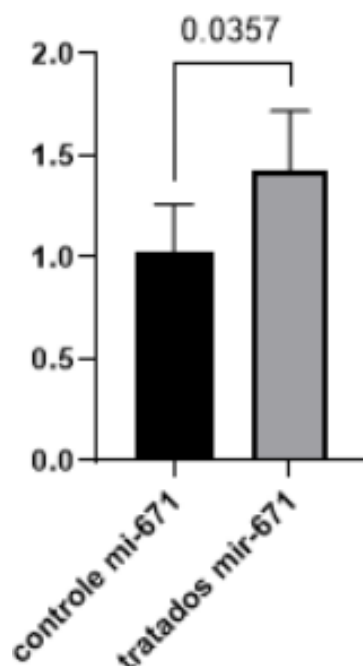
Evidências indicam o papel crucial da regulação gênica, sendo os microRNAs (miRNAs) reguladores importantes. O miR-7, associado a doenças neurodegenerativas, regula genes ligados à sobrevivência neuronal, diferenciação e resposta inflamatória. Ele possui uma rede de outros transcritos que regulam sua expressão, como o miR-671, Cdr1as e Cyrano Piwecka et al. (2017). A expressão alterada de miR-7 foi observada em modelos in vivo de Parkinson, sugerindo seu papel na patogênese. Estudos focaram-se em modelos animais, limitando a compreensão molecular Li et al. (2019).

Investigar o miR-7 e seus reguladores em células SH-SY5Y, modelo in vitro de Parkinson, é essencial, imitando o estresse observado. A exposição à neurotoxina MPP+ recapitula características-chave da patologia in vitro, possibilitando melhor compreensão do desenvolvimento molecular da doença.

A regulação de miR-7 por miR-671 é feita de forma indireta, com o miR-671 regulando inversamente a disponibilidade de Cdr1as, alvo cuja expressão é diretamente proporcional à de miR-7, pois Cdr1as tem função de esponja de miR-7. Com a baixa expressão de Cdr1as no citoplasma, através da expressão de miR-671 e seu mecanismo de clivagem da estrutura circular de Cdr1as por RNA interferente (iRNA), ocorre baixa expressão de miR-7 Kleaveland et al. (2018). Devido às complexidades desta rede regulatória, torna-se imprescindível o estudo desses microRNAs para melhor compreensão da doença.

**FUNDAMENTAÇÃO:** Durante a patogênese da DP, a proteína  $\alpha$ -sinucleína monomérica se agrega em estruturas de ordem superior que se tornam patológicas e levam à morte celular neuronal. No entanto, os fatores que conduzem à montagem anormal da  $\alpha$ -sinucleína patológica e os mecanismos de lesão e morte celular ativados por ela ainda são desconhecidos.

Neste contexto, o presente estudo visa preencher essa lacuna de conhecimento, investigando o papel do miR-7 e miR-671 na patogênese da DP. Dada a capacidade do miR-7 de regular a expressão gênica relacionada à sobrevivência neuronal e à resposta inflamatória, e do miR-671 de regular a expressão desse alvo, é plausível que o miR-7 e o miR-671 possam estar envolvidos na modulação da expressão da  $\alpha$ -sinucleína patológica, assim como nos mecanismos de lesão celular associados.



**RESULTADOS:** Este estudo investigou os efeitos do composto MPP+ como agente neurotóxico associado à Doença de Parkinson em células SH-SY5Y. Foram analisadas a viabilidade celular e a expressão do miR-7 e miR-671, microRNAs com relevância na doença. A exposição das células ao MPP+ resultou em uma diminuição significativa da viabilidade celular, indicando seu efeito neurotóxico. A concentração de 1 mM de MPP+ foi escolhida para investigar a expressão do miR-7 e miR-671, devido à relação entre viabilidade celular e a concentração de MPP+.

Uma análise da expressão do miR-7 e miR-671 em relação à média dos genes endógenos RNU-19, RNU-24 e miR-39 (C. elegans) foi conduzida. Observou-se variação nos valores dos ciclos de limiar (CT) para todos os grupos, sendo as variações mais acentuadas no miR-671, no qual foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e tratados. Entretanto, em relação ao miR-7, os resultados não exibiram significância estatística suficiente para avaliação geral da expressão final, apesar de ter sido observada uma diminuição da expressão em relação aos grupos analisados.

Os testes de significância T de Student mostraram diferenças estatisticamente significativas na expressão do miR-671, com  $p = 0,0357$  e expressão gênica 1,427 vezes maior nas amostras tratadas com MPP+ em comparação com as não tratadas. Os testes de significância T de Student para o miR-7 mostraram um valor de  $p = 0,175$  e expressão gênica 0,701 vezes menor nas amostras tratadas com MPP+ em comparação com as não tratadas.

**CONCLUSÃO:**

Em resumo, este estudo demonstrou que o MPP+ causou perda de viabilidade celular e afetou a expressão do miR-7 em células SH-SY5Y. As análises estatísticas indicaram diferenças significativas na expressão do miR-671 nas amostras tratadas com MPP+. No entanto, as análises estatísticas não indicaram diferenças significativas na expressão do miR-7 nas amostras. Isso ressalta a complexidade das interações entre agentes neurotóxicos e a expressão genética, sugerindo a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender completamente os mecanismos subjacentes à Doença de Parkinson.

## NEURODEGENERAÇÃO

# Expressão de microRNAs em células SH-SY5Y expostas a Iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+)

Duarte CDM, Sabrina Simplicio A R Ferrari, Guilherme M O Gomes, Leticia Dias dos S. Silva, Franciele Schlemmer, Mary-Ann Elvina Xavier, Simoneide titze de almeida, Ricardo Titze de Almeida

**INTRODUÇÃO:** A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente entre os 65 a 70 anos. Afetando milhões de pessoas em todo o mundo De Lau e Breteler (2006). Caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na região substantia nigra do cérebro, a DP resulta em sintomas motores debilitantes, como tremores, rigidez muscular e bradicinesia Jankovic (2008).

O acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin), uma proteína intracelular, dá origem a estruturas denominadas corpos de Lewy, desencadeando a morte de neurônios e inflamação na substância negra (SN) pars compacta, sendo central no surgimento das características motoras de DP Hallett, Engender e Isacson (2019).

Evidências crescentes indicam que a regulação inadequada da expressão gênica desempenha um papel crucial na progressão da DP. Dentre as moléculas envolvidas na regulação gênica, os microRNAs (miRNAs) emergiram como reguladores pós-transcricionais relevantes Fabian e Sonenberg (2012). O miR-7, um miRNA amplamente estudado, está implicado em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. Pesquisas anteriores demonstraram que o miR-7 desempenha um papel na regulação de genes associados à sobrevivência neuronal, diferenciação celular e resposta inflamatória Doxakis (2010) Goh et al. (2019).

E miR-671 como um ator dentro da rede de regulação de miR-7, atuando como um agente de clivagem de um RNA circular o qual age como esponja de miR-7, assim liberando-o para atuação em seus alvos, como o  $\alpha$ -sin Meccariello et al (2024).

Os neurônios empregam microRNAs

miRNAs) como um mecanismo para impedir o acúmulo de proteínas, como o  $\alpha$ -sin, através da degradação de RNA mensageiro (mRNAs), assim controlando a expressão da proteína Fabian e Sonenberg (2012). Nesse contexto, este estudo busca avaliar a expressão do microRNA 7 (miR-7) e microRNA 671 (miR-671), que apresenta regulação na expressão da  $\alpha$ -sinucleína.

Apesar das promissoras evidências, o papel específico do miR-7 e miR-671 na progressão da DP ainda não está completamente compreendido. A maior parte das pesquisas existentes concentrou-se em modelos animais, o que limita a compreensão dos mecanismos moleculares subjacente Titze-de-Almeida e Titze-de-Almeida (2018).

Dessa forma, torna-se essencial investigar o papel do miR-7 em modelos in vitro, permitindo uma abordagem mais controlada e detalhada. Neste estudo, utilizamos células SH-SY5Y, uma linha celular derivada de neuroblastoma humano, amplamente reconhecida como modelo in vitro de DP Xicoy et al. (2010) Essas células exibem características neuronais e expressam marcadores dopaminérgicos, tornando-as uma escolha apropriada para explorar os mecanismos subjacentes à doença Xicoy et al. (2017).

## Escolha do Modelo Celular SH-SY5Y na Pesquisa sobre Doença de Parkinson

A investigação da Doença de Parkinson (DP) tem se beneficiado da utilização de modelos celulares in vitro para compreender melhor os mecanismos subjacentes à patologia. Entre os modelos celulares explorados, a linha celular SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, tem emergido como um valioso sistema

experimental para estudar as características da DP e avaliar terapias potenciais Fabian e Sonenberg (2012). As células SH-SY5Y têm desempenhado na pesquisa da DP. Este estudo destaca a capacidade das células SH-SY5Y de recapitular características dopaminérgicas relevantes para a DP, incluindo a expressão de marcadores neuronais e dopaminérgicos, como a tirosina hidroxilase e a proteína alfa-sinucleína. Adicionalmente, as características dopaminérgicas induzidas nas células SH-SY5Y, como a capacidade de sintetizar dopamina, responder a neurotrofinas e expressar receptores dopaminérgicos. Essas características endossam a relevância das células SH-SY5Y como modelo para investigações relacionadas à DP, permitindo estudos abrangentes sobre vias de sinalização, neurodegeneração Xicoy et al. (2017).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparo do ensaio para curva dose resposta

### Cultura Celular e Tratamento

Células da linhagem SH-SY5Y foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de glutamax e 1% de antifúngico e antibiótico em condições padrão de cultura celular (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) até alcançarem a densidade celular desejada.

As células foram então semeadas em placas de cultura de 96 poços, com uma densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço. E foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de MPP+ previamente preparado (0,5 mM, 1 mM e 2 mM). Três poços foram designados para cada concentração em cada placa, totalizando doze poços para cada tratamento. Um grupo de controle sem tratamento com MPP+ também foi incluído, contendo três poços em cada placa.

### Preparação da Solução de Iodeto de MPP+ a 1 mM

Uma quantidade adequada de Iodeto de MPP+ purificado, foi pesada com precisão usando uma balança analítica. A massa calculada foi transferida para um tubo de ensaio e, em seguida, adicionou-se a solução estoque de água ultrapura (mili-q) na proporção apropriada, visando obter a concentrações desejadas (1 mM, 0,5mM e 2mM) e considerando os miliequivalentes requeridos para os ensaios citados.

Ensaio MTT

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por meio contendo solução de MTT na concentração adequada. As placas foram incubadas por um período determinado. Após a incubação, o meio contendo MTT foi removido e o formazan, produto gerado pelas células metabolicamente ativas, foi solubilizado utilizando um solvente orgânico apropriado. A absorbância das soluções foi medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda adequado.

Análise Estatística

A viabilidade celular foi calculada em relação ao grupo controle e expressa como porcentagem. As médias e desvios padrão foram calculados para as três replicatas de cada tratamento. Análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste t de Student e a análise de variância (ANOVA) de uma via para avaliar as diferenças significativas entre os grupos.

reparo para o ensaio de qPCR

Cultivo Celular

Células humanas SH-SY5Y foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro(BCRJ). As células foram cultivadas em DMEM suplementado com ss10% de soro fetal bovino, 1% de Glutamax, 1% de antibiótico, anfotericina-B, e mantidas a 37°C e 5% de CO2 em um ambiente úmido. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana.

Semeadura e Crescimento Celular

As células SH-SY5Y foram semeadas em poços de placas de 6 poços, com uma área de 9,60 cm² por poço. Cada poço foi preenchido com um volume de trabalho de 3 mL do meio de cultura.

Uma densidade de 2x10^5 células por poço foi semeada, resultando em uma densidade total de 8x10^5 células por placa. Quatro poços foram utilizados por placa, garantindo consistência entre as réplicas.

Incubação e Condições de Crescimento  
As placas semeadas foram colocadas em uma incubadora padrão de CO2 com 5% de CO2 a 37°C. As células foram permitidas a aderir e crescer por um período de 24 horas, mantendo as condições fisiológicas

A extração de RNA

Foi realizada utilizando o kit de isolamento de miRNA mirVana (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante. O material biológico empregado foi composto por células da linhagem SH-SY5Y.

Estas células foram cultivadas até atingirem a densidade requerida e, em seguida, foram congeladas a -80°C para assegurar a integridade do RNA. Para a etapa de lise celular e ruptura dos tecidos, o protocolo específico do kit foi seguido com precisão. As células cultivadas foram submetidas ao tratamento com Lysis/Binding Buffer, permitindo a liberação eficaz do RNA. No caso das amostras de tecido congelado, estas passaram por um procedimento de inativação de RNases antes da etapa de homogeneização.

A extração orgânica do RNA foi conduzida por meio do método de ácido-fenol:clorofórmio, seguindo as orientações detalhadas fornecidas pelo fabricante. A fase aquosa, contendo o RNA de interesse, foi cuidadosamente recuperada após a centrifugação. A eluição do RNA foi realizada utilizando a Elution Solution fornecida no kit, que foi pré-aquecida a 95°C, assegurando assim uma recuperação eficiente do material alvo.

É importante ressaltar que, devido à natureza do estudo focado no miRNA mir-7, um protocolo de enriquecimento de small RNAs incluído no kit mirVana foi empregado. Essa abordagem se mostrou a mais adequada para o isolamento eficiente do mir-7

As amostras resultantes foram devidamente armazenadas a -20°C, garantindo a integridade do RNA para análises futuras. A escolha do kit de isolamento de miRNA mirVana foi embasada em sua eficácia documentada na obtenção de RNA de células SH-SY5Y e sua habilidade em preservar a qualidade do material biológico durante todo o processo de extração.

Avaliação da Pureza do RNA por NanoDrop

Após a extração de RNA, a pureza do material foi avaliada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop [modelo do NanoDrop]. Pequenas quantidades das amostras de RNA foram aplicadas nas cavidades da amostra do NanoDrop e as leituras espectrofotométricas foram registradas. Foram calculadas as relações de absorbância 260/280 e 260/230 automaticamente pelo software do NanoDrop, fornecendo informações sobre a presença de impurezas que absorvem luz nas faixas de comprimento de onda analisadas. A avaliação da pureza do RNA através do espectrofotômetro NanoDrop, incluindo as relações 260/280 e 260/230, permitiu determinar a qualidade do RNA extraído e a presença de possíveis contaminantes que poderiam interferir nas análises subsequentes.

Quantificação de RNA

Após a etapa de extração, a concentração de RNA foi quantificada utilizando o kit Qubit miRNA Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os reagentes do kit foram preparados conforme instruções do fabricante.

Avaliação da Pureza do RNA por NanoDrop

Após a extração de RNA, a pureza do material foi avaliada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop [modelo do NanoDrop]. Pequenas quantidades das amostras de RNA foram aplicadas nas cavidades da amostra do NanoDrop e as leituras espectrofotométricas foram registradas. Foram calculadas as relações de absorbância 260/280 e 260/230 automaticamente pelo software do NanoDrop, fornecendo informações sobre a presença de impurezas que absorvem luz nas faixas de comprimento de onda analisadas. A avaliação da pureza do RNA através do espectrofotômetro NanoDrop, incluindo as relações 260/280 e 260/230, permitiu determinar a qualidade do RNA extraído e a presença de possíveis contaminantes que poderiam interferir nas análises subsequentes.

Quantificação de RNA

Após a etapa de extração, a concentração de RNA foi quantificada utilizando o kit Qubit miRNA Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os reagentes do kit foram preparados conforme instruções do fabricante. Amostras isoladas de RNA, bem como padrões de controle, foram cuidadosamente pipetados no tubo de ensaio.

Os tubos foram inseridas no espectrofotômetro Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, EUA), onde as leituras de fluorescência foram registradas para determinar as concentrações de RNA. O ensaio Qubit miRNA Assay, otimizado para detectar ácidos nucleicos de baixo peso molecular, permitiu uma quantificação precisa de miRNA nas amostras. Cada amostra de RNA foi submetida a três medidas independentes de quantificação para assegurar a robustez dos resultados. As médias das concentrações de RNA foram calculadas para cada amostra. A partir das concentrações quantificadas, as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C, preservando a estabilidade do material para investigações futuras. A escolha do kit de isolamento de miRNA mirVana foi embasada em sua eficácia comprovada na obtenção de microRNAs de células SH-SY5Y.O uso do kit Qubit miRNA Assay possibilitou uma avaliação precisa das concentrações de RNA, contribuindo para a qualidade dos dados e experimentos subsequentes.

Realização da qPCR Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Reações de cDNA foram realizadas para cada amostra de RNA, incluindo controles sem transcrição reversa.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por meio contendo Preparação da Reação de qPCR: As reações de qPCR foram preparadas utilizando o kit TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os primers TaqMan™ para os miRNAs alvo (miR-7), os miRNAs endógenos (miR-382 e RNU24) foram selecionados a partir do catálogo do fabricante e em base na literatura. O RNA total extraído foi diluído para uma concentração padrão de 2ng/ul por reação

Para cada amostra, a reação de qPCR foi composta por: 1x TaqMan™ Universal PCR Master Mix, 1x TaqMan™ miRNA Assay (para miR-7), 1x TaqMan™ miRNA Assay (para miR-382), 1x TaqMan™ miRNA Assay (para RNU24) de cDNA equivalente a uma quantidade padrão de RNA total. A reação final foi completada com água livre de RNase.

Primers

Os primers utilizados para o alvo e os endogenos do kit comercial sistema TaqMan™(thermo fisher). A sequencia Sequência Stem-Loop específica para cDNA de miR-7 5´ UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGGAAGAC UAGUGAUUUUGUUGUUUUAGAUACUAAU CGACAACAAUACAGUCUGCCAUUGGCACA GGCCAUGCCUCUACAG- 3´. e a sequencia de microRNA maduro é 5´- UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU-3´.Codigo de api-miR-7 utilizado é 005723mat

A sequencia Sequência Controle específica para cDNA de RNU19 5´- TTGCACCTCTGAGAGTGGAATGACTCCTGTGGA GTTGATCCTAGTCTGGGTGCAAACAATT - 3´. E a sequencia de microRNA maduro é 5´- TTGCACCTCTGAGAGTGGAATGACTCCTGTGGA GTTGATCCTAGTCTGGGTGCAAACAATT- 3´ codigo cat de RNU24 utilizado é 001003

A sequencia Sequência Controle específica para cDNA de hsa-miR-671-5p 5´- AGGAAGCCCUGGAGGGGUGGAG - 3´. E a sequencia de microRNA maduro é 5´- GCAGGUGAACUGGCAGGCCAGGAAGAGGAGG AAGCCUGGAGGGGUGGAGGUGAUGGAUGU UUUCCUCCGUUCUCAGGGCUCCACCUCUUUC GGGCCGUGAGGCCAGGGCUGGUGC- 3´ codigo cat de RNU24 utilizado é 197646\_mat

A sequencia Sequência Controle específica para cDNA de cel-miR-39-3p RNA Spike-ins in cDNA Synthesis (C. elegans ) codigo cat de miR-39( utilizado é 339390

Execução da qPCR

As reações de qPCR foram realizadas em triplicata para cada amostra, utilizando o sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific, EUA). O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial em duas etapas de hold respectivamente de 50°C por 2 minutos e 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de amplificação, com cada ciclo compreendendo uma desnaturação a 95°C por 3 segundos e um anelamento/alongamento a 60°C por 30 segundos.

Análise dos Dados

Os dados de qPCR foram analisados utilizando o software Prism 9. GraphPad Prism. As quantidades relativas dos miRNAs alvo (miR- 7 e miR-671) foram calculadas através do método ΔΔCt, normalizadas com base nos miRNAs endógenos (miR-39, RNU 19 e RNU24). Os resultados foram expressos como fold change em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando testes t de Student ou ANOVA, conforme apropriado, com um nível de significância de p > 0,05. As três replicatas independentes garantiram a robustez e a confiabilidade dos resultados obtidos.

RESULTADOS

MPP+ causa perda de viabilidade celular

A fim de estabelecer um suporte empírico para a validade do modelo proposto pela literatura, foi conduzida uma análise de resposta a dose de iodeto de MPP+ como o modelo para Doença de Parkinson. Para tal, foram realizadas avaliações de viabilidade celular mediante a dose de MPP+.

A neurotoxina MPP+ causa redução dose-dependente de viabilidade a célula (fig 1B). As reduções foram de 71%, 55% e 45% respectivamente as doses de 0,5mM, 1mM e 2mM. revelando um declínio significativo na viabilidade celular à medida que a concentração de MPP+ aumentava. Essas observações foram respaldadas por uma significância estatística evidente (p < 0,05) em todos os grupos experimentais. Com base nos resultados obtidos, a concentração de 1mM de MPP+ foi selecionada como a mais apropriada para a subsequente análise da expressão gênica. Essa escolha foi baseada na relação entre viabilidade celular e concentração de MPP+, reforçando a relevância desse ponto de concentração específico para a investigação da expressão gênica relacionada à Doença de Parkinson.

Pureza da Amostra

As amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica para avaliar a pureza do RNA extraído, as quais foram separadas em dois grupos, respectivamente contendo 5 controles e 6 amostra tratadas. com Divídios em 2 grupos, com os valores das médias respectivamente:

No Grupo 1, a amostra controle apresentou uma razão 260/280 nm de absorvância de 2,02 nm, indicandoboa qualidade da amostra com a alta presença de RNA . A razão 260/230 nm foi de 0,46 nm , sugerindo a presença de reagentes de extração e RNA. A amostra tratada com MPP+ apresentou uma razão 260/280 nm de 1,93 nm, relacionada à contaminação por RNA e proteínas, e uma razão 260/230 nm de 0,29 nm, sugerindo A presença de reagentes de extração e RNA, o que pode indicar a presença de guanossina.

No Grupo 2, a amostra controle apresentou uma razão 260/280 nm de 2,04 nm indicando a presença de RNA e proteínas. A razão 260/230 nm de absorvância foi de 0,45 nm, sugerindo a presença reagentes de extração e RNA, com possivelmente por guanossina. A amostra tratada com MPP+ exibiu uma razão 260/280 nm de absorvância de 1,89 nm, relacionada à RNA e proteínas. A razão 260/230 nm de absorvância foi de 0,34 nm, indicando a presença reagentes de extração e RNA, com possivelmente por guanossina.

Efeito de MPP+ sobre a expressão do MiR-7

No presente estudo, investigamos os efeitos do composto MPP+ na expressão do miR-7 em células SH-SY5Y. Foram conduzidas um total de 11 reações de qPCR, divididas em 2 grupos distintos, com o objetivo de avaliar as modificações na expressão gênica. As células foram expostas a 1mM de MPP+ por um período de 24 horas. Cada grupo foi submetido a uma reação.

A amplificação de miR-7 foi realizada utilizando seus primers e com os primers endogenos: RNU 19, miR-39 (C. elegans) e RNU 24, direcionados avaliar a expressão realtiva de miR-7. Os experimentos foram divididos em dois grupos, com 5 e 6 amostras em cada um.



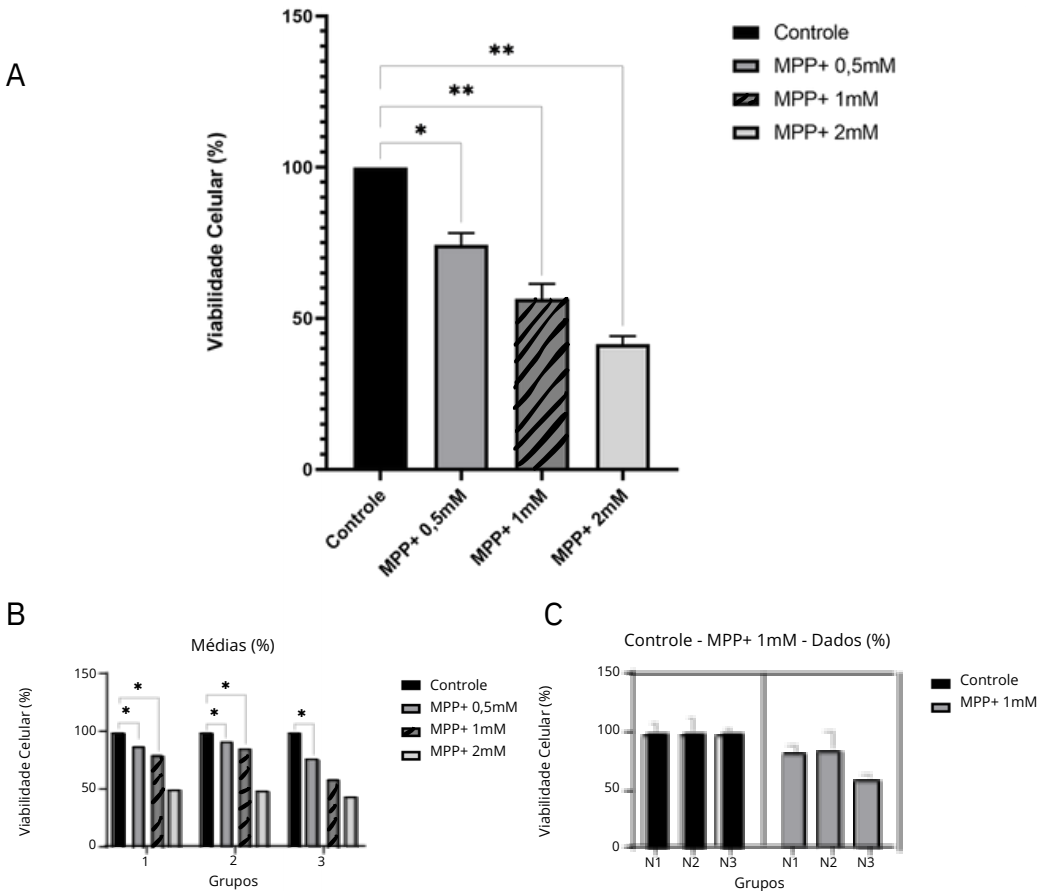


Fig 1: Análise de viabilidade celular.

**Fig. 1A: Variação da Viabilidade Celular em Resposta ao MPP+:** A Figura 2A ilustra a porcentagem de queda na viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, em relação à concentração intracelular de formazano. No eixo y, é apresentada a porcentagem de queda, enquanto no eixo x, estão indicados os três grupos experimentais correspondentes às diferentes doses de MPP+, tal como um amostra não tratada(Controle). Observa-se diminuição na viabilidade celular de forma diretamente proporcional ao aumento da concentração de MPP+ ao longo dos três períodos de tempo estipulados pelo ensaio. O asterisco acima denota o grau de significância estatística, ressaltando diferenças significativas entre os grupos.

**Fig. 1B: Variação da Viabilidade Celular em Resposta ao MPP+ entre os grupos:** A Figura 2B ilustra a porcentagem de queda na viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, em relação à concentração intracelular de formazano. No eixo y, é apresentada a porcentagem de queda, enquanto no eixo x, estão indicados os três grupos experimentais correspondentes às diferentes doses em cada uma das amostras ,Permitindo assim melhor observação da variância entre as amostras de forma individual. Observa-se uma diminuição na viabilidade celular. O asterisco acima denota o grau de significância estatística, ressaltando diferenças significativas entre os grupos.

**Fig. 1C: Comparação dos Grupos com Concentração de 1mM de MPP+:** A Figura 2C oferece uma comparação entre os grupos analisados com a concentração de 1mM de MPP+, dividindo-os entre os tratados e não tratados. Essa análise isolada permite observar de maneira mais clara e direta o efeito da concentração de 1mM de MPP+ na viabilidade celular dessas células.

controle e tratadas no primeiro experimento foi a seguinte: RNU 19 = -0,465, miR-39 (C. elegans) = -0,164 e RNU 24 = -0,268. A média da variação dos genes endógenos foi de -0,467, com um desvio padrão de 0,73.

No segundo experimento, os resultados foram: RNU 19 = 0,203, miR-39 (C. elegans) = -0,358 e RNU 24 = -1,246. A média da variação dos genes endógenos foi de -0,29, com um desvio padrão de 0,15.

O coeficiente de variação das amostras dos grupos controle e tratado é, respectivamente, 59,8% e 43,3% , indicando que a grande variância entre as amostras dos grupos citados no presente estudo. A qual pode-se levar a um maior cuidado quanto à média apresentada. O cálculo foi feito com base nos valores da média e do desvio padrão de cada amostra. Os valores do grupo controle são, respectivamente, 1,16 e 0,69 para mais ou para menos.

Já na amostra tratada, os valores são 0,70 e 0,30 ,para mais ou para menos. Os resultados geraram um total de 11 valores de expressão gênica. Todos os valores de CT para as amostras tratadas foram menores do que os das amostras não tratadas, demonstrando uma expressão

de 0,701 vezes de miR-7 no modelo in vitro para a doença de Parkinson. No entanto, o valor da estatística  $p > 0,05$ , indicando que não houve significância na diferença de expressão entre os grupos. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias, foram realizados testes t de Student para a média dos grupos. Os resultados finais apontaram para a não significância na alteração da expressão do miR-7 nas amostras tratadas com MPP+, quando comparadas às amostras não tratadas.

**Efeito de MPP+ sobre a Expressão do MiR-671**

No presente ensaio, investigamos os efeitos do composto MPP+ na expressão de miR-671 em células SH-SY5Y, foram conduzidas um total de 11 reações de qPCR, divididas em 2 grupos distintos, com o objetivo de avaliar as modificações na expressão gênica. As células foram expostas a 1mM de MPP+ por um período de 24 horas. Cada grupo foi submetido a reação.

A amplificação dos grupos controles foi realizada utilizando dois primers: miR-39 (C. elegans) e RNU 24. E dos grupos tratados foram :miR-39 (C. elegans), RNU 19 e RNU 24 genes os quais tiveram o propósito de endogenos para a avaliação da expressão

relativa. Direcionados ao miR-671. Os experimentos foram divididos em dois grupos, com 5 e 6 amostras em cada um.

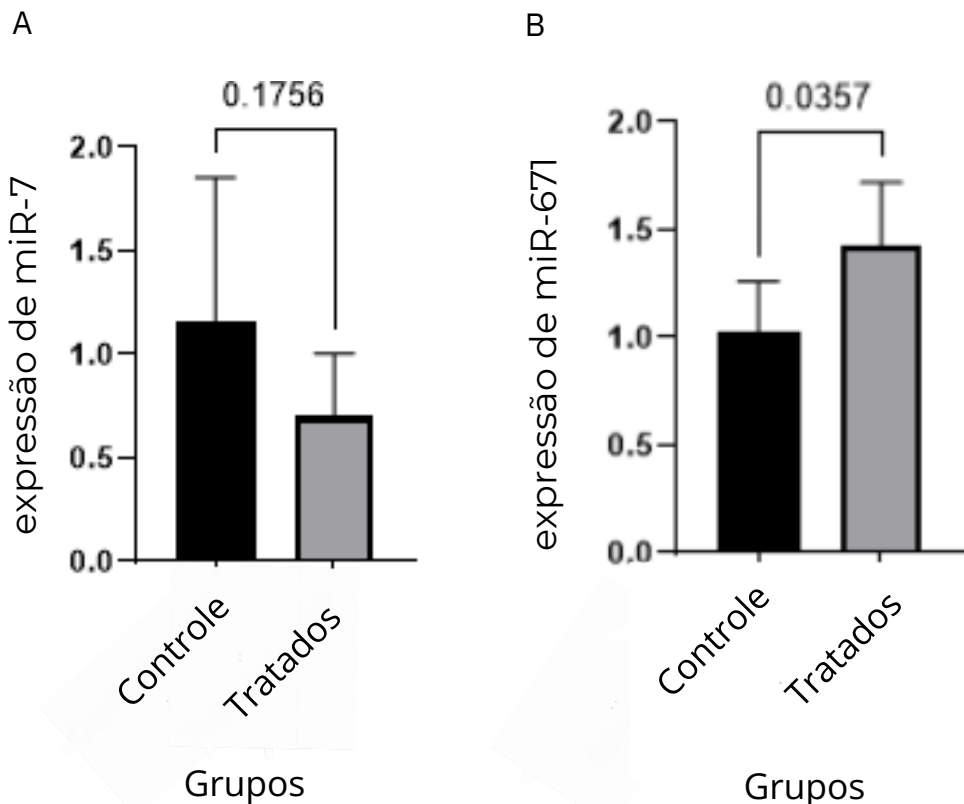
Nos dois experimentos, a variação dos genes endógenos entre as

amostras controle e tratadas no primeiro experimento foi a seguinte: RNU 19 = 0,465, miR-39 (C. elegans) = -0,164 e RNU 24 = -0,268. A média da variação dos genes endógenos foi 0,01, com um desvio padrão de 0,39.

No segundo experimento, os resultados foram: RNU 19 = 0,203, miR-39 (C. elegans) = -0,358 e RNU 24 = -0,203. A média da variação dos genes endógenos foi -0,28, com um desvio padrão de 0,10.

Os resultados geraram um total de 11 valores de expressão gênica. Todos os valores de CT das amostras tratadas foram superiores aos das amostras não tratadas, resultando em um valor de  $p < 0,05$ , o que demonstra significância estatística na diferença de expressão entre os grupos. Isso mostra o efeito de 1,42 vezes na expressão de miR-671

O coeficiente de variação das amostras dos grupos controle e tratado foi, respectivamente, 28,7% e 22,9%,



**Fig 2: Impacto do MPP+ na Expressão Gênica de microRNAs**

**Na Fig 2A, expressão de miR-7 em cada grupo experimental:** Na figura 2A é apresentada a análise da expressão do microRNA-7 (miR-7) em diferentes grupos experimentais. Nesse contexto, são comparadas as taxas de expressão entre amostras não tratadas (Controles miR-7) e aquelas tratadas com 1mM de MPP+ por um período de 24 horas (Tratados miR-7). Através dos resultados ilustrados na Figura 2A, é possível observar variações na expressão do miR-7 em resposta ao tratamento com MPP+. Os valores de significância estatística são apresentados acima dos dados, indicando os resultados da análise de teste t de Student realizada para cada um dos grupos analisados.

**A Fig 2B: expressão de miR-671 em todos os grupos experimentais:** Na figura 2B é apresentada a análise da expressão do microRNA-7 (miR-671) em diferentes grupos experimentais. Nesse contexto, são comparadas as taxas de expressão entre amostras não tratadas (Controles miR-671) e aquelas tratadas com 1mM de MPP+ por um período de 24 horas (Tratados miR-671). Através dos resultados ilustrados na Figura 2B, é possível observar variações na expressão do miR-671 em resposta ao tratamento com MPP+. Os valores de significância estatística são apresentados acima dos dados, indicando os resultados da análise de teste t de Student realizada para cada um dos grupos analisados.

indicando confiança na média apresentada devido à baixa variância entre as amostras citadas no presente estudo.

O cálculo foi feito com base nos valores da média e do desvio padrão de cada amostra, sendo os valores do grupo controle, respectivamente, 1,02 e 0,29 para mais ou para menos, e da amostra tratada, 1,42 e 0,32 ,para mais ou para menos.

Para avaliar a significância das diferenças entre as médias, foram realizados testes t de Student individuais para cada grupo. Os resultados finais indicaram significância na alteração da expressão do miR-671 nas amostras tratadas com MPP+, quando comparadas às amostras não tratadas.

## Discussão

A escolha da linha celular SH-SY5Y como modelo experimental na pesquisa da Doença de Parkinson (DP) é fundamentada na crescente evidência de sua semelhança fenotípica com neurônios dopaminérgicos, que desempenham um papel crucial na patologia da DP. As células SH-SY5Y têm sido amplamente utilizadas como um sistema in vitro para estudar as características da DP e avaliar possíveis terapias. Essa escolha é justificada pela expressão de marcadores neuronais e dopaminérgicos,

como a tirosina hidroxilase e a proteína alfa-sinucleína, que são relevantes para a DP. Além disso, a resposta a agentes neurotóxicos como o MPP+ tem sido observada nas células SH-SY5Y, fornecendo uma oportunidade para investigar os efeitos patogênicos dessa substância associada à DP.

A pesquisa conduzida neste estudo focou em avaliar a resposta da expressão gênica do miR-7 e seu microRNA regulador, miR-671, nas células SH-SY5Y após exposição ao MPP+. A metodologia incluiu a análise da expressão gênica dos alvos em comparação com os genes endógenos miR-39, RNU 19 e RNU 24, com o objetivo de entender como o MPP+ pode influenciar a expressão desses microRNAs.

Ao discutir os resultados do estudo, é essencial considerar a complexidade das respostas celulares diante de estímulos químicos. As respostas genéticas podem ser influenciadas por múltiplos fatores, incluindo interações complexas entre diferentes genes, vias de sinalização e a própria dinâmica celular. As variações observadas na expressão do miR-7 em relação aos genes endógenos miR-39 e RNU 24 em diferentes grupos demonstram a natureza multifacetada dessas respostas.

Embora não houve diferenças significativas na expressão de miR-7, houve redução na expressão do alvo em relação ao controle.

A não significância estatística observada pode ser atribuída ao expressivo valor do coeficiente de variação. Levando assim um maior cuidado em observar o resultado deste alvo, é provável que seja possível a observação de resultados maior coerentes sob este gene com amostras mais uniformes, e as sim podendo ser observado significância estatística.

## Conclusão

Este estudo investigou os efeitos do composto MPP+ na expressão de miR-7 e miR-671 em células SH-SY5Y, usando a técnica de qPCR para avaliar modificações na expressão gênica.

Os resultados mostraram que a exposição das células a 1mM de MPP+ por 24 horas resultou em alterações sutil na expressão do miR-7, que foram analisadas em comparação com os genes endógenos miR-39, RNU 19 e Rnu24.

Os resultados deste estudo sugerem que o MPP+ pode ter um impacto sutil na expressão do miR-7, enquanto há um aumento significativo na expressão do miR-671 nas células SH-SY5Y em comparação com as células não tratadas. Isso levanta a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender as nuances das interações moleculares envolvidas e como essas respostas podem estar relacionadas aos mecanismos patológicos da DP.

Em síntese, este estudo forneceu insights importantes sobre os efeitos de MPP+ na expressão de microRNAs em células SH-SH5Y. Embora algumas variações na expressão gênica tenham sido observadas, os resultados gerais não indicam impacto substancial relativo ao miR-7. No entanto, houve diferença significativa na expressão de miR-671. Esses achados destacam a complexidade das respostas genéticas às exposições químicas e ressaltam a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender completamente as interações moleculares envolvidas nessa rede de regulação gênica.

### Referências bibliográficas

1. Piwecka M, Glažar P, Hernandez-Miranda LR, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchuk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, Zywitzka V, Plass M, Schreyer L, Ayoub S, Kocks C, Kühn R, Rosenmund C, Birchmeier C, Rajewsky N. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*. 2017 Sep 22;357(6357). doi: 10.1126/science.aam8526. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28798046.
2. Li, B., Jiang, Y., Xu, Y., Li, Y., & Li, B. (2019). Identification of miRNA-7 as a regulator of brain-derived neurotrophic factor/ $\alpha$ -synuclein axis in atrazine-induced Parkinson's disease by peripheral blood and brain microRNA profiling. *Chemosphere*, 233, 542-548. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.05.064>.
3. Kleaveland, B., Shi, C., Stefano, J., & Bartel, D. (2018). A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell*, 174, 350-362.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.022>.
4. De Lau, L.M.; Breteler, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006, 5, 525-535.
5. Jankovic, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2008, 79, 368-376.
6. Hallett, P.J.; Engelender, S.; Isacson, O. Lipid and immune abnormalities causing age-dependent neurodegeneration and Parkinson's disease. *J. Neuroinflamm.* 2019, 16, 153.
7. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jun 5;19(6):586-93. doi: 10.1038/nsmb.2296. PMID: 22664986.
8. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem*. 2010 Apr 23;285(17):12726-34. doi: 10.1074/jbc.M109.086827. Epub 2010 Jan 27. PMID: 20106983; PMCID: PMC2857101.
9. Goh SY, Chao YX, Dheen ST, Tan EK, Tay SS. Role of MicroRNAs in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 12;20(22):5649. doi: 10.3390/ijms20225649. PMID: 31718095; PMCID: PMC6888719.
10. Shamsuzzama, Kumar L, Haque R, Nazir A. Role of MicroRNA Let-7 in Modulating Multifactorial Aspect of Neurodegenerative Diseases: an Overview. *Mol Neurobiol*. 2016 Jul;53(5):2787-2793. doi: 10.1007/s12035-015-9145-y. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25823513.
11. Zhou Y, Lu M, Du RH, Qiao C, Jiang CY, Zhang KZ, Ding JH, Hu G. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2016 Apr 16;11:28. doi: 10.1186/s13024-016-0094-3. PMID: 27084336; PMCID: PMC4833896.
12. Meccariello R, Bellenchi GC, Pulcrano S, D'Addario SL, Tafuri D, Mercuri NB, Guatteo E. Neuronal dysfunction and gene modulation by non-coding RNA in Parkinson's disease and synucleinopathies. *Front Cell Neurosci*. 2024 Jan 5;17:1328269. doi: 10.3389/fncel.2023.1328269. PMID: 38249528; PMCID: PMC10796818.
13. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jun 5;19(6):586-93. doi: 10.1038/nsmb.2296. PMID: 22664986.
14. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. miR-7 Replacement Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Gene Ther*. 2018;18(3):143-153. doi: 10.2174/1566523218666180430121323. PMID: 29714132.
15. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017 Jan 24;12(1):10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0. PMID: 28118852; PMCID: PMC5259880.
16. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Apr 20;123(8):1086-92. PMID: 20497720.
17. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017 Jan 24;12(1):10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0. PMID: 28118852; PMCID: PMC5259880.