

CAMILA HILLESHEIM HORST

**ASSINATURA ESTRIATAL DE MICRORNAS NO MODELO DA ROTENONA E
SUA MODULAÇÃO POR OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO CARREADO POR
NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA**

BRASÍLIA, 2019

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

CAMILA HILLESHEIM HORST

**ASSINATURA ESTRIATAL DE MICRORNAS NO MODELO DA ROTENONA E
SUA MODULAÇÃO POR OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO CARREADO POR
NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para 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
Co-orientadora: Dra. Simoneide Souza Titze-de-Almeida**

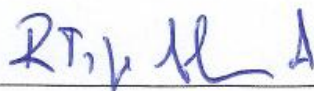
**Brasília
2019**

CAMILA HILLESHEIM HORST
ASSINATURA ESTRIATAL DE MICRORNAS NO MODELO DA ROTENONA E
SUA MODULAÇÃO POR OLIGONUCLEOTÍDEO SINTÉTICO CARREADO POR
NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA

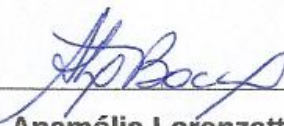
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 10 de JUNHO de 2019.

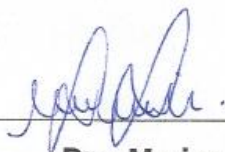
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida
Universidade de Brasília



Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília



Dra. Mariza Bortolanza
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram desde o início dessa jornada científica: muito obrigada por sempre acreditarem em mim e apoiarem o meu sonho! Obrigada por desde a minha infância incentivar o meu senso crítico, a minha curiosidade e de que eu deveria trabalhar com algo que fizesse meus olhos brilharem. Eu não seria metade da pesquisadora que sou se não fosse por vocês.

Ao meu irmão e minha cunhada, Fred e Sarah, por todos os cafés e almoços juntos na UnB discutindo sobre o mestrado, pelas brincadeiras para descontrair, pelos conselhos e apoio a respeito da carreira acadêmica e é claro, por toda a ajuda para a execução desse mestrado!

Ao meu querido companheiro e amor, Guilherme, por cada momento de apoio, consolo e trocas de ideias ao longo desses quatro anos de convivência. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e me mostrar o quanto eu amo fazer pesquisa, principalmente nos momentos em que achei que não era capaz ou quando os experimentos davam errado.

Aos meus orientadores, Ricardo Titze e Simoneide, por todo o investimento que realizaram na minha carreira durante esses seis anos. Foram muitos anos de convivência, experiência e progresso acadêmico que jamais esquecerei.

Ao professor Eduardo, Cristina e demais colegas de trabalho da minha visita técnica na Espanha: muito obrigada! Vocês me receberam de braços abertos e me acrescentaram uma experiência incrível de vida, me mostrando o quanto posso expandir o meu horizonte profissionalmente e pessoalmente! Vocês (e a cidade de Elche) sempre terão um lugar especial em meu coração.

Ao pessoal do laboratório Terapia Gênica, por todas as risadas, chocolates, brincadeiras, auxílios na pesquisa e consolos quando as coisas não iam bem. Em especial, à Paula, que simplesmente foi um anjo da guarda em meu mestrado, me ajudando e me instigando a sempre melhorar o meu projeto de pesquisa.

Ao pessoal do departamento da Faculdade de Agronomia e Veterinária, por todos os cafés na copa, os almoços, os encontros no corredor ou nos laboratórios. O carinho, as brincadeiras e risadas deixaram meus dias muito mais leves e alegres!

Aos meus melhores amigos, João e Edgar, por todo o carinho e apoio, mesmo estando quilômetros de distância. Ao meu melhor amigo Paulo, por também todo o

apoio desde o início da graduação e por disponibilizar o seu tempo para desenhar uma representação de um dos testes comportamentais para a minha dissertação.

À fundação de Apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo suporte financeiro e por ter me possibilitado trabalhar com um grupo de pesquisa que é referência mundial em sua área. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao professor Tatsuya Nagata e ao laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia, por todo o carinho e confiança em me disponibilizar o vibrátomo. A ajuda de vocês e o equipamento foram vitais para o término da pesquisa!

Finalizo com o meu agradecimento mais que especial à Universidade de Brasília: obrigada pelo financiamento e reconhecimento durante esses seis anos de graduação e mestrado; mas principalmente obrigada por ser um lugar tão prazeroso de se trabalhar e estudar. Um dos maiores motivos em que eu ainda me sinto realizada em fazer pesquisa é por saber que faço parte dessa maravilhosa universidade.

“Saber perguntar é mais importante do que achar as respostas. A resposta é regozijo passageiro, temporário, mas as perguntas não. Elas mantêm o método vivo, garantem o processo e o ser-que-busca.”
(Gustavo de Castro e Florence Dravet)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem cerebral complexa que afeta cerca de 3% da população mundial acima de 65 anos. Os sinais motores característicos da doença incluem rigidez, tremores e bradicinesia, sendo resultados da degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta. Um fator agravante da doença consiste no seu diagnóstico: pacientes quando identificados clinicamente com Parkinson já apresentam perda de 40 - 60% de neurônios dopaminérgicos. O tratamento considerado padrão para DP consiste na reposição do neurotransmissor dopamina mediante medicação com L-dopa. No entanto, é apenas sintomático, e mais efetivo nos estágios iniciais da doença. Além disso, seu uso crônico induz severos efeitos colaterais motores, as discinesias. Fármacos modificadores da doença - *disease modifying drugs* - capazes de retardar a progressão parkinsoniana possuem potencial em mudar o prognóstico da desordem, mas ainda estão em fase de testes. MicroRNAs são potenciais alvos terapêuticos. O presente trabalho objetivou investigar se microRNAs são expressos de maneira aberrante no estriado de animais parkinsonianos (etapa 1), e se é viável modular esta expressão mediante injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de oligonucleotídeos sintéticos carregados por nanopartículas magnéticas (etapa 2). Nesta primeira etapa, ratos receberam injeções da neurotoxina rotenona (2,5 mg/kg, i.p., diariamente por dez dias). A neurotoxina causou prejuízo motor, neurodegeneração com perda de células TH (+) nigroestriatais, bem como neuroinflamação, aqui evidenciada pela microgliose. MicroRNAs apresentaram-se aberrantemente expressos no estriado destes animais, havendo aumento significativo de miR-26a, miR-132 e miR-34a, e depleção de miR-7 e Let7a. Uma vez confirmada a hipótese da expressão aberrante dos miRNAs, a segunda etapa do trabalho consistiu em avaliar o *delivery* cerebral de modulares de miRNAs por partículas magnéticas - NeuroMag – injetados no ventrículo lateral por cirurgia estereotáxica. NeuroMag transfectou de forma eficiente os oligos no estriado. Oligos marcados com fluoresceína foram visualizados em neurônios estriatais e astrócitos, mediante microscopia confocal. Finalmente, avaliamos se os efeitos da reposição do microRNA-7 (miR-7 *mimic*, 0,36nmol) carregados por NeuroMag (0,68µL) via injeção i.c.v., em animais submetidos à rotenona por dez dias consecutivos (3mg/kg, i.p.). Os

resultados revelaram que o grupo rotenona previamente transfetado com Mimics7 apresentou maior expressão de neurônios nigrais TH positivos, assim como reduzida microgliose na substância negra em relação ao grupo NeuroMag. Tais resultados sugerem que a estratégia de modulação de miR-7 via oligonucleotídeos sintéticos carregados por NeuroMag possui potencial neuroprotetor no modelo de neurodegeneração induzido por rotenona.

Palavras-chaves: microRNA; Parkinson; rotenona; NeuroMag; miR-7 *mimic*; RNAi; neurodegeneração; neurônio dopaminérgico.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a complex brain disorder that affects about 3% of the world's population over 65 years. The motor signals characteristic of the disease include stiffness, tremors, and bradykinesia, being results of the progressive degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. An aggravating factor of the disease is its diagnosis: patients once clinically identified with Parkinson's already present loss of 40-60% of dopaminergic neurons. The treatment considered standard for PD consists of the replacement of the neurotransmitter dopamine by medication with L-dopa. However, it is only symptomatic and more effective in the early stages of the disease. Furthermore, its prolonged use induces severe motor side effects, as dyskinesias. Disease-modifying drugs - capable of delaying Parkinsonian progression has the potential to change the prognosis of the disorder but are still in the testing phase. MicroRNAs are potential therapeutic targets. The present work aimed to investigate whether microRNAs are aberrantly expressed in the striatum of parkinsonian animals (step 1) and whether it is possible to modulate this expression by intracerebroventricular (i.c.v.) injection of synthetic oligonucleotides carried by magnetic nanoparticles (step 2). In this first step, rats received injections of the neurotoxin rotenone (2.5 mg/kg, i.p., daily for ten days). The neurotoxin caused motor impairment, neurodegeneration with loss of TH (+) nigrostriatal cells, as well as neuroinflammation, evidenced here by microgliosis. Animals presented an aberrant striatal expression of the microRNAs evaluated, with a significant increase of miR-26a, miR-132 and miR-34a, and depletion of miR-7 and Let7a. Once the hypothesis of the aberrant expression of the miRNAs was confirmed, the second stage of the study consisted of evaluating the cerebral delivery of miRNAs by magnetic particles - NeuroMag - injected into the lateral ventricle by stereotactic surgery. NeuroMag efficiently transfected the oligos in the striatum. Fluorescein-labeled oligos were visualized in striatal neurons and astrocytes by confocal microscopy. Finally, we evaluated the effects of replacement of microRNA-7 (miR-7 mimic, 0.36nmol) carried by NeuroMag (0.68 μ L) via i.c.v. injection in animals submitted to rotenone for ten consecutive days (3mg/kg, i.p.). The results showed that the rotenone group previously transfected with miR-7 mimic showed high expression of TH nigral positive neurons as well as reduced microgliosis in the substantia nigra

when compared to the NeuroMag group. Such results suggest that the strategy of miR-7 replacement by Neuromag-structured synthetic oligonucleotides has a neuroprotective potential in the model of neurodegeneration induced by rotenone.

Keywords: microRNA; Parkinson; rotenone; NeuroMag; miR-7 mimic; RNAi; neurodegeneration; dopaminergic neuron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da neurodegeneração dopaminérgica na doença de Parkinson.....	18
Figura 2. Mecanismo de toxicidade da rotenona.....	21
Figura 3. Biogênese dos microRNAs.....	24
Figura 4. Esquema ilustrativo do modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona.....	30
Figura 5. Representação dos parâmetros avaliados no Teste do campo aberto.....	31
Figura 6. Ilustração dos critérios de avaliação do teste da ponte.....	32
Figura 7. Representação esquemática da transfecção utilizando a técnica de <i>magnetofection</i> para entrega de oligonucleotídeos em células cerebrais de rato.....	36
Figura 8. Esquema ilustrativo do experimento de reposição do microRNA 7 em animais parkinsonianos induzido por rotenona.....	39
Figura 9. Atividade exploratória e locomotora dos animais dos grupos rotenona e controle pelo Teste do campo aberto.....	44
Figura 10. Coordenação motora dos grupos controle e rotenona.....	45
Figura 11. Detecção por imuno-histoquímica de neurônios TH (+) na via nigroestriatal de ratos.....	47
Figura 12. Marcação de neurônios nigroestriatais com Fluoro-Jade B®.....	47
Figura 13. Detecção de microgliose no estriado e substância negra.....	48
Figura 14. Avaliação da expressão gênica de microRNAs no estriado de animais expostos à rotenona.....	50
Figura 15. Injeção intracerebroventricular de oligos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) complexado com NeuroMag para transfecção de células estriatais.....	52
Figura 16. Identificação de neurônios dopaminérgicos na SN direita de animais parkinsonianos previamente tratados com miR-7 <i>mimic</i>	55
Figura 17. Avaliação de microgliose com imunomarcagem de Iba-1 na SN direita de animais parkinsonianos previamente tratados com miR-7 <i>mimic</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – avidina-biotina-peroxidase
AGO – Proteína Argonauta
ANOVA - Análise de variância
AntagomiR – oligonucleotídeos inibidores de microRNA
ATP - Adenosina trifosfato
BCL2 - Linfoma de células B2
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA - Soroalbumina bovina
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Cq – Ciclo de quantificação
Ct – Ciclo limiar
CuSO₄ - Sulfato cúprico
DAB - 3,3-diaminobenzidina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
DP - Doença de Parkinson
EPM - Erro Padrão da Média
EtOH - Etanol
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FJB - Fluoro-Jade B®
GFAP - Proteína fibrilar ácida da glia
Iba-1 - Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1
i.c.v. - Intracerebroventricular
IgG – Imunoglobulina G
IL - Interleucina
iNOS - NO sintase induzida
i.p. - Intra-peritoneal
Keap1 - ECH tipo Kelch 1
KMNO - Permanganato de potássio
L-DOPA - Levedopa
miRNA – microRNA

miR-7 - microRNA 7
miR-7 mimic – oligonucleotídeos imitadores de miR-7
MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NaOH - Hidróxido de sódio
NeuN - Antígeno nuclear neuronal
Nrf2 - Fator nuclear E2
Nurr1 - Receptor nuclear 1
PBS - Solução tampão fosfato em salina
PFA - Paraformaldeído
Pol II - RNA Polimerase II
PTP - Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA – Ácido ribonucleico
RNAi - RNA interferente
RNAm – RNA mensageiro
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SH-SY5Y – Linhagem celular representativa de neurônios dopaminérgicos
SIRT1 - Regulador de informação silenciosa 1
SN - Substância Negra
SNC - Sistema Nervoso Central
SNpc - Substância Negra pars compacta
SPSS - Pacote Estatístico para as Ciências Sociais
TBST - Tampão salina tamponado com Tris
TCA - Teste do campo aberto
TH - Tirosina Hidroxilase
TP - Teste da ponte
UTR - Região não traduzida
VDAC1 - Canal aniônico dependente de voltagem 1
6-OHDA - 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	17
1.2 ROTENONA COMO MODELO DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL....	20
1.3 MICRORNAS.....	23
1.3.1 Conceito e biogênese de microRNAs.....	23
1.3.2 miR-7 na Doença de Parkinson.....	25
2.4 <i>DELIVERY</i> DE OLIGONUCLEOTÍDEOS NANOPARTICULADOS PARA MODULAÇÃO DO CONTEÚDO DE MICRORNAS.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 GERAL.....	28
2.2 ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 PARTE I: NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA E EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM ANIMAIS PARKINSONIANOS.....	29
3.1.1 Animais.....	30
3.1.2 Preparo da rotenona.....	30
3.1.3 Avaliação da atividade locomotora pelo Teste do campo aberto...31	31
3.1.4 Avaliação da coordenação motora pelo Teste da ponte.....31	31
3.1.5 Processamento do tecido cerebral.....	33
3.1.6 Imuno-histoquímica de Tirosina hidroxilase (TH) e Iba-1.....33	33
3.1.7 Método de Fluoro-Jade B®.....	34
3.1.8 Quantificação de microRNAs por RT-qPCR.....	35
3.2 PARTE II: REGULAÇÃO DO CONTEÚDO DE MICRORNAS MEDIANTE ENTREGA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS CARREADOS POR NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA – NEUROMAG.....	36
3.2.1 Preparo de oligonucleotídeos carregados por nanopartículas magnéticas para injeção intracerebral.....	37
3.2.2 Cirurgia estereotáxica e injeção intracerebral	37
3.2.3 Imuno-histoquímica para análise do <i>delivery</i> dos oligonucleotídeos no estriado.....	38

3.3 PARTE III: INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE IMITADOR DE MIR-7 CARREADO POR NEUROMAG PARA REDUZIR A INJÚRIA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NIGRAIS INDUZIDA POR ROTENONA.....	39
3.3.1 Preparo de oligonucleotídeos magnetanoestruturados para injeção intracerebral.....	40
3.3.2 Administração de rotenona.....	40
3.3.3 Imuno-histoquímica para análise da TH e microgliose.....	41
3.3.4 Análise Estatística	41
3.3.5 Comitê de Ética.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 PARTE I: NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA E EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM ANIMAIS PARKINSONIANOS.....	43
4.1.1 Efeitos da rotenona sobre o comportamento exploratório e coordenação motora de ratos.....	43
4.1.2 Neurodegeneração da via nigroestriatal de ratos induzida por rotenona.....	46
4.1.3 Avaliação de microgliose na via nigroestriatal de animais parkinsonianos.....	48
4.1.4 Perfil de expressão de microRNAs no estriado de animais parkinsonianos.....	49
4.2 PARTE II: DELIVERY DE OLIGONUCLEOTÍDEOS VIA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR POR TECNOLOGIA DE MAGNETOFECTION...51	51
4.2.1 Transfecção de oligos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em células estriatais de ratos, utilizando-se NeuroMag e campo magnético.....	51
4.3 PARTE III: INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE IMITADORES DE MIR-7 E EFEITOS SOBRE DEGENERAÇÃO NIGRAL NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA.....	53
4.3.1 Efeitos de miR-7 na degeneração e microgliose da Substância Negra.....	53
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	68

7. REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A - <i>THE INVOLVEMENT OF EAG1 POTASSIUM CHANNELS AND MIR-34A IN ROTENONE-INDUCED DEATH SH-SY5Y CELLS</i>.....	82
APÊNDICE B - <i>SIGNATURE OF ABERRANTLY EXPRESSED MICRORNAS IN THE STRIATUM OF ROTENONE-INDUCED PARKINSONIAN RATS</i>.....	83
APÊNDICE C - <i>DELIVERY OF MIRNA-TARGETED OLIGONUCLEOTIDES IN THE RAT STRIATUM BY MAGNETOFECTION WITH NEUROMAG</i>.....	84
ANEXO A - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA UNB DOC Nº 2267/2015.....	85
ANEXO B - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA UNB DOC Nº 45524/2016.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita inicialmente em 1817, por James Parkinson. Em seu trabalho “Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante”, o médico relata seis casos, descrevendo a condição observada como movimento trêmulo involuntário e propensão de curvar o tronco para a frente, assim como caminhar mais rapidamente (1). Patologicamente, o distúrbio foi caracterizado inicialmente em 1912, com a descoberta dos corpos de Lewy, seguido dos achados da substância negra despigmentada com perda neuronal e gliose em 1919 (2, 3). A participação da dopamina no desenvolvimento da DP foi hipotetizada a partir de 1957, sendo confirmada sua depleção em cérebros de pacientes com Parkinson em 1960. Nesse sentido, a reposição de Levedopa (L-DOPA) – precursor da dopamina – representou um marco terapêutico, sendo considerado tratamento padrão ouro desta desordem neurológica. Somente em 1997 um dos elementos mais estudados atualmente nesta doença foi descoberto: a alfa-sinucleína. Spillantini e colegas demonstraram a presença da proteína nos corpos de Lewy, correlacionando o aumento de sua produção com o desenvolvimento da doença de Parkinson (4). Dessa forma, o conhecimento acerca do distúrbio avançou intensamente nas últimas décadas; no entanto, o quadro neuropatológico detalhado da DP necessita ainda ser elucidado (5).

Considerada a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, o Parkinson afeta 3% da população mundial acima de 65 anos (6-8). Clinicamente é caracterizada por sinais motores, incluindo tremores, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural (9). Sintomas não motores também podem estar presentes até 10 anos antes do diagnóstico, como disfunção olfatória, depressão, distúrbios do sono e declínio cognitivo (10).

O prejuízo motor é resultado da morte progressiva de neurônios da via nigroestriatal e consequente diminuição dos níveis de dopamina (11). Neurônios desta via dopaminérgica têm corpos celulares localizados na substância negra pars compacta (SNpc) e que projetam axônios para o caudado e putâmen, regiões

cerebrais que compõem o estriado (Figura 1) (11). Com a morte dessas células, diminuem-se os níveis de neuromelanina e surge a típica despigmentação da SNpc (12). Um dos agravantes da doença consiste no diagnóstico relativamente tardio, ou seja, quando os pacientes já perderam 40-60% das células dopaminérgicas (13-15).

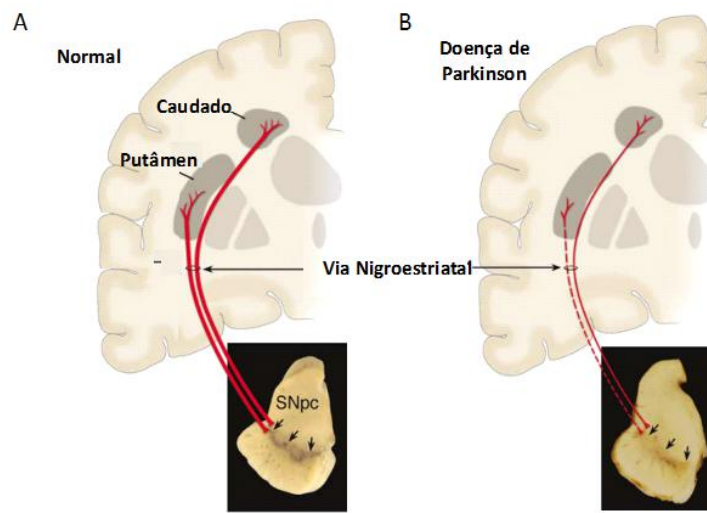


Figura 1. Esquema representativo da neurodegeneração dopaminérgica na doença de Parkinson. (A) A via nigroestriatal em indivíduos saudáveis é composta por neurônios dopaminérgicos – cujo corpo celular localiza-se na substância negra pars compacta (SNpc), e com projeções (em vermelho) direcionadas ao estriado, composto pelo caudado e putâmen. É possível observar a pigmentação normal da SNpc. (B) A neurodegeneração do Parkinson causa perda de neurônios nigrais, evidenciado pela diminuição de pigmentação da neuromelanina na SNpc. O prejuízo da transmissão dopaminérgica estriatal (linhas vermelhas, pontilhada e fina, e redução de terminações axônicas estriatais) acarretará na sintomatologia motora característica da doença. (Adaptado de Dauer e Przedborski, 2003). SNpc: Substância Negra pars compacta.

Os mecanismos moleculares que levam à perda de neurônios nigroestriatais não estão totalmente elucidados. Estudos indicam que o processo neurodegenerativo envolve diversos fatores patogênicos, como presença de corpos de Lewy - inclusões citoplasmáticas compostas por agregados proteicos de alfa-sinucleína e ubiquitina, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neuroinflamação, bem como estresse do retículo endoplasmático (16-20).

Etiologicamente, o Parkinson é complexo e envolve fatores genéticos e ambientais (8). Nesse sentido, 15 genes e *loci* gênicos já foram descritos no distúrbio familiar (21). Mutações nos genes SNCA, *Parkin* e LRKK2 causaram perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra e estriado (22-25). No entanto, apenas 10% dos casos de DP decorrem de mutações genéticas (26, 27).

Considerando que 90% dos diagnósticos da desordem neurológica são não-familiares (27, 28), isto é, não estão relacionados com fatores genéticos, é possível sugerir que os fatores ambientais possuem um papel no desenvolvimento da doença. Nesse sentido, hipotetiza-se que a exposição crônica a neurotoxinas poderia desencadear uma cascata de vias celulares deletérias que resultariam no quadro parkinsoniano (11). Trabalhos epidemiológicos sugerem que pesticidas, metais pesados e solventes são fatores ambientais que também podem contribuir para o desenvolvimento da doença (29-31). Estudo anterior revelou que a intoxicação com MPTP induziu características semelhantes aos de pacientes parkinsonianos (32).

A L-dopa é considerada o principal tratamento para a desordem de Parkinson. Precursor da dopamina, o fármaco auxilia na reposição dos níveis estriatais do neurotransmissor. A estratégia terapêutica é eficiente no controle de sinais motores característicos dos estágios iniciais de DP, como tremor e rigidez postural (9). Entretanto, seus efeitos são apenas sintomáticos. Como consequência, a neurodegeneração progride e o tratamento perde progressivamente a sua eficácia. O uso crônico do precursor da dopamina também induz sérios efeitos colaterais, como discinesia e flutuações motoras (33).

Como exposto anteriormente, o Parkinson afeta, em sua maioria, indivíduos acima de 60 anos. O crescente envelhecimento da população pode, desta forma, contribuir para aumento da prevalência mundial desta desordem neurodegenerativa (8). Segundo os pacientes, é possível viver com os sintomas iniciais da doença, mas é desejável um tratamento capaz de evitar sua progressão para estágios incapacitantes (9). O estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes para reduzir ou retardar a morte dos neurônios nigroestriatais faz-se, portanto, urgente. Para tanto, é relevante o uso de modelos animais para a investigação dos aspectos patológicos e moleculares da doença, visando identificar-se novos alvos terapêuticos para o Parkinson.

1.2 ROTENONA COMO MODELO DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL

Historicamente, modelos animais baseados em neurotoxinas são alvos de intensa investigação por recapitularem aspectos neuropatológicos parkinsonianos (11, 34, 35). Atualmente, existem quatro preparações experimentais baseadas em toxinas que recapitulam a DP e são válidas para estudo da doença: 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), paraquat e rotenona (35, 36). Quanto a testes pré-clínicos, é particularmente importante que o modelo simule as características do distúrbio estudado, incluindo a degeneração progressiva de neurônios nigroestriatais, formação de corpos semelhantes aos de Lewy, bem como o prejuízo motor responsivo à terapia de reposição de dopamina. Obviamente, não existe modelo capaz de reproduzir todas estas características. As toxinas clássicas utilizadas para o estudo da DP - 6-OHDA e MPTP-, por exemplo, não conseguem reproduzir a formação de corpos semelhantes aos de Lewy, marco patológico da doença (34, 37). A escolha do modelo experimental, portanto, deverá considerar a pergunta biológica que se pretende responder.

Quanto ao modelo da rotenona, trata-se de inseticida e pesticida pertencente à família dos rotenoides (38, 39). Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição a pesticidas é fator de risco para o Parkinson (29). De fato, rotenona induz o bloqueio do complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, seguido da redução de adenosina trifosfato (ATP) e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo diminuição dos níveis da glutathiona, aumento do estresse oxidativo e morte celular (Figura 2) (38, 40). A inibição do complexo I mitocondrial resulta na degeneração de ramificações das terminações neuronais dopaminérgicas no estriado e dos corpos celulares na substância negra, reproduzindo características fisiopatológicas parkinsonianas. Neste sentido, Betarbet et al. mostrou que a administração crônica de rotenona induz prejuízo motor, estresse oxidativo, agregados de alfa-sinucleína, corpos semelhantes aos de Lewy, disfunção mitocondrial e proteossomal, bem como neuroinflamação e acúmulo de ferro nos neurônios da SNpc (41).

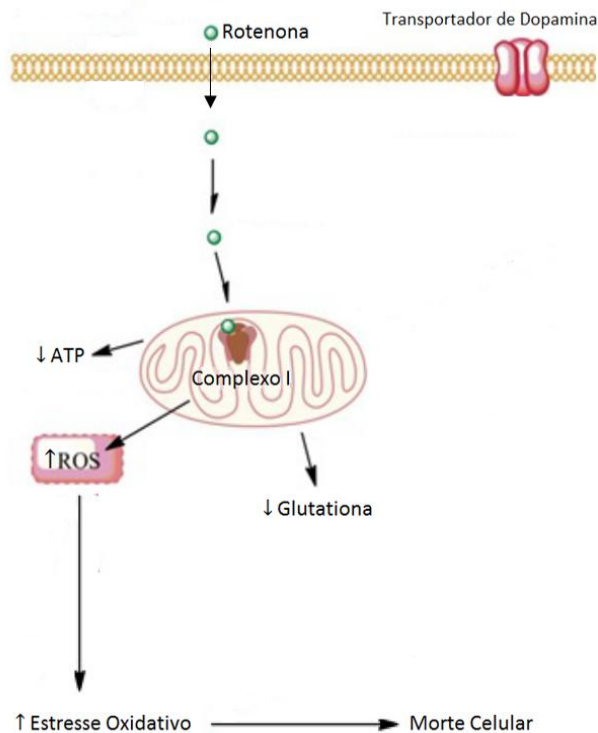


Figura 2. Mecanismo de toxicidade da rotenona. A toxina é lipofílica e assim atravessa a bicamada lipídica celular por difusão simples. Uma vez bloqueado o complexo mitocondrial I, há uma redução de ATP seguido de elevação de espécies reativas de oxigênio (ROS), com consequente diminuição dos níveis de glutatona e aumento do estresse oxidativo, culminando na morte celular (Adaptado de Cabezas et al., 2013).

O modelo da rotenona possui importantes vantagens para representar a neurodegeneração do Parkinson, a saber: i. A toxina é lipofílica, sendo capaz, portanto, de atravessar a barreira hematoencefálica; ii. Independe de transportador de dopamina para acessar o citoplasma (38), o que permite a administração da rotenona por vias menos invasivas, se destacando do modelo da 6-OHDA, por exemplo, cuja administração é por injeção intracerebral; iii. A preparação experimental da rotenona é a única, atualmente, dos modelos neurotóxicos a reproduzir agregados de alfa-sinucleína e corpos semelhantes aos de Lewy (31, 41,

42); e iv. Estudos reportaram inibição do complexo I em pacientes parkinsonianos (35, 43, 44).

A neurotoxina por ser administrada pelas via oral (45, 46), sistêmica - intravenosa (47), subcutânea (48) e intraperitoneal (i.p.) (31) - e intracerebral (49-51). Animais expostos à rotenona via i.p. apresentaram perda de 28% - 45% de neurônios TH positivos da substância negra (31, 42, 52), assim como perda de 25% - 55% de níveis estriatais de dopamina (31, 42, 52). A administração de apomorfina e L-DOPA provocaram melhora nos sinais motores de animais parkinsonianos induzidos pela toxina, revelando que o modelo é responsivo a reposição de dopamina, ou seja, tem validade preditiva (31, 53).

Entretanto, estudos sugeriram que o modelo da rotenona induz alta variabilidade na perda dopaminérgica e mortalidade, além de não representar de forma adequada a correlação entre os sinais motores e a perda de neurônios nigroestriatais, resultando na depleção de dopamina. O uso de injeções i.p. crônicas com ácidos graxos (óleo de girassol) como veículo de diluição da neurotoxina auxiliou a superar tais limitações (31, 42, 52, 54-56). O estabelecimento de um método de administração que reproduz de forma consistente as características fisiopatológicas da PD é relevante, pois permite o uso do modelo da rotenona para estudos de neuroproteção na terapia do Parkinson.

Quanto à validade de semelhança, reforçamos que o modelo da rotenona reproduz características comportamentais e patológicas da doença de Parkinson - incluindo os dois marcos patológicos: degeneração nigroestriatal e acúmulo intracelular de sinucleína. Por fim, o ensaio pré-clínico apresenta mecanismos de neurodegeneração subjacentes aos que ocorrem na DP, como a inibição do complexo I que leva à formação de corpos Lewy, culminando na perda de neurônios dopaminérgicos (41).

Diante do exposto, conclui-se que o modelo da rotenona possui satisfatórias validades de semelhança, preditiva, e de construto teórico (42), sendo uma preparação experimental relevante para estudo de mecanismos patológicos da doença de Parkinson (35).

1.3. MICRORNAS E O PAPEL DE MIR-7 NO PARKINSON

1.3.1 Conceito e biogênese de microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codantes em dupla fita, contendo cerca de 22 nucleotídeos. Estas moléculas regulam a expressão de RNAs mensageiros alvo via interferência de RNA (RNAi). Trata-se de um processo biológico natural onde a síntese do miRNA se inicia no núcleo celular e termina no citoplasma. Após um processo de maturação do miRNA no citoplasma, o silenciamento do RNA mensageiro ocorre com o auxílio de um complexo de proteínas (57, 58) (Figura 3). Resumidamente, o miRNA primário - pri-miRNA - é transcrito pela RNA polimerase II da região intergênica ou intrônica do gene alvo (59-61). A seguir, o pri-miRNA é reconhecido e processado pelo complexo enzimático Drosha/DGCR8 em uma sequência de 70 nucleotídeos em formato de *hairpin* (62). Uma vez formado o pre-miRNA, a sequência é transportada para o citoplasma via exportina 5, sendo posteriormente processada pela enzima Dicer, resultando em uma dupla fita de apenas 22 nucleotídeos (63, 64). Este *duplex* é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde a proteína Argonata (AGO) remove a fita *sense*. A fita do microRNA que permanece no complexo RISC, fita *guide*, guia o complexo RISC até o RNA mensageiro (RNAm) alvo, acoplando-se de forma parcial à região 3' não traduzida (3'UTR) do RNAm (65). Como consequência, ocorre redução da estabilidade e da tradução do RNAm alvo. Tal fenômeno é conhecido como silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (65, 66).

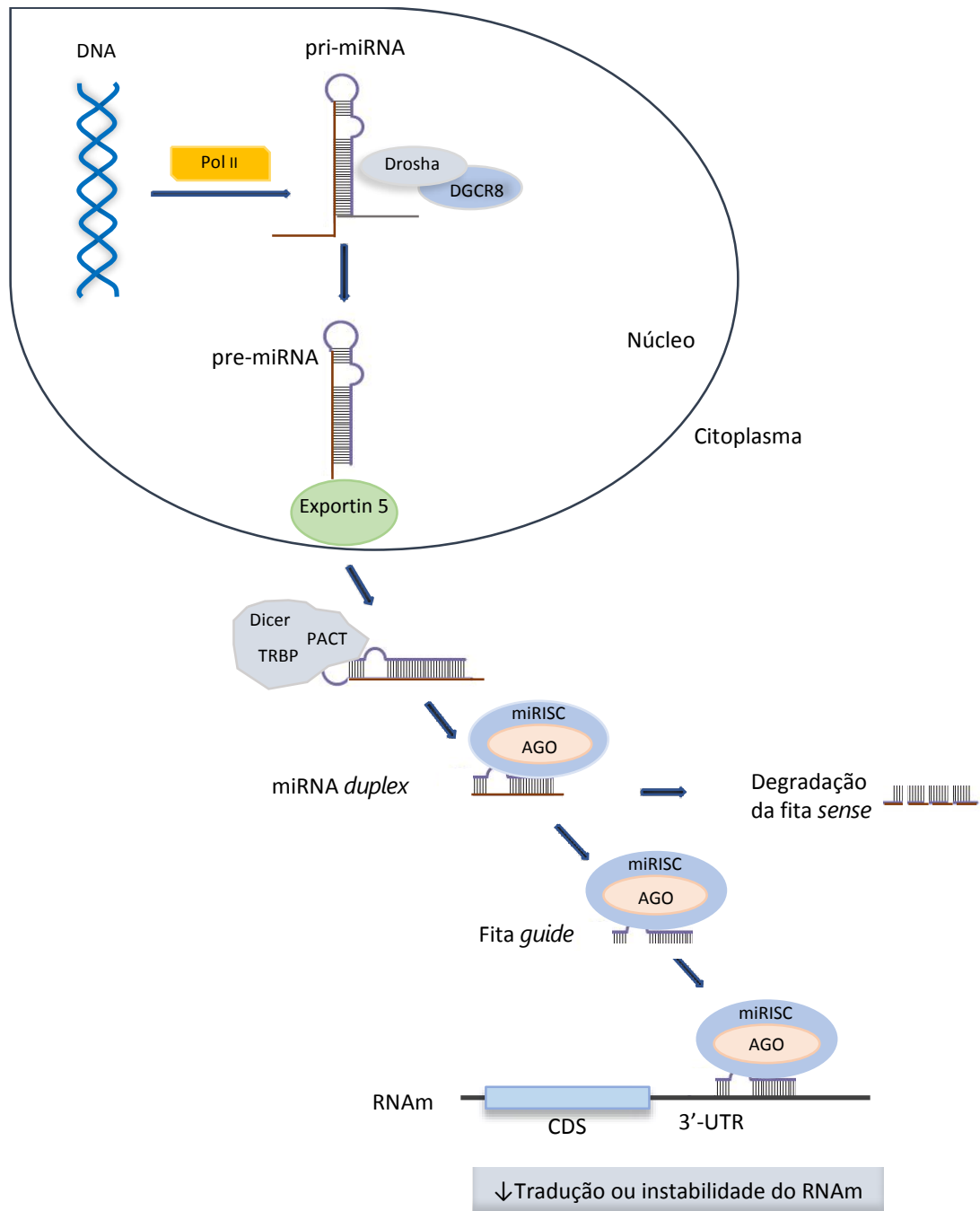


Figura 3. Biogênese dos microRNAs. Os microRNAs primários são transcritos pela RNA polimerase II e processados pela RNA polimerase II e processados pelo complexo Drosha/DGR8, formando os pre-miRNAs. A seguir, são transportados para o citoplasma via exportina 5, sendo posteriormente clivados pela Dicer 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. (Adaptado de Titze-de-Almeida et al., 2018) UTR: *Untranslated Region*.

MicroRNAs podem ser encontrados em plantas, vírus, fungos e diversas espécies de animais (67). Em humanos, o cérebro é o órgão que apresenta a maior expressão de miRNAs. Tal achado está associado ao papel crucial destes RNAs regulatórios em processos de neuroplasticidade, desenvolvimento embrionário, neurogênese e fisiologia do sistema nervoso (68-70). Considerando que um microRNA regula centenas de genes alvos via RNAi, sua expressão desregulada pode causar severas consequências cerebrais e assim contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como o Parkinson (71, 72). Conforme citamos, a expressão aberrante desses RNAs induz disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade, morte celular e formação de agregados de alfa-sinucleína (73).

As vias de regulação dos microRNAs têm sido alvo de intensa investigação quanto ao seu envolvimento em mecanismos ligados à progressão do Parkinson (68, 74, 75). O potencial uso de miRNAs como biomarcadores para diagnóstico e tratamento da doença também é um tema crescente nas pesquisas científicas (69, 76-78). Além dos efeitos dos miRNAs sobre determinados RNAs alvos, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* evidenciaram a relevância da regulação das vias dos microRNAs na viabilidade de células dopaminérgicas (79). A eliminação da proteína Dicer, por exemplo, que participa da biogênese dos miRNAs (Figura 3), causa significativa morte celular dopaminérgica assim como redução de neurogênese *in vitro*. Em modelo animal, a ausência desta proteína induz perda progressiva de processos axonais nigroestriatais e neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, implicando no comprometimento motor (79).

1.3.2. miR-7 na Doença de Parkinson

Um dos aspectos relevantes das desordens neurodegenerativas é o acúmulo de proteínas patogênicas em determinados tipos celulares (80). No que se refere à DP, a proteína alfa-sinucleína pode agregar-se patologicamente nos corpos celulares e neuritos de neurônios apoptóticos (4, 81). O excesso da proteína é prejudicial para neurônios dopaminérgicos, resultando em morte celular e consequente comprometimento motor (82-84).

A alfa-sinucleína possui na sua região 3'UTR uma sequência alvo para interação com o microRNA 7 (85, 86). Estudos *in vitro* e *in vivo* revelam a depleção de miR-7 em células expostas à toxina MPTP (85). MiR-7 também está reduzido na substância negra de pacientes parkinsonianos (87). Tais achados indicam que a desregulação de miR-7 tem papel no processo neurodegenerativo, demonstrando ser este microRNA um alvo promissor para a terapia do Parkinson.

Em síntese, microRNAs são essenciais para a função motora, desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso (70) e tem potencial biotecnológico, resguardados os desafios para sua implementação como agentes terapêuticos ou marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico da doença de Parkinson (86), (88-91).

2.4 DELIVERY DE OLIGONUCLEOTÍDEOS NANOPARTICULADOS PARA MODULAÇÃO DO CONTEÚDO DE MICRORNAS

Apesar de a tecnologia de RNAi ser alvo de intensa investigação e de testes pré-clínicos, a modulação do conteúdo de microRNAs no tecido cerebral persiste como um desafio a ser superado (57). As barreiras que dividem os espaços aquosos do corpo são compostas por ácidos graxos, tornando-se um obstáculo para a absorção e distribuição de compostos químicos polares, como as cadeias polinucleotídicas dos microRNAs (92). No que se refere ao sistema nervoso central, a presença da barreira hematoencefálica torna a região difícil de ser acessada por tais RNAs regulatórios. Para tanto, é necessário o uso de partículas que atravessem barreiras lipídicas e realizem *delivery* intracerebral de miRNAs, no caso de injeções sistêmicas (93, 94). Atualmente, existem tentativas para superar tais dificuldades. Vetores baseados em vírus constituem a plataforma de transfecção mais utilizada em testes clínicos, devido à sua alta eficiência (93). No entanto, vírus podem causar neuroinflamação acompanhada de possíveis efeitos mutagênicos (95, 96). Em contrapartida, vetores não virais apresentam baixa imunogenicidade - portanto menos efeitos colaterais - e melhor empacotamento de ácidos nucleicos (97).

Outro aspecto a ser solucionado consiste na dificuldade de transfectar ácidos nucleicos no interior de neurônios (57). Nesse sentido, nanopartículas foram desenvolvidas para o *delivery* neuronal de ácidos nucleicos (98). A tecnologia da

magnetofection, por exemplo, possibilita a transfecção neuronal de oligonucleotídeos carregados por nanopartículas magnéticas. A colocação de campo magnético favorece o *delivery* sítio-específico (99). Partículas como o NeuroMag, utilizada no presente estudo, são compostas de óxido de ferro biodegradável e revestidas por moléculas catiônicas. Dessa forma, NeuroMag é capaz de transfectar diversos ácidos nucleicos - incluindo os microRNAs - com eficiência significativa (99-101). Considerando o exposto, o uso de oligonucleotídeos que modulem o conteúdo de microRNAs, carregados por nanopartículas magnéticas, é estratégia promissora para neuroproteção de áreas cerebrais ligadas ao parkinsonismo.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar se microRNAs estão envolvidos na patogênese do Parkinson experimental e se miR-7 é alvo potencial para terapia neuroprotetora.

2.2 ESPECÍFICOS

- i. Examinar a expressão de microRNAs no estriado de animais com parkinsonismo induzido por rotenona;
- ii. Testar se a nanopartícula NeuroMag é capaz de carrear oligonucleotídeos para o estriado, após injeção intracerebroventricular (i.c.v.);
- iii. Avaliar se a injeção i.c.v. de miR-7 *mimic* carreado por NeuroMag exerce efeito neuroprotetor no Parkinson experimental induzido por rotenona.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia experimental foi organizada em três partes distintas, de acordo com os braços experimentais do atual estudo: 3.1. Neurodegeneração dopaminérgica e expressão de microRNAs em animais parkinsonianos; 3.2. Regulação do conteúdo de microRNAs mediante entrega de oligonucleotídeos carregados por nanopartícula magnética - NeuroMag; 3.3 Injeção intracerebral de imitador de miR-7 carregado por Neuromag para reduzir a injúria de neurônios dopaminérgicos nigrais induzida por rotenona.

PARTE I

3.1 NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA E EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM ANIMAIS PARKINSONIANOS

O modelo de parkinsonismo induzido por rotenona em ratos foi estabelecido por injeções intraperitoniais de rotenona (2,5mg/kg, n=7) a cada 24 horas por 10 dias, conforme exposto na Figura 4. O grupo controle (n=6) recebeu o veículo (óleo de girassol; 1ml/kg). Onze dias após o término das injeções, as atividades locomotora e exploratória foram avaliadas semanalmente pelo teste do campo aberto (TCA, dias 21, 28 e 35). A coordenação motora foi investigada pelo Teste da ponte (TP), vinte dias após a última injeção de rotenona. Aos 36 dias de experimentação, realizou-se a eutanásia. Foi executada perfusão dos cérebros para imuno-histoquímica e dissecação manual dos estriados para análise de expressão de microRNAs.

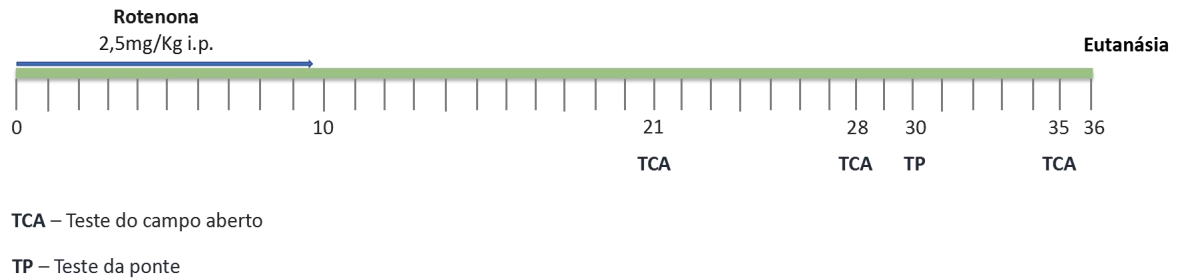


Figura 4. Esquema ilustrativo do modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona. Injeções de rotenona (2,5 mg/kg) foram administradas uma vez ao dia por dez dias consecutivos. O teste do campo aberto (TCA) foi realizado nos dias 21, 28 e 35. Teste da ponte (TP), no dia 30. Ratos eutanasiados no dia 36, retirando-se cérebros para ensaios de imuno-histoquímica e expressão de microRNAs. Grupos experimentais: rotenona (n=7) e controle (n=6).

3.1.1 Animais

O atual estudo utilizou ratos machos albinos adultos jovens da linhagem Wistar (250g-300g), provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas e aclimatados em ambiente a 25°C e 55% de umidade, ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. Água e ração foram disponibilizados *ad libitum*, com pesagem diária dos animais no período das injeções.

3.1.2 Preparo da rotenona

A toxina rotenona (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) foi dissolvida em óleo de girassol na concentração de 2,5 mg/mL. Esta solução foi preparada diariamente e armazenada em frascos protegidos de luz, misturados vigorosamente em vórtex imediatamente antes de cada injeção.

3.1.3 Avaliação da atividade locomotora pelo Teste do campo aberto

O Teste do campo aberto foi realizado em uma sala silenciosa, como descrito em Moraes et al. e Bassani et al. (102, 103). Resumidamente, cada rato foi posicionado no centro de uma arena circular (97 cm de diâmetro) rodeada por uma parede transparente de 42 cm. Linhas no piso da arena delimitam três círculos concêntricos principais, subdivididos em 19 quadrantes. A atividade locomotora e comportamento de cada animal durante 5 minutos foi registrada por câmera de vídeo. O piso e as paredes internas do campo aberto foram limpos com solução de etanol (EtOH) a 5% antes de cada teste comportamental. Os vídeos foram analisados por inspeção visual do experimentador, determinando-se o número de quadrantes cruzados, a frequência de cruzamento do quadrante central e o número de *rearings* - movimento em que o animal se apoia apenas com os membros posteriores (Figura 5).

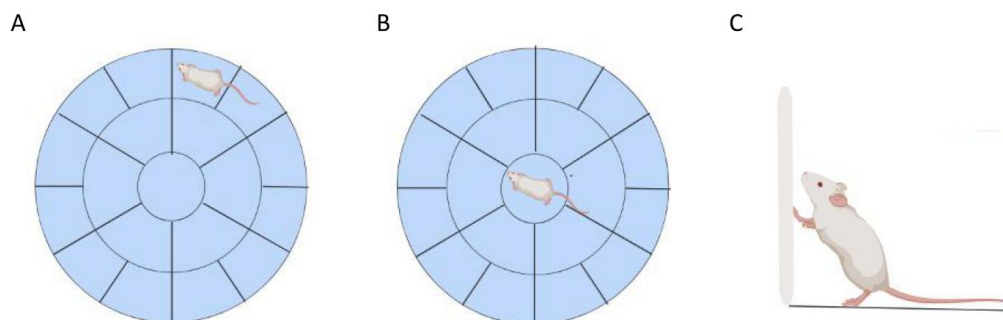


Figura 5. Representação dos parâmetros avaliados no Teste do campo aberto. Número de quadrantes cruzados (A), frequência de cruzamento do quadrante central (B) e número de *rearings* (C). Imagem criada com o *software* BioRender.

3.1.4 Avaliação da coordenação motora pelo Teste da ponte

O Teste da ponte consiste de um obstáculo (100cm x 7cm) com parede acrílica transparente de 20 cm de altura nas laterais, 20 cm de altura do chão e com suporte para deslocamento formado por fios dispostos de forma descontínua (104),

avaliando-se a capacidade do rato de se apoiar em cada fio para se deslocar até a extremidade oposta do aparato. Os animais foram previamente treinados. No momento do teste, cada animal realizou três passagens no aparato. Em cada uma delas, três fios metálicos foram removidos para aumento gradual da dificuldade da travessia. Os movimentos das patas durante a marcha foram obtidos mediante um espelho colocado sob a ponte. Foi realizada a limpeza do aparato com solução de EtOH 5% antes de cada teste. Avaliou-se o número de correções e de apoio parcial das patas anteriores em cada fio durante o deslocamento do animal. O número de correções (ou seja, erros de movimento) foram contados a cada vez que o rato apresentou os seguintes comportamentos: i) colocação da pata em um espaço livre entre os fios, em vez de colocá-la no fio correto; ii) tentativa mal-sucedida de apoio da pata em um fio, com posterior colocação no fio subsequente; iii) reposicionamento rápido da pata no mesmo fio. Contabilizou-se ainda o apoio parcial, ou seja, o comportamento de apoiar a pata do membro torácico com o punho ou com os dígitos, porém sem a fixação adequada no fio (Figura 6). Os testes foram registrados por câmera de vídeo para posterior análise.

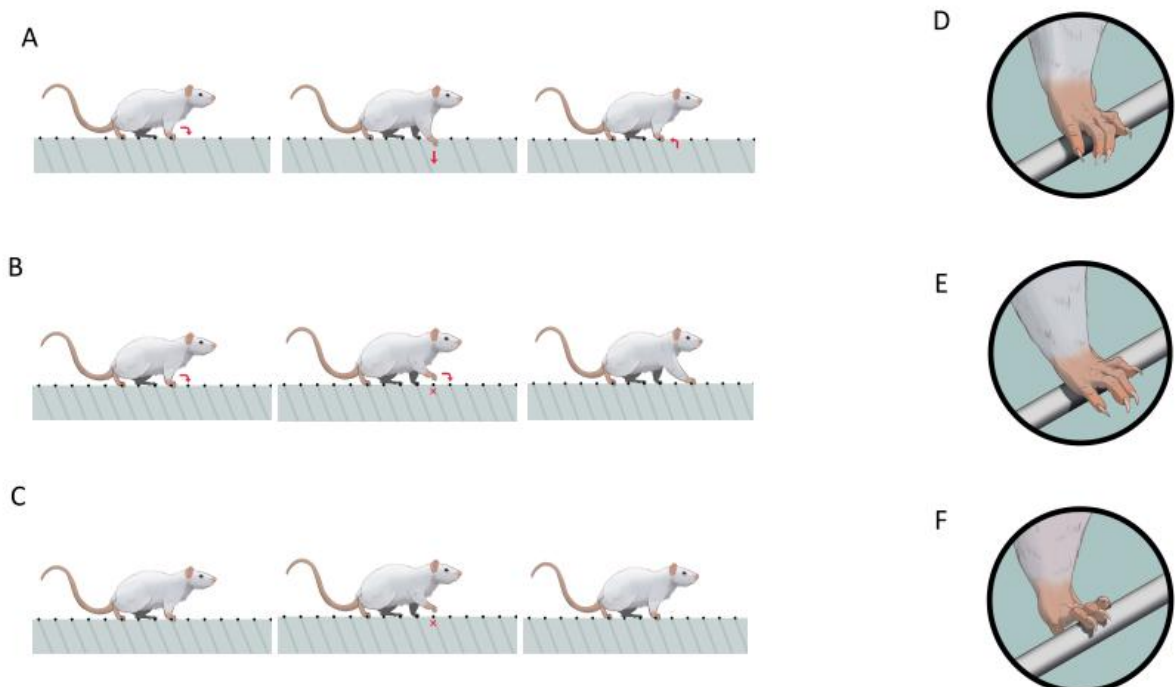


Figura 6. Ilustração dos critérios de avaliação do Teste da ponte. (A) colocação da pata em um espaço livre entre os fios, em vez de colocá-la no fio correto; (B) tentativa mal-sucedida de apoio da pata em um fio, com posterior colocação no fio subsequente; (C) reposicionamento rápido da pata no

mesmo fio; Fixação adequada (D), apenas com o punho (E) ou com os dígitos (F) da pata do membro torácico no fio.

3.1.5 Processamento do tecido cerebral

Os ratos foram submetidos à anestesia profunda e perfundidos intracardialmente. Foi realizada injeção de solução tampão fosfato em salina (PBS; 10- 15 min), no ventrículo esquerdo, seguida por paraformaldeído a 4% (PFA; Dinâmica; 10- 15 min). Os cérebros removidos foram colocados em solução de PFA 4% por 24h. Posteriormente, foram submetidos a gradiente de sacarose (Dinâmica; 10%, 20% e 30%) sob leve agitação à temperatura ambiente. Para ensaios de imuno-histoquímica e técnica histológica de Fluoro-Jade B[®], descritas nos itens 3.1.6 e 3.1.7, respectivamente, os cérebros foram cortados em secções coronais de 40 µm de espessura em criostato (CM1850, Leica, Wetzlar, Alemanha). Cortes foram colocados em solução crioprotetora (tampão fosfato, água destilada, sacarose e etilenoglicol) e armazenados a -20°C.

3.1.6 Imuno-histoquímica de Tirosina hidroxilase e de microglia

A presença de células dopaminérgicas na substância negra foi determinada por imunomarcção da tirosina hidroxilase (TH). Secções cerebrais foram lavadas (3 vezes, 10 minutos cada) em solução salina tamponada com Tris (TBS 0,005M + 0,15% Triton X - TBST; pH: 7,6) e em seguida colocadas em tampão citrato (pH 6,0) a 70°C por 30 minutos para recuperação antigênica. Cortes imersos em TBST (3x, 10 min cada) e posteriormente incubados com peróxido de hidrogênio a 1% para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Sítios inespecíficos foram bloqueados mediante solução de bloqueio (1% de albumina sérica bovina e TBST) por 2 horas. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal Anti-TH de coelho (1:800; AB152, Merck Millipore), a 4°C por 18 horas. Após sucessivas lavagens com TBST, as secções foram incubadas com anticorpo

secundário biotinilado anti-coelho IgG (1: 400 para TH; BA-1000, Vector Lab; 60 min), seguido de incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (kit de coloração ABC peroxidase; Thermo Fisher Scientific) por 90min. Após lavagem com TBST (3 vezes, 5 min cada), a reação foi revelada com tetracloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB; D4418, Sigma-Aldrich; 10 min no escuro). Finalmente, as secções foram lavadas com TBST e montadas em lâminas para posterior análise em microscópio de campo claro (Axioscope, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A imunodeteção de células microgliais foi realizada utilizando-se a marcação pelo anticorpo primário policlonal anti-molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 1:1000 (Iba-1, Wako, 019-19741), conforme protocolo descrito acima para TH, exceto pela etapa do tampão citrato que não foi realizada. Anticorpo secundário biotinilado anti-coelho IgG (BA-1000, Vector Lab) foi diluído 1: 400. Etapas da imunohistoquímica para detecção de TH e Iba-1 foram realizadas sob agitação constante e leve. Incluídos controles sem adição do anticorpo primário (dados não apresentados).

3.1.7 Método de Fluoro-Jade B®

Secções de cérebros foram montadas em lâminas gelatinizadas e aquecidas a 50°C por 30min. Após secas, as lâminas foram imersas em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1% por 5 min, seguidas de EtOH 70% por 2 min, e lavadas com água destilada por 2 min. A seguir, as lâminas sob proteção de luz foram mergulhadas em solução de permanganato de potássio (KMNO, Dinâmica) 0,06% por 10 minutos. Secções lavadas com água destilada por 2 min, e então imersas em solução de Fluoro-Jade B® (AG310-30MG; Merk Millipore) 0,001% com ácido acético a 0,1% durante 20 min sob leve agitação. As lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada por 1 minuto cada e deixadas secar a 50°C por 10 min. Finalmente, as secções cerebrais foram montadas com Entellan (HX 126033; Merk Millipore) e posteriormente analisada em microscópio de fluorescência Zeiss conectado a um sistema de captura e análise de imagens digitais (Axiovision rel. 4.7).

3.1.8 Quantificação de microRNAs por RT-qPCR

A expressão de seis miRNAs (miR-7, -34a; -26a; -132; Let7a; e -382), foi quantificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Inicialmente, os estriados foram dissecados manualmente logo após a eutanásia, sendo armazenados a -80°C . A extração dos miRNAs foi realizada utilizando-se o kit mirVana™ (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), sendo eluídos em 100 μL de solução de eluição e armazenados a -80°C . O rendimento da extração dos miRNAs foi determinado por fluorometria (Qubit® 2.0 firmware 3.11; Thermo Fisher Scientific, Inc) pelo equipamento Qubit (Invitrogen, Califórnia, EUA). Seguiu-se à síntese de DNA complementar (cDNA; mediante transcrição reversa, a partir de amostras de microRNAs na diluição 2ng/ μL . Utilizou-se o kit de transcrição reversa TaqMan MicroRNA (Thermo Fisher Scientific, Inc), segundo as instruções do fabricante. Após a transcrição reversa, os miRNAs foram quantificados pelo sistema Taqman de PCR em tempo real em equipamento QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, Inc.). A mistura da reação continha 2 μl de DNAc, 1 μl de *primers* específicos de cada miRNA [miR-7 (000582); miR-34a (000426); miR-26a (000405); miR-132 (002132); Let7a (000377); ou miR-382 (000572), todos provenientes da Thermo Fisher Scientific, Inc.], 10 μl de TaqMan® *Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Inc.) e 20 μl de água milli-Q. O programa qPCR consistiu em dois ciclos iniciais (50°C por 2 min, 95°C por 20 s), seguido por 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 60°C por 1 min). Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo controles negativos (ausência de cDNA). A expressão relativa de cada microRNA alvo foi expressa pelo método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) (105). O ΔCt de cada amostra é obtido subtraindo o valor do ciclo no *threshold* (Ct) do microRNA alvo do valor de Ct do calibrador endógeno. Para cálculo do $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizou-se a fórmula [ΔCt (amostra - animal parkinsoniano) – ΔCt (animal controle)]. Finalmente, obteve-se a expressão relativa de cada microRNA alvo pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O alvo RNU6B foi escolhido como calibrador endógeno do ensaio.

PARTE II

3.2 REGULAÇÃO DO CONTEÚDO DE MICRORNAS MEDIANTE ENTREGA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS CARREADOS POR NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA – NEUROMAG

O atual estudo utilizou nanopartículas magnéticas (NeuroMag) para transfecção de oligonucleotídeos em células neuronais e gliais (57). O princípio da tecnologia de *Magnetofection*TM - transfecção guiada por campo magnético - consiste em submeter campo magnético a determinada nanopartícula recoberta por composto de ferro, por exemplo, permitindo-se assim o direcionamento da partícula dos oligonucleotídeos nela estruturados para células alvo específicas (98). A transfecção dos oligos magnetonanoestruturados, utilizados no presente estudo, foi realizada com auxílio de placas magnéticas colocadas sob a cabeça do animal, conforme descrito na figura 7.

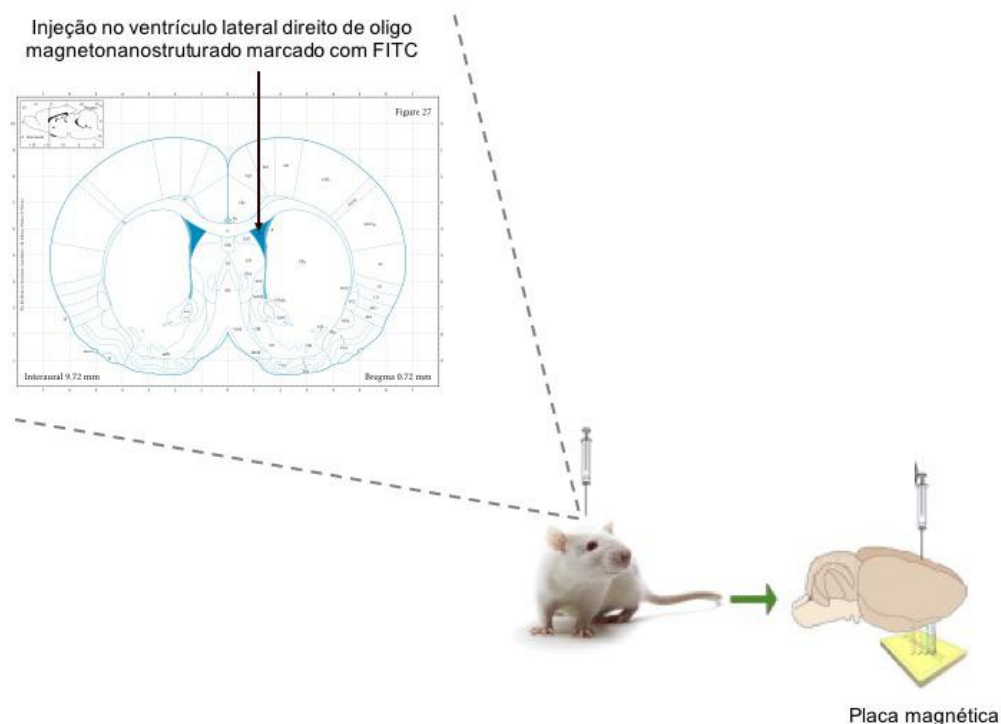


Figura 7. Representação esquemática da transfecção utilizando a técnica de *magnetofection* para entrega de oligonucleotídeos em células cerebrais de rato. Oligonucleotídeos complexados com

NeuroMag foram injetados por cirurgia estereotáxica no ventrículo lateral seguindo coordenadas do atlas Paxinos e Watson (106). Em amarelo, representa-se a placa magnética colocada sob a cabeça do animal para guiar a transfecção para neurônios e células gliais (Adaptado de Titze-de-Almeida et al., 2018).

3.2.1 Preparo de oligonucleotídeos carregados por nanopartículas magnéticas para injeção intracerebral

O oligonucleotídeo foi sintetizado com duas modificações estruturais visando melhora de especificidade e estabilidade: *locked nucleic acids* e *phosphorotioate linkages* (Exiqon A/S; Vedbaek, Dinamarca). As nanopartículas magnéticas (NeuroMag; 0,68 μ l; Oz Biosciences USA Inc., San Diego, CA, EUA) foram incubadas com os oligos (0,36nmol) a 37°C por no mínimo 20 minutos para a formação dos magnetocomplexos, conforme descrito em estudo anterior (98).

3.2.2 Cirurgia estereotáxica e injeção intracerebral

Os animais (n=3) foram anestesiados com cetamina HCl (Imalgem 1000, 75mg/kg) e diazepam (Valium, 10mg/kg) via injeção i.p. Realizou-se tricotomia do escalpo e posterior fixação do animal no aparelho estereotáxico (EFF 331, Insight). Após anestesia local do escalpo e assepsia, realizou-se a incisão sagital do tecido cutâneo seguida de limpeza e retirada de tecido muscular e conjuntivo da região da calota craniana. Para a injeção intracerebral, utilizou-se micro-seringa Hamilton calibre 33 (Hamilton Company, Reno, NV, EUA), sendo introduzida no ventrículo lateral direito nas coordenadas ântero-posterior: +0,7; médio-lateral: -2,3; dorso-ventral : -5,2 do Bregma, conforme atlas de Paxinos e Watson (106). As injeções foram realizadas durante cinco minutos, sendo 1 μ L o volume total injetado da mistura de Neuromag com oligonucleotídeo ou água DNase *Free* (grupo controle). A agulha permaneceu *in situ* por mais 10 minutos, sendo removida lentamente a fim de evitar refluxo da solução. Posicionou-se placa magnética sob a cabeça do animal por 30 min,

conforme publicação anterior (98). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em suas gaiolas até completa recuperação em sala com temperatura e luz controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas. Medicação pós-operatória consistiu na administração de antimicrobiano enrofloxacin (Baytril 5%, 10 mg/kg) e antiinflamatório não-esteroidal meloxicam (Maxicam 0,2%, 0,2 mg/kg).

3.2.3 Imuno-histoquímica para análise do *delivery* dos oligonucleotídeos no estriado

A transfecção dos oligos fluorescentes no estriado foi avaliada aos sete dias após a injeção intracerebroventricular. Foram realizados ensaios de imunodeteção dos marcadores para proteína fibrilar ácida da glia (GFAP) e antígeno nuclear neuronal (NeuN) (para células gliais e neuronais, respectivamente), conforme descrito abaixo. Ratos foram eutanasiados e perfundidos segundo metodologia descrita no item 3.1.5. Os cérebros foram cortados em toda extensão rostrocaudal utilizando-se criostato (CM1850, Leica), obtendo-se secções coronais de 20 µm que foram dispostas em lâminas gelatinizadas. As secções cerebrais foram inicialmente tratadas com tampão de sulfato cúprico 1 mM (CuSO₄) em acetato de amônio 50 mM para remover a autofluorescência tecidual. Em seguida, mantidas por 1 h em 10% de soro bovino (Jackson, West Grove, PA, EUA) com Triton X-100 a 0,5% para o bloqueio de coloração não específica. Incubou-se as amostras por 12 horas à temperatura ambiente com anticorpos primários anti-GFAP (Invitrogen, 1: 100, Carlsbad, CA, EUA) e anti-NeuN (Millipore, 1: 300, Darmstadt, Alemanha) diluído em PBS com 0,5% de Triton X-100. Em seguida as secções foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho IgG (Alexa Fluor 633 conjugada; 1: 100; Invitrogen) e anti-galinha IgG (Alexa Fluor 555 conjugada; 1: 100; Invitrogen) por 1 h. O reagente Hoechst 33342 foi utilizado para marcação dos núcleos das células. Finalmente, os cortes cerebrais foram lavados em PBS e montados em solução *Fluoromount Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para análise por microscopia confocal a laser (TCS SPE Microsystems GmbH, Leica). Os controles

foram submetidos aos mesmos procedimentos com exceção do anticorpo primário ou secundário que foram omitidos (dados não apresentados).

PARTE III

3.3 INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE IMITADOR DE MIR-7 CARREADO POR NEUROMAG PARA REDUZIR A INJÚRIA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS NIGRAIS INDUZIDA POR ROTENONA

Para avaliar os efeitos da modulação da expressão de miR-7, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção i.c.v. de Neuromag + água *Dnase Free* ou Neuromag + miR-7 mimic (Figura 8). Após cinco dias de pós-operatório, os animais receberam dez injeções de rotenona (3,0 mg/kg) via i.p.; os grupos controle e rotenona receberam óleo de girassol (1 ml/kg) e a neurotoxina (3,0 mg/kg), respectivamente. A eutanásia foi efetuada quinze dias após o início da experimentação, em que os cérebros foram perfundidos para posterior análise imuno-histoquímica da SNpc.

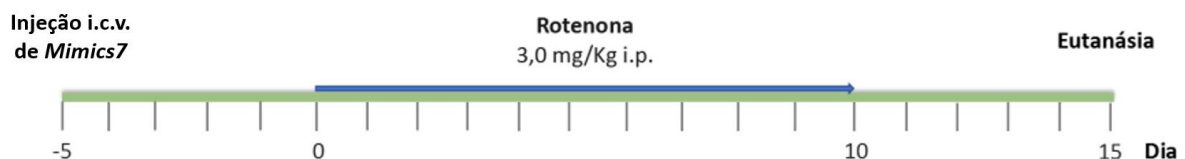


Figura 8. Esquema ilustrativo do experimento de reposição do microRNA 7 em animais parkinsonianos induzido por rotenona. No dia -5 os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para transfeção de miR-7 estruturado em NeuroMag; o mesmo foi realizado para o grupo controle (NeuroMag e água *Dnase Free*). No dia 0 as injeções de rotenona (3,0 mg/kg) foram iniciadas seguindo-se por dez dias consecutivos. Aos quinze dias, a eutanásia foi realizada e os cérebros perfundidos para posterior análise por imuno-histoquímica. Grupos experimentais: controle (n=7), rotenona (n=9), Neuromag (n=7) e miR-7 *mimics* (n=8).

3.3.1 Preparo de oligonucleotídeos magnetonanoestruturados para injeção intracerebral

Os mimetizadores de miR-7 foram sintetizados com uma adição de cinco citosinas aneladas a cinco guaninas na extremidade oposta ao da região de reconhecimento - tecnologia conhecida como *RNAi Cap* (Riboxx; Radebeul, Alemanha) - para aumento da eficiência de silenciamento gênico e diminuição de efeitos inespecíficos. O preparo e *delivery* foram realizados utilizando-se nanopartículas magnéticas (NeuroMag; Oz Biosciences USA Inc., San Diego, CA, EUA) incubadas com os oligos a 37°C por no mínimo 20 minutos para a formação dos magnetocomplexos, conforme descrito em estudo anterior (98). Para isso, foram preparadas duas soluções: ii) mimetizadores de miR-7 (0,36 nmol diluídos em 0,36 µL de água DNase *Free*; Riboxx) incubados com 0,68 µL de NeuroMag e iii) Água DNase *Free* (0,36 µL, Riboxx) incubada com 0,68 µL de NeuroMag. O volume total de cada solução injetado no ventrículo foi de 1 µL. Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica (n=9 por grupo) foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo recebeu tratamento com mimetizadores de miR-7 nanoestruturados em NeuroMag. O segundo grupo de animais recebeu o veículo (água DNase *Free*) incubado com NeuroMag. O procedimento anestésico, a cirurgia estereotáxica para a injeção dos oligonucleotídeos nanoestruturados em NeuroMag bem como o pós-operatório foram realizados conforme descrito no item 3.2.2.

3.3.2 Administração de rotenona

Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os animais receberam rotenona (3 mL/kg; i.p.; n=9 por grupo) uma vez ao dia durante dez dias (Figura 8). Os grupos controle (n=7) e rotenona (n=9) receberam o veículo (óleo de girassol; 1ml/kg) e a neurotoxina (3 mL/kg; i.p.), respectivamente. A neurotoxina foi preparada conforme descrito no item 3.1.2. Os animais foram submetidos a pesagem todos os dias antes das injeções.

3.3.3 Imuno-histoquímica para análise da TH e microgliose

A avaliação de neuroproteção pelo mimetizador de miR-7 foi realizada por imuno-histoquímica. Para isso, aos 15 dias após a primeira injeção de rotenona os ratos foram eutanasiados e perfundidos conforme metodologia descrita no item 3.1.5. A marcação imuno-histoquímica da TH e da microgliose foi realizada conforme descrito previamente (item 3.1.6). A quantificação foi realizada pela análise do número de células TH (+) e células microgliais na substância negra através do programa Image J 1.52e (*National Institute of Health, Maryland, Estados Unidos*). Para tanto, foram analisados cinco campos por tecido nigral de cada animal. O número de células foi expresso como porcentagem do número total de células em relação ao controle.

3.3.4 Análise Estatística

A análise estatística da parte I e III do presente estudo foi realizada empregando-se os programas Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS 17.0, Inc., Chicago, IL, EUA) e Prism 6.0 (GraphPad, CA, USA), respectivamente. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. O teste de normalidade de Shapiro Wilk foi empregado para avaliar a escolha da medida de tendência central e sua respectiva medida de dispersão para cada resultado. O teste realizado para cada resultado foi descrito na legenda das figuras. Os testes paramétricos utilizados nesse trabalho foram *One-way ANOVA* (seguido do teste de Tukey) para múltipla comparação entre grupos com uma medida variável e o teste t de *Student* para avaliar diferenças entre dois grupos não pareados. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.3.5 Comitê de Ética

As técnicas empregadas neste trabalho seguiram os princípios éticos de experimentação com animais, regulados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), protocolos nº 22267/2015 e 45524/2016.

4. RESULTADOS

Nessa seção, o atual estudo apresentará as respostas das perguntas biológicas norteadoras desse trabalho. Os gráficos e figuras apresentados a seguir destinam-se a responder às seguintes perguntas: 1- Existe um perfil estriatal de expressão de microRNAs no parkinsonismo induzido por rotenona?; 2- É viável modular a expressão gênica de miRNAs no estriado mediante o uso de nanopartículas e oligonucleotídeos sintéticos?

PARTE I

4.1 NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA E EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM ANIMAIS PARKINSONIANOS

4.1.1 Efeitos da rotenona sobre o comportamento exploratório e coordenação motora de ratos

Os ratos expostos cronicamente à rotenona apresentaram prejuízos motores referentes às atividades exploratórias (Figura 9A e B) e de locomoção (Figura 9C), avaliadas pelo Teste do campo aberto (Figura 9). Na análise da atividade exploratória foram considerados o cruzamento de quadrantes e idas ao centro (Figuras 9A e B, respectivamente). O grupo rotenona demonstrou, no dia 21, tendência de redução no número de cruzamento de quadrantes, em relação ao controle. Nos outros dois pontos temporais (dias 28 e 35; Figura 9A), esse decréscimo foi significativo ($p < 0,05$), sugerindo danos motores causados pela neurotoxina. O resultado foi corroborado pela diminuição significativa de idas ao centro da arena (dias 21, 28 e 35, $p < 0,05$). No que se refere a capacidade locomotora, houve uma tendência de redução de *rearings* no grupo exposto à rotenona, comparado ao controle (dia 21; Figura 9C). Apesar de

ter sido observada apenas uma tendência de diminuição na capacidade dos ratos realizarem *rearing*, tomados em conjunto, os resultados estão de acordo com dados descritos previamente na literatura utilizando modelo de Parkinsonismo induzido por rotenona. Esta neurotoxina causa degeneração branda das vias nigroestriatais o que leva a alterações discretas nos testes de comportamento, especialmente no Teste do campo aberto (102, 103).

Os efeitos deletérios de rotenona sobre o comportamento motor dos ratos foram reforçados com os resultados encontrados no segundo teste comportamental, o Teste da ponte (Figura 10). A coordenação motora necessária para atravessar de um lado para outro em uma ponte cujo assoalho consistia de fios metálicos diferentemente espaçados foi menor no grupo rotenona, comparado ao controle. O déficit motor induzido pela neurotoxina, medido por meio do número de correções realizadas pelo animal durante o deslocamento no fio, mostrou-se estatisticamente significativo no obstáculo 2 ($p < 0,05$ Figura 10A). Além disso, os animais expostos à rotenona apresentaram tendência de aumento de posicionamentos parciais (*partial placements*) das patas nos fios em todos os obstáculos, comparados ao controle ($p = 0,0778$; $p = 0,2388$; $p = 0,1690$, respectivamente para cada obstáculo; Figura 10B).

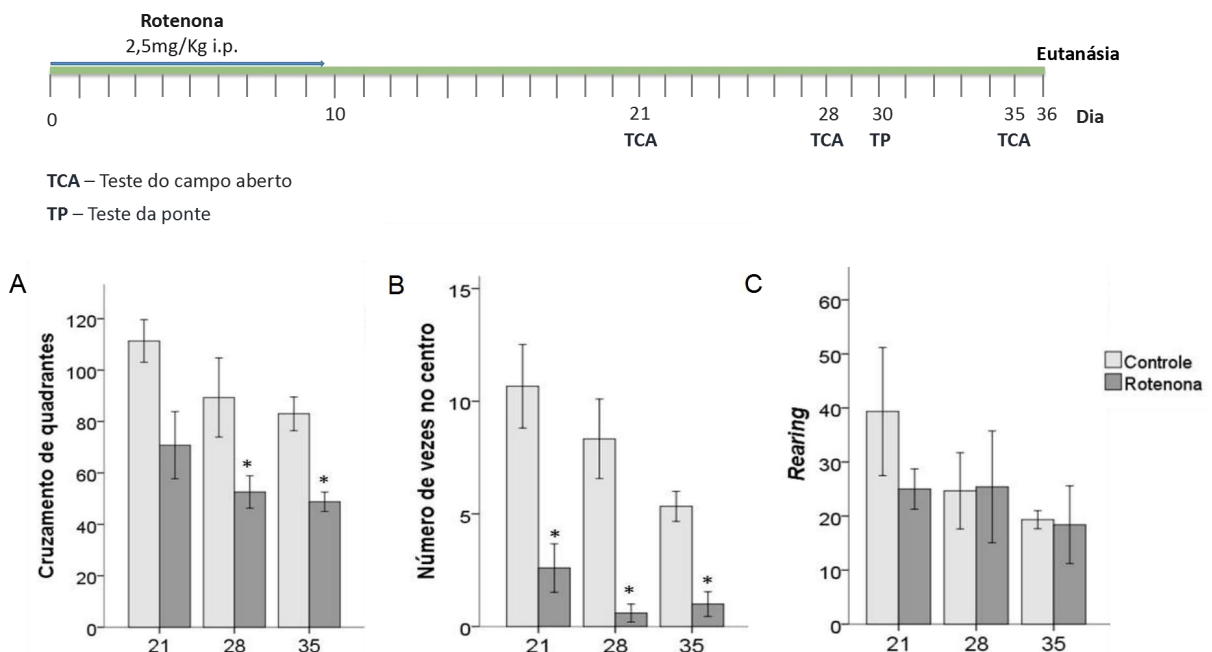


Figura 9. Atividade exploratória e locomotora dos animais dos grupos rotenona e controle pelo Teste do campo aberto (TCA). No topo, uma representação esquemática do procedimento experimental. Os

ratos receberam rotenona (2,5 mg/kg, i.p.) e o grupo controle recebeu o veículo (óleo de girassol) durante dez dias consecutivos. Animais expostos à rotenona apresentaram diminuição significativa na frequência de cruzamentos de quadrantes (A) nos dias 28 e 35 ($p < 0,05$), assim como redução no número de idas ao centro (B), sendo a mesma significativa em todos os dias ($p < 0,05$). Além disso, o grupo rotenona realizou menos *rearings* (C) quando comparado ao controle nos dias 21 e 35. Barras expressam média \pm EPM em relação ao teste comportamental. Foi realizada ANOVA *one way*, seguido pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$, comparado com o grupo controle (Adaptado de Horst et al., 2018). Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

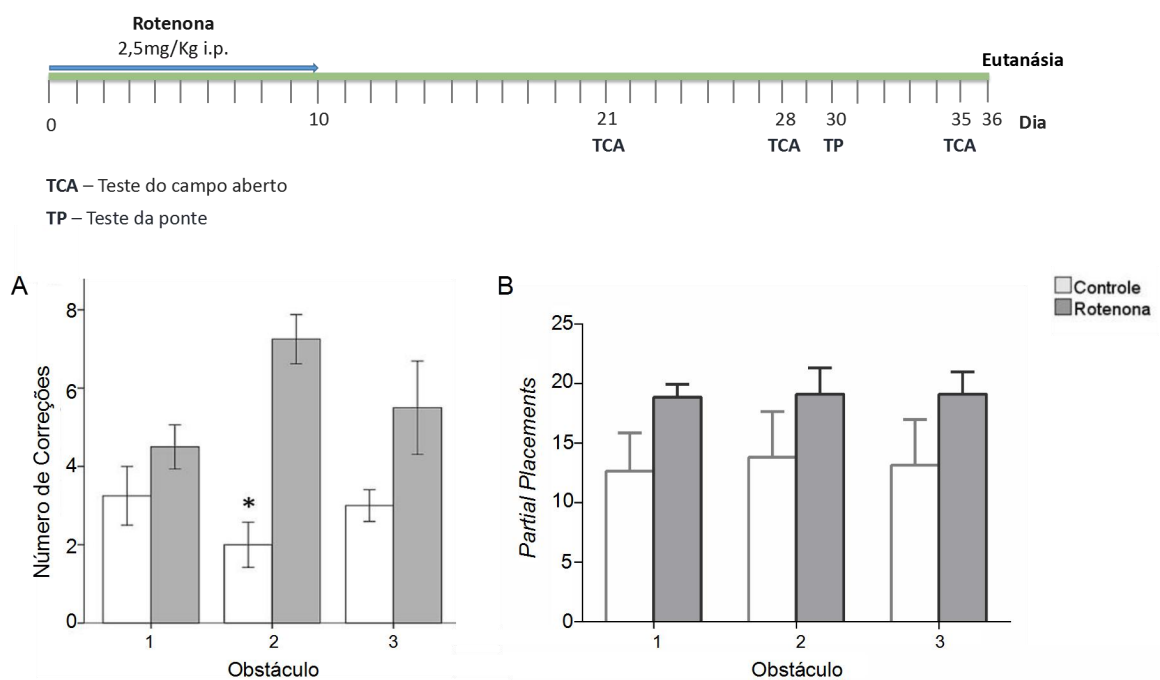


Figura 10. Coordenação motora dos grupos controle e rotenona. O procedimento experimental encontra-se esquematizado no topo. Os animais receberam diariamente rotenona (2,5 mg/kg, i.p.) ou óleo de girassol do veículo por dez dias. Animais expostos à rotenona apresentaram maior número de correções realizadas em relação ao controle, sendo a diferença estatisticamente significativa no obstáculo dois ($p < 0,05$). O grupo rotenona apresentou também uma tendência de aumento na frequência de *partial placements* efetuados ($p = 0,0778$; $p = 0,2388$; $p = 0,1690$, respectivamente para cada obstáculo). O teste t foi empregado em cada obstáculo do experimento. * $P < 0,05$, comparado com o grupo controle (Adaptado de Horst et al., 2018) Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

4.1.2 Neurodegeneração da via nigroestriatal de ratos induzida por rotenona

Áreas de degeneração da via nigroestriatal foram identificadas nos animais 26 dias após a última injeção de rotenona. Lesões resultantes da perda de neurônios dopaminérgicos na porção dorso-lateral do estriado (Figura 11B) e na substância negra (Figura 11C) foram visualizadas através da imunomarcagem da TH. A morte celular nestas regiões foi ausente no grupo que recebeu apenas injeções do veículo (controle). Adicionalmente, a perda de neurônios da via nigroestriatal em ratos submetidos à rotenona foi confirmada também por marcação fluorescente com o corante Fluoro-Jade B[®] (Figura 12). Neste sentido, a presença de fluorescência (setas amarelas) no estriado e substância negra destes animais indicaram morte celular por apoptose (Figura 12 B, D). No grupo injetado com veículo a fluorescência não foi visualizada, demonstrando, portanto, ausência de apoptose neste grupo controle (Figura 12 A, C).

O processo de neurodegeneração, identificado no presente trabalho, em tecido cerebral de rato, ocorreu mais de três semanas após o encerramento das injeções, confirmando a capacidade da rotenona em causar perda celular permanente e induzir o parkinsonismo experimental. As lesões brandas (Figuras 11 e 12) e alterações motoras sutis (Figuras 9 e 10, item 4.1.1) sugerem que esta neurotoxina pode ser um modelo do parkinsonismo inicial, onde o número de neurônios degenerados ainda é pequeno. Terapias aplicadas neste estágio poderiam evitar a progressão da doença, diminuindo, conseqüentemente, os prejuízos na qualidade de vida do paciente com Parkinson.

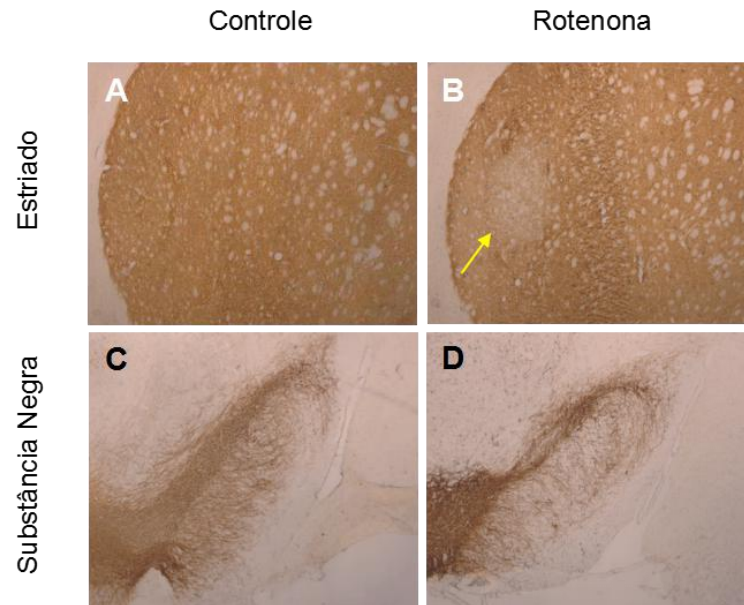


Figura 11. Detecção por imuno-histoquímica de neurônios TH (+) na via nigroestriatal de ratos. Observa-se uma redução de neurônios TH (+) no estriado (B) e substância negra (D) nos ratos do modelo de parkinsonismo induzido por rotenona em comparação com os controles (A, C). Fotos em aumento de 5X (Adaptado de Horst et al., 2018). Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

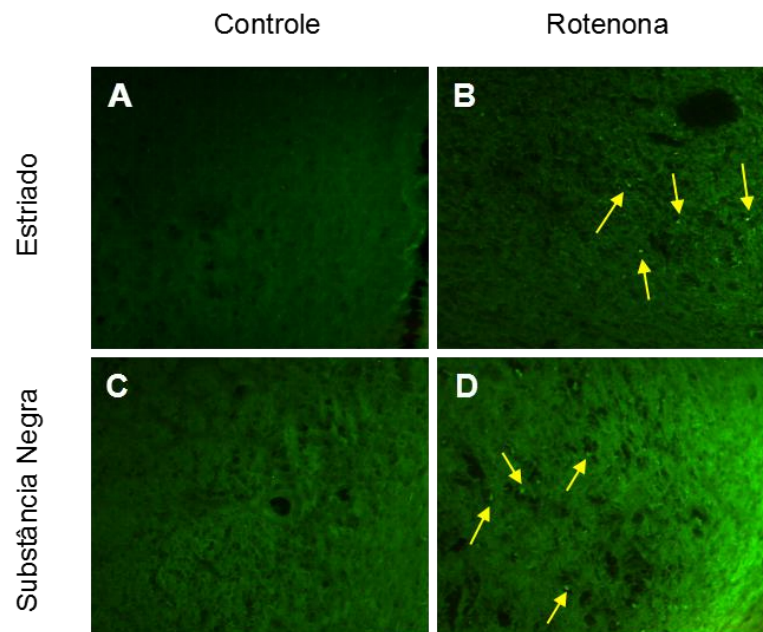


Figura 12. Marcação de neurônios nigroestriatais com Fluoro-Jade B[®]. Animais do grupo rotenona apresentaram aumento de neurodegeneração na substância negra e estriado (B, D; setas amarelas)

em comparação com controles (A, C). Fotos em aumento de 20X (Adaptado de Horst et al., 2018). Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

4.1.3 Avaliação de microgliose na via nigroestriatal de animais parkinsonianos

Intensa microgliose foi identificada na via nigroestriatal dos ratos expostos à rotenona, conforme revelado pela imunomarcção do tecido cerebral com Iba1 (Figura 13). A presença de microgliose foi identificada na região dorsolateral do estriado (Figura 13 A, A') no grupo rotenona, corroborando com a perda acentuada de neurônios TH (+) situados na mesma região cerebral (Figura 11). Este aumento de células microgлияis foi observado também na substância negra de ratos parkinsonianos (Figura 13 C-C'). O tecido cerebral de pacientes com Parkinson apresenta neurodegeneração dopaminérgica acompanhada de neuroinflamação, sendo estes, relevantes marcadores da doença. Alguns estudos sugerem, inclusive, que a morte de neurônios dopaminérgicos pode ser decorrente de um processo neuroinflamatório (107, 108).

A microgliose associada a perda de neurônios da via nigroestriatal, encontrados no atual estudo, revela a eficácia desta neurotoxina em mimetizar os achados neuropatológicos de pacientes com Parkinson.

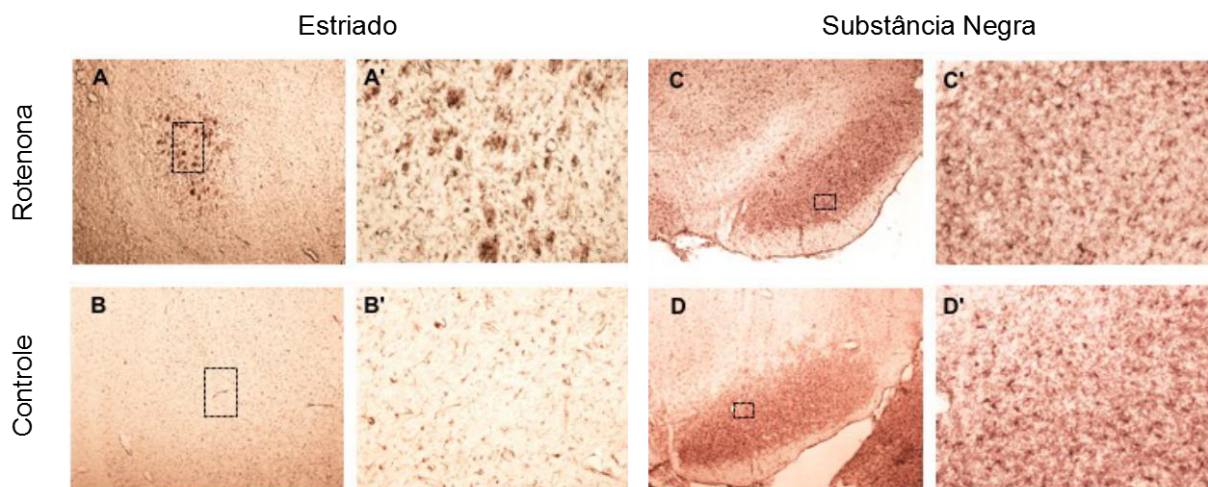


Figura 13. Detecção de microgliose no estriado e substância negra. Animais expostos à rotenona apresentaram um aumento acentuado do número de células microgлияis na região dorsolateral do

estriado (A, A') comparado ao grupo controle (B, B'). O processo de microgliose também estava presente na substância negra de ratos parkinsonianos (C, C') em comparação com os controles (D, D'). Fotos em aumento de 5X (A, B, C, D) e 20X (A', B', C', D') (Adaptado de Horst et al., 2018). Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

4.1.4 Perfil de expressão de microRNAs no estriado de animais parkinsonianos

No presente trabalho foi avaliada a expressão de 6 miRNAs (miR-7, miR-34a, miR-26a, miR-132, Let7a e miR-382) no estriado de animais parkinsonianos por RT-qPCR (Figura 14). Estes miRNAs estão envolvidos em processos de neurodegeneração, incluindo as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (80, 85, 109-111). Significativas alterações foram observadas em 5 dos 6 miRNAs analisados, sendo que dois deles tiveram a expressão diminuída (miR-7 e Let7a) e os outros 3 aumentada (miR-26a, miR-34a e miR-132) ($p < 0,05$). O miR-34a foi o que apresentou maior aumento de expressão (2,2 vezes), seguido por miR-26a (1,5 vezes). Observa-se também que miR-382 manteve sua expressão inalterada após injúria induzida por rotenona. Em contraste, miR-7 apresentou diminuição significativa (0,5 vezes) de expressão comparada ao controle e aos microRNAs hiperexpressos ($p < 0,05$). Let7a também mostrou redução, sendo estatisticamente significativa quando comparado a miR-26a e miR-34a ($p < 0,05$). Seguindo os resultados de expressão de miRNAs reprimidos na condição de injúria por rotenona, o miR-7 foi o de menor expressão (0,5 vezes), quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e aos microRNAs hiperexpressos ($p < 0,05$).

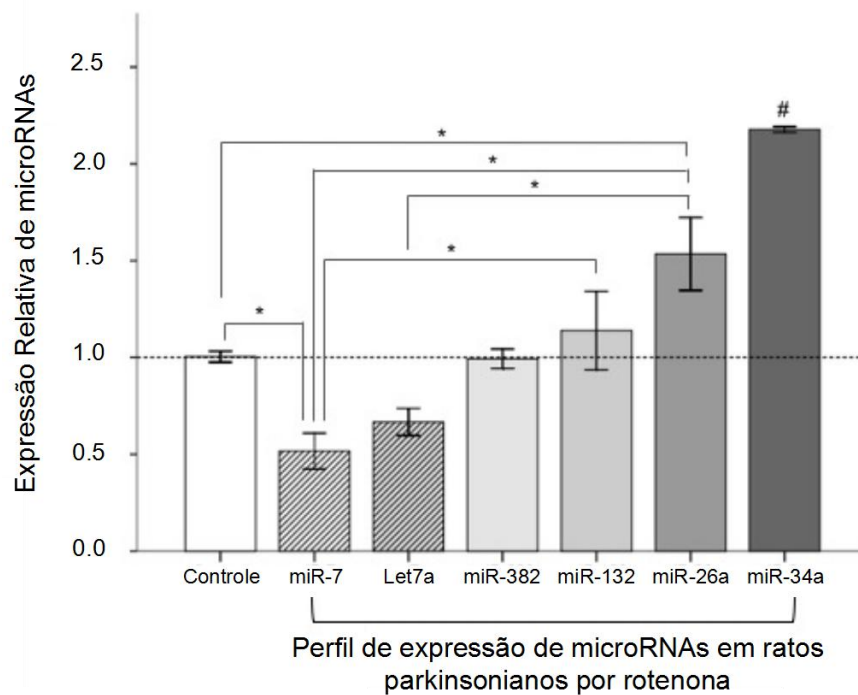


Figura 14. Avaliação da expressão gênica de microRNAs no estriado de animais expostos à rotenona. As expressões dos microRNAs analisados foram normalizadas pelo miR-382, uma vez que sua expressão se manteve inalterada entre os grupos controle e parkinsoniano. O conteúdo de microRNAs em animais injuriados por rotenona foi então comparado ao encontrado nos animais controle, sendo estes arbitrariamente designados como 1,0 (expressão de 100%). Barras representam média \pm EPM em relação ao valor relativo de miRNAs. Foi realizado ANOVA *one way*, seguido pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$; # $P < 0,05$, para miR-34a versus miR-26a, miR-132, Let7a e miR-7 (Adaptado de Horst et al., 2018). Grupos experimentais: controle (n=6) e rotenona (n=7).

PARTE II

4.2 DELIVERY DE OLIGONUCLEOTÍDEOS VIA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR POR TECNOLOGIA DE MAGNETOFECTION

4.2.1 Transfecção de oligos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em células estriatais de ratos, utilizando-se NeuroMag e campo magnético

Os oligonucleotídeos fluorescentes nanoestruturados em NeuroMag foram visualizados por microscopia confocal a laser no endimócito e no interior de células neuronais e gliais da região do estriado, uma semana após a transfecção (Figura 15). Os endimócitos são células que constituem o revestimento celular do ventrículo lateral, sendo a barreira física entre a cavidade ventricular e o estriado. Nesta região de células endimais a intensidade de fluorescência foi maior que no estriado. Considerando ser esta a primeira barreira celular encontrada pela magnetocomplexo assim que atinge o ventrículo, esperava-se, de fato, um sinal de mais intenso de fluorescência nesta região. Os oligonucleotídeos estruturados em NeuroMag e guiados por campo magnético se mostraram eficazes em atravessar a barreira imposta por estes endimócitos, uma vez que a fluorescência foi detectada também no tecido estriatal (Figura 15B). A visualização desta área do estriado em maior aumento (figura 15C), permite identificar oligos marcados com FITC próximos ao núcleo dos neurônios corados com NeuN, assim como de células gliais positivas para GFAP (Figura 15C, superior e inferior, respectivamente). Observa-se que o controle negativo (hemisfério contralateral) não apresentou marcação fluorescente (Figura 15A).

Os neurônios são células de difícil transfecção por metodologias tradicionais, como aquelas que utilizam carreadores lipídicos, por exemplo. A nanopartícula magnética NeuroMag, entretanto, possui como diferencial biotecnológico sua maior afinidade por células neuronais, podendo, ainda, ser guiada por campo magnético

com vistas a promover eficiência aumentada de transfecção dos oligonucleotídeos. Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que a técnica do *Magnetofection*TM é uma ferramenta promissora para a terapia gênica do Parkinson experimental, uma vez que oligos (mimetizadores ou antagomir de microRNAs) poderiam ser carregados por NeuroMag para silenciar genes alvos em células neuronais e gliais do tecido cerebral, visando evitar a progressão da doença.

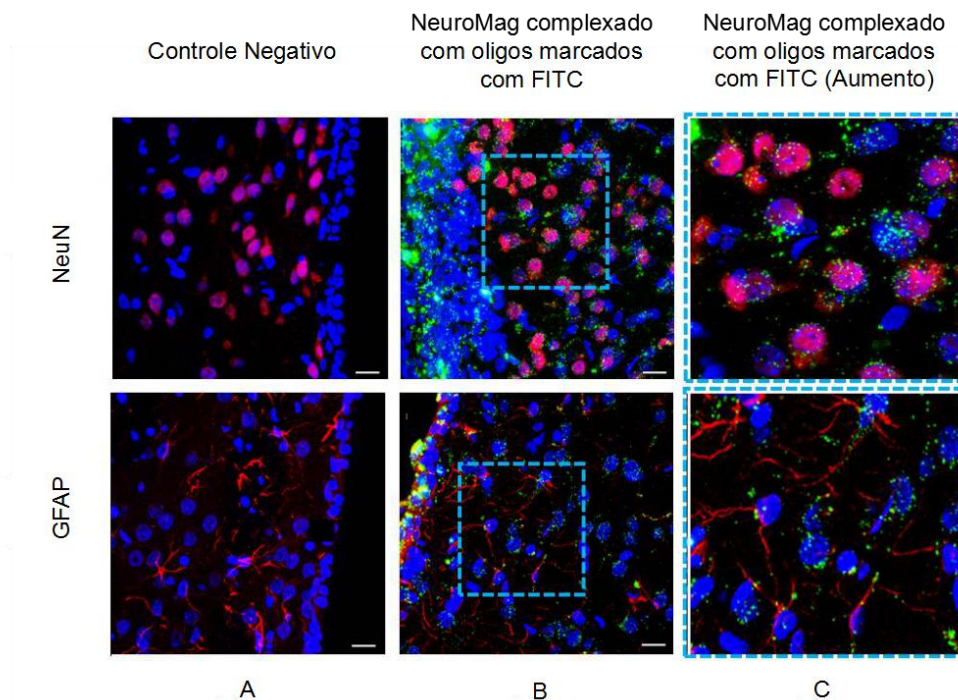


Figura 15. Injeção intracerebroventricular de oligos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) complexado com NeuroMag para transfecção de células estriatais. (A) Estriado de rato esquerdo sem injeção intracerebroventricular (i.c.v.) (controle negativo); (B) Presença de oligos marcados com FITC nas células ependimárias e em neurônios do estriado; (C) região delineada de (B) em maior aumento, revelando o oligonucleotídeo marcado em verde dentro dos neurônios e células gliais (imagens superior e inferior, respectivamente). Imunocoloração de NeuN e GFAP em vermelho; oligos marcados com FITC em verde; núcleo celular em azul, corado por Hoescht 33342. Escala = 15 μ m (Adaptado de Titze de Almeida et al., 2018). Grupo experimental: n=3.

PARTE III

4.3 INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE IMITADORES DE MIR-7 E EFEITOS SOBRE DEGENERAÇÃO NIGRAL NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA

4.3.1 Efeitos de miR-7 na degeneração e microgliose da Substância Negra

A presente etapa concilia as descobertas centrais de nosso estudo - que miR-7 está depletado no cérebro parkinsoniano e que o conteúdo de microRNAs pode ser modulado por oligonucleotídeos sintéticos (113, 114), para responder à seguinte pergunta biológica: - A injeção i.c.v. de imitadores sintéticos de miR-7 (miR-7 *mimic*) conjugados à partícula NeuroMag reduz a perda de células nigrais TH (+) no parkinsonismo experimental?

Animais receberam 0,68 nanomoles de miR-7 *mimic* estruturado em Neuromag aos 5 dias antes da indução do Parkinsonismo experimental (rotenona 3mg/Kg, i.p., cada 24h, durante 10 dias), conforme esquema no topo da Figura 16. A injeção i.c.v. de miR-7 *mimic* reduziu a perda de células nigrais TH (+) causada pela neurotoxina (Figura 16). Observe que o grupo rotenona apresenta menor imunorreatividade para TH na substância negra comparado ao grupo controle (Fig. 16B versus 16A). Observe ainda que houve uma recuperação desta imunorreatividade no grupo tratado com miR-7 *mimic* em relação ao grupo rotenona (Fig. 16D versus 16B). Observe, finalmente, que a nanopartícula Neuromag só é capaz de prevenir a perda das células TH (+) se estiver complexada a miR-7 *mimic* (Fig. 16C versus 16D). A análise densitométrica dos ensaios de imuno-histoquímica confirma a inspeção visual, revelando diferenças entre tratamentos experimentais com significância estatística. Em particular, o grupo rotenona pré-tratado com miR-7 *mimic* associado a Neuromag apresentou intensidade de sinal de TH (+) significativamente maior que o grupo rotenona pré-tratado com a nanopartícula Neuromag vazia (P=0,0358; Fig. 16E).

Conforme sabemos, a atividade de células microgliais e de enzimas ligadas ao estresse oxidativo têm papel relevante na injúria neuronal do parkinsonismo (113,

115, 116). Desta forma, decidimos incluir a microglia na análise dos efeitos de miR-7 sobre degeneração de células nigrais induzida por rotenona, a partir da imunodeteccção de Iba-1. Nossos resultados mostram a intensa microgliose na substância negra dos animais do grupo rotenona, em comparação ao grupo controle (Fig. 17B versus 17A). O tratamento com miR-7 *mimic* atenuou a microgliose observada nos grupos rotenona e rotenona com pré-tratamento da nanopartícula Neuromag vazia. Neste mesmo sentido, a análise mostrou tendência de redução da microgliose ($P=0,0615$) nos animais parkinsonianos tratados com miR-7 *mimic* em relação àqueles que receberam apenas Neuromag (Fig. 17E).

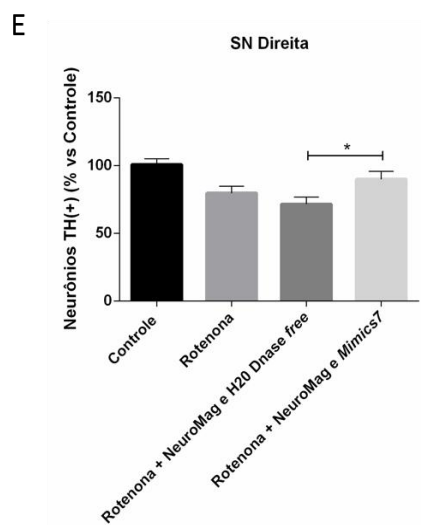
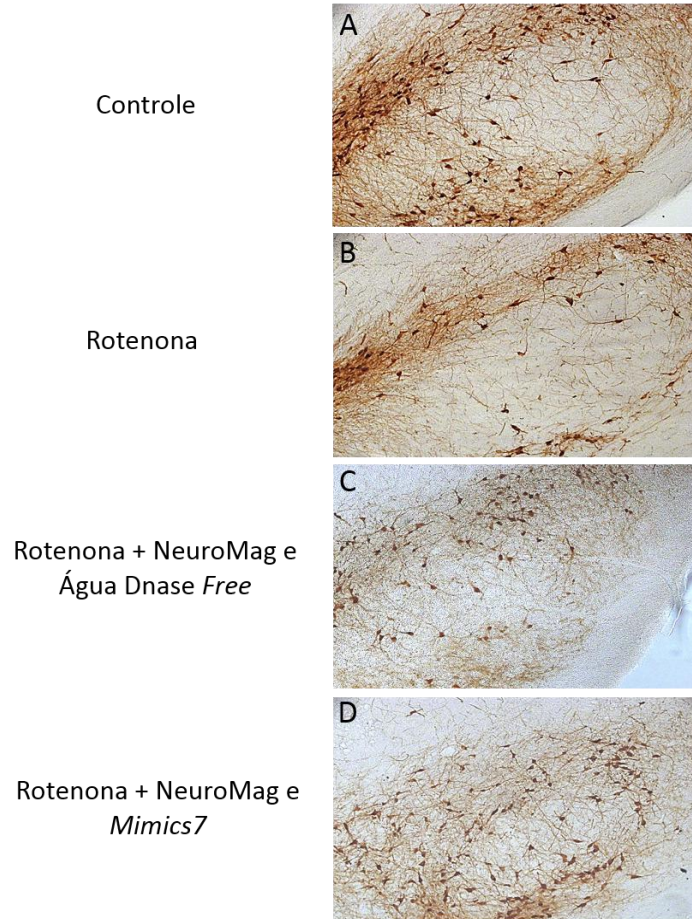
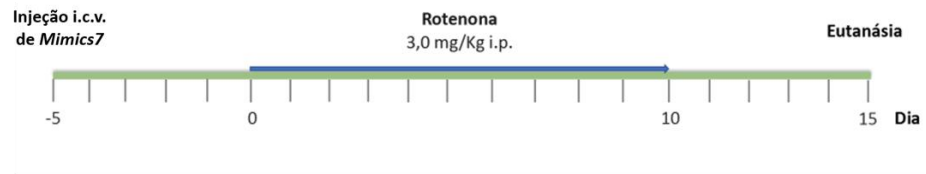


Figura 16. Identificação de neurônios dopaminérgicos na SN direita de animais parkinsonianos previamente tratados com miR-7 *mimic*. No topo, uma representação esquemática do procedimento

experimental. No dia -5 os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para transfecção de miR-7 estruturado em NeuroMag; o mesmo foi realizado para o grupo controle (NeuroMag e água Dnase *free*). Os ratos receberam rotenona (3,0 mg/kg, i.p.) e o grupo controle recebeu o veículo (óleo de girassol) durante dez dias consecutivos. O grupo rotenona e NeuroMag apresentaram diminuição de neurônios TH (+) na substância negra direita. Animais tratados com miR-7 *mimic* apresentaram aumento significativo de células dopaminérgicas quando comparados com aqueles injetados apenas com NeuroMag ($p=0,0358$). Os valores de neurônios TH positivos foram comparados ao encontrados no grupo controle, sendo estes arbitrariamente designados como 100%. Barras expressam média \pm SEM. Diferenças nos valores da imunodeteção de TH foram examinadas por teste t não pareado para os grupos NeuroMag e miR-7 *mimic* na SN direita. Os grupos controle e rotenona foram excluídos da análise estatística. Fotos em aumento de 10X. Grupos experimentais: controle (n=7), rotenona (n=9), Neuromag (n=7) e miR-7 *mimic* (n=8).

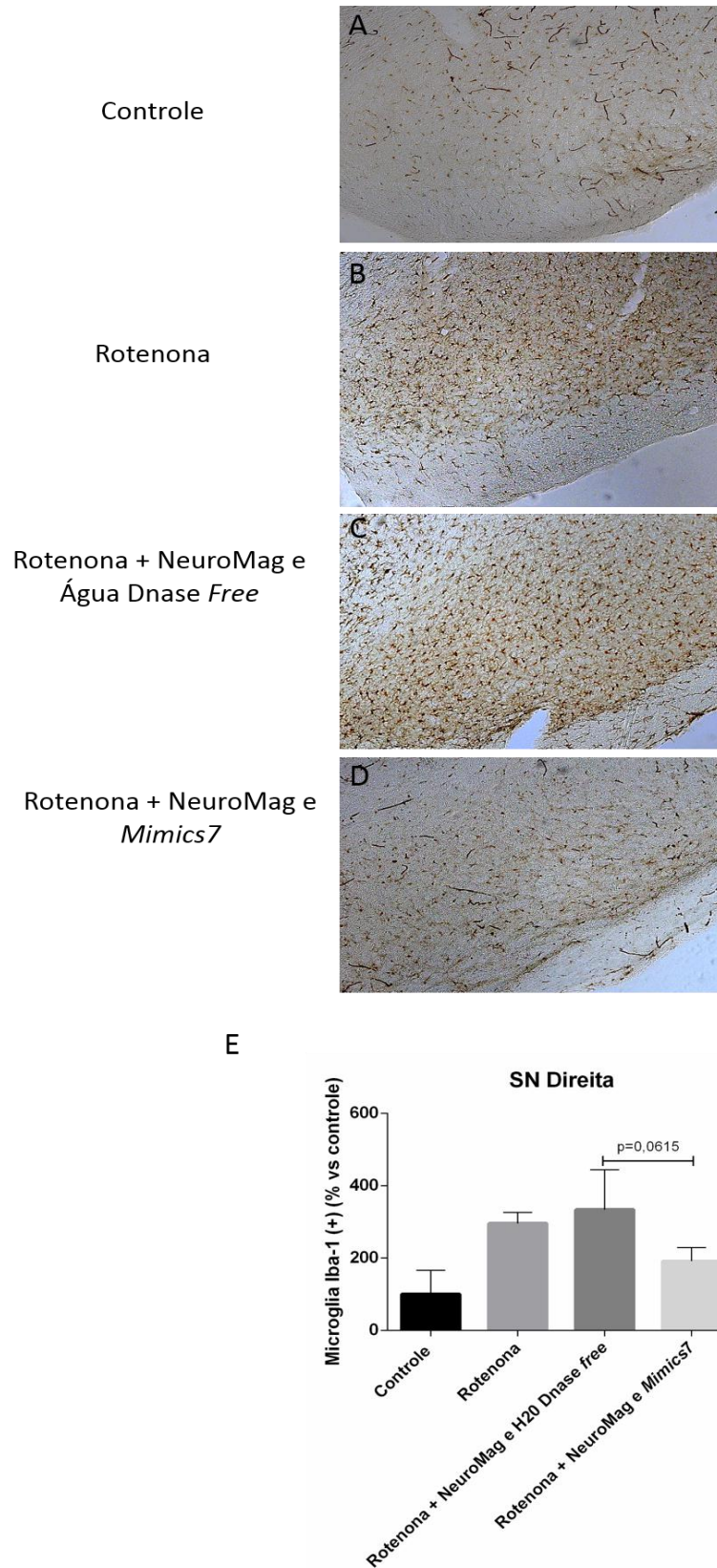


Figura 17. Avaliação de microgliose com imunomarcção de Iba-1 na SN direita de animais parkinsonianos previamente tratados com miR-7 *mimic*. Os grupos rotenona e NeuroMag apresentaram aumento de microgliose nesta região. Observa-se tendência de redução de microgliose

no grupo tratado com miR-7 *mimic* quando comparado com o grupo NeuroMag ($p=0,0615$). Os valores de neurônios Iba-1 positivos foram comparados ao encontrados no grupo controle, sendo estes arbitrariamente designados como 100%. Barras expressam média \pm SEM. Diferenças nos dados de imunorreatividade de Iba-1 foram avaliados por teste t de Student não pareado para os grupos NeuroMag e miR-7 *mimic* na SN direita. Os demais grupos foram excluídos da análise estatística. Fotos em aumento de 10X. Grupos experimentais: controle (n=7), rotenona (n=9), Neuromag (n=7) e miR-7 *mimic* (n=8).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou se a neurodegeneração característica da doença de Parkinson – representada pela perda de neurônios dopaminérgicos, neuroinflamação e comprometimento motor – poderia ser acompanhada por um novo componente patológico: RNAs não codantes aberrantemente expressos, os microRNAs. Caso os microRNAs participassem da injúria parkinsoniana, a questão seguinte seria avaliar se sua expressão poderia ser modulada mediante oligonucleotídeos sintéticos. Tal estratégia poderia abrir uma nova fronteira terapêutica para o Parkinson: alternativas denominadas de agentes neuroprotetores, também referidos como modificadores da evolução da doença (*disease-modifying drugs*) ou ainda retardadores do progresso do distúrbio (*slowing disease progression*).

Inicialmente, para entendermos a neurodegeneração parkinsoniana é necessário estabelecermos um modelo animal que represente – como aproximação – o comprometimento motor e características patológicas que ocorrem na doença, além do seu tempo de evolução (117). Decidimos trabalhar, portanto, com a preparação experimental da rotenona, inicialmente proposta por Betarbet et al. (41), e modificada por Bassani et al (103). A exposição crônica de roedores à neurotoxina causa perda seletiva de células dopaminérgicas, comprometimento motor e formação de agregados intracelulares semelhantes aos corpos de Lewy (11, 118, 119). No atual trabalho, confirmamos que dez injeções intraperitoneais consecutivas de rotenona induzem morte moderada de neurônios TH positivos, acompanhada de neurodegeneração e neuroinflamação da via nigroestriatal, assim como prejuízo locomotor no período de 21 até 35 dias após a primeira injeção, conforme publicado previamente por nosso grupo (113). Estudos prévios revelaram cenário semelhante mediante a administração da mesma dose e período de exposição à toxina em ratos machos Wistar: comprometimento motor e perda de neurônios dopaminérgicos nigrais. A avaliação comportamental foi realizada após o término das injeções, demonstrando a correlação do comprometimento motor com a morte seletiva de células dopaminérgicas induzida por rotenona (102, 103), corroborando nossos resultados.

Uma vez representadas experimentalmente alterações neuropatológicas relevantes da doença, é possível estabelecer estratégias e alvos neuroprotetores. Para tanto, Emborg (117) descreve que o modelo deve induzir uma injúria nigral reproduzível, oferecendo oportunidade para testes de estratégias terapêuticas. No que se refere à história natural do Parkinson, tal oportunidade estaria na fase prodrômica da doença (em que a neurodegeneração é evidente, porém o paciente não apresenta ainda os sintomas motores para o diagnóstico definitivo da doença) e também a fase inicial da doença, onde a degeneração nigroestriatal causa sinais motores leves e menos debilitantes do que em estágios avançados (15, 120). Vale destacar que o tratamento na fase prodrômica depende do diagnóstico precoce do PD, ainda na fase sem sinais motores. Isto é uma demanda para o futuro, sendo que os microRNAs juntamente com outras ferramentas poderiam ajudar neste diagnóstico (121-123). Pacientes com o distúrbio relataram que é possível viver com a doença, sendo que o mais importante seria o retardo da neurodegeneração (9). Admitindo-se que aproximadamente 50% ou mais dos neurônios dopaminérgicos já estão degenerados quando é dado o diagnóstico (13), torna-se relevante o estabelecimento de estratégias neuroprotetoras capazes de proteger o restante dos neurônios ainda funcionais, prevenindo a evolução do distúrbio. Dessa forma, é interessante utilizar um modelo de estudo que seja capaz de estabelecer uma injúria branda semelhante ao que ocorreria no período entre o final da fase prodrômica não-motora e o estágio inicial do Parkinson. Conforme citado, a rotenona causa lesão moderada da via nigroestriatal, com perda seletiva de aproximadamente 30% das células dopaminérgicas, assim recapitulando o que seria o estágio inicial da doença.

A seguir, focamos no principal alvo da nossa pesquisa. Estudos atuais têm revelado a importância dos miRNAs para o desenvolvimento e funcionamento do Sistema Nervoso (70). Considerando-se que um microRNA pode regular em nível pós transcricional centenas de genes alvos por interferência de RNA (57, 124), pode-se supor que uma expressão aberrante de tais RNAs induziria severas consequências cerebrais (71, 125). De fato, expressões desreguladas de microRNAs contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como o Parkinson (72). No entanto, assim como um microRNA pode possuir papel na patogênese da DP, o mesmo pode ser considerado alvo terapêutico para neuroproteção (57, 88-91). A própria complexidade da doença de Parkinson, em termos de vias de sinalização com diferentes células e seus respectivos

neurotransmissores, apoia a hipótese dos miRNAs como alvos terapêuticos. Investigar uma terapia baseada em reguladores de centenas de genes alvos poderá, assim, fornecer uma mudança mais abrangente na patogênese da doença. Para planejar uma terapia baseada em microRNAs, é necessário primeiro identificarmos quais deles estão aberrantemente expressos em áreas afetadas pelo Parkinson.

O presente estudo investigou microRNAs já correlacionados com desordens neurodegenerativas, avaliando sua expressão no modelo da rotenona. Optou-se por examinar a região do estriado dos animais parkinsonianos, já que está diretamente afetada neste distúrbio (15). A neurodegeneração estriatal induzida por rotenona apresentou padrões de microRNAs regulados positiva ou negativamente, que representariam uma “assinatura” relacionada ao Parkinson. Vale destacar que a expressão dos microRNAs foi avaliada três semanas após o término das injeções de rotenona; portanto representa uma consequência patológica da injúria, e não um resultado à exposição da neurotoxina. Curiosamente, observamos que a expressão de apenas um microRNA dos analisados manteve-se inalterada mesmo após a lesão induzida por rotenona: miR-382. Tal estabilidade sugere que esse miRNA não está envolvido com a neurodegeneração induzida pela toxina, o que poderá ser futuramente confirmado por estudos funcionais utilizando oligos sintéticos que inibam ou que imitem miR-382. Ademais, o papel do miR-382 no desenvolvimento do Parkinson poderia ser explorado por modelos da doença que envolvam outros mecanismos de patogenicidade.

No que se refere aos miRNAs que tiveram expressão aumentada no estriado de ratos parkinsonianos (miR-34a, miR-26a e miR-132), em trabalho previamente publicado por nosso grupo (113) também foi encontrado aumento de conteúdo de miR34a. Neste caso, o modelo utilizado foi células SH-SY5Y submetidas a injúria por rotenona. A inibição deste miR-34a por oligonucleotídeos sintéticos (AntimiR) foi capaz de atenuar a injúria celular (126). Desta forma, a expressão estriatal aberrante de miR-34a, identificada no presente trabalho, corrobora os dados encontrados *in vitro*, sugerindo a possível participação do mesmo na morte neuronal e comprometimento motor dos animais. Células PC12 diferenciadas e expostas ao MPP+ também apresentaram superexpressão de miR-34a, culminando em estresse oxidativo e morte celular. Essas células mostraram um esperado aumento na expressão de genes alvo de miR-34a, incluindo regulador de informação silenciosa 1 (SIRT1), linfoma de células B2 (BCL2) e fator neurotrófico derivado do cérebro

(BDNF), estabelecendo a via bioquímica para neuropatologia dopaminérgica. A participação deste miRNA na patogênese da DP é uma questão a ser investigada mediante injeção de oligonucleotídeos AntimiR-34a no cérebro de animais parkinsonianos (127).

O segundo microRNA mais expresso, miR-26a, também apresentou conteúdo elevado em células mononucleares sanguíneas periféricas de pacientes com DP (128). Esta molécula regula a expressão de BDNF, fator essencial para a neurogênese e sobrevivência neuronal (129). Dessa forma, o aumento de expressão de miR-26a poderia induzir a diminuição de BDNF e, assim, pode-se especular que a desregulação observada em nosso estudo estaria relacionada com a redução dos níveis de BDNF achada em pacientes parkinsonianos com déficit cognitivo (130, 131). Por fim, miR-132 apresentou também elevada expressão; não obstante, foi relativamente menor em relação a miR-26a e miR-34a hiperexpressos no estriado de animais parkinsonianos. Nossos resultados corroboram achados de estudo anterior, que mostrou aumento de miR-132 em modelo transgênico de DP, seguido de diminuição da proteína relacionada ao receptor nuclear 1 (Nurr1) e consequente diminuição de BDNF no tecido cerebral e soro mesencefálico (132).

A assinatura de microRNAs no estriado de animais parkinsonianos revelou dois alvos potencialmente envolvidos na patogênese da doença que apresentam expressão diminuída: Let-7a e miR-7.

Let-7a exerce papel modulatório sobre a função da microglia na neuroinflamação, mediante redução do estresse oxidativo, supressão da enzima NO sintase induzida (iNOS) e interleucina 6 (IL-6), assim como do aumento de BDNF, IL-10 e IL-4 (133). De outro lado, células microgliais ativadas apresentam um papel essencial nas respostas inflamatórias em áreas com perda dopaminérgica durante a progressão de DP (107, 108, 134), o que observamos no estriado dos animais parkinsonianos. Hipotetizamos que a depleção de Let-7a pode ter contribuído para a microgliose encontrada no grupo rotenona, dadas as funções regulatórias deste microRNA sobre células e mediadores da neuroinflamação.

Uma mudança criticamente importante observada no grupo exposto à neurotoxina foi a depleção de miR-7. Esse resultado corrobora achados anteriores em pacientes com DP assim como em animais parkinsonianos (86, 111). miR-7 exerce papel no controle da neuroinflamação – mediante supressão da microgliose, bem como proteção de neurônios dopaminérgicos, conforme observado no modelo

de MPTP (111). Nossos resultados corroboram tais achados e reforçam a hipótese de que a expressão aberrante de miR-7 é fato relevante na patogênese do Parkinson. Propomos que a falta de miR-7 contribua diretamente para a microgliose e consequente perda de neurônios TH (+) na substância negra, ambas alterações observadas em nosso modelo de injeção crônica e sistêmica de rotenona.

Destaque-se que estudo anterior mostrou correlação direta entre a depleção de miR-7 e os eventos de acumulação de alfa-sinucleína, perda de neurônios dopaminérgicos e redução de dopamina, além de confirmar a redução deste miRNA na substância negra de pacientes com DP (87).

As evidências científicas publicadas anteriormente, bem como os resultados do presente estudo, revelam a importância da desregulação de miR-7 na patobiologia do Parkinson. Pode-se concluir que uma terapia gênica capaz de repor miR-7 aos níveis fisiológicos tem potencial biotecnológico no tratamento desta desordem neurodegenerativa. Sendo assim, foi o microRNA alvo escolhido para nossos ensaios de modulação gênica.

Desde a descoberta dos microRNAs e o seu papel na regulação de doenças cerebrais, dois grandes desafios surgiram para a introdução de terapias baseadas em miRNAs: providenciar um efeito de silenciamento gênico prolongado, fator que foi obtido mediante alterações químicas nos nucleotídeos do RNA (135) e a estratégia de *delivery* dos moduladores no cérebro (136, 137). Neurônios são difíceis de transfectar, além de a barreira hematoencefálica representar um obstáculo para a entrega de oligos no sistema nervoso central (57). Nesse sentido, Soto-Sánchez et al. (2015) demonstraram pela primeira vez a capacidade de uma partícula magnética em entregar ácidos nucleicos *in vivo* através do uso de campos magnéticos, tecnologia denominada de *magnetofection*TM (98). A nanopartícula utilizada neste estudo, NeuroMag, é composta por copolímeros de poliestileno cobertos por ferro e visa a transfecção de neurônios primários, assim como de linhagens neuronais e células da glia. Neste sentido, plasmídeos complexados com NeuroMag, direcionados por um campo magnético, foram transfectados de forma seletiva em células piramidais do córtex visual de ratos. Tal resultado demonstra que a tecnologia de *magnetofection*TM pode ser uma estratégia eficiente para superar as limitações da transfecção neuronal, permitindo a entrega de oligos ativos funcionalmente no sistema nervoso *in vivo* (98). Estudos anteriores de nosso grupo corroboraram esse achado, embora usando uma estrutura genética distinta (oligonucleotídeo pequeno de fita simples), em que

NeuroMag transfectou seletivamente um inibidor de miR-134 (AntimiR-134) em neurônios cerebrais (114). Em ambos estudos, a partícula transfectou ácidos nucleicos no corpo celular e dendritos apicais de neurônios piramidais. Dessa forma, o uso de campos magnéticos via tecnologia de *magnetofection* se mostra uma ferramenta promissora para auxiliar na transfecção dos oligos guiada por campo magnético, potencializando a seletividade da terapia e reduzindo os efeitos colaterais.

Além disso, a caracterização da nanopartícula foi consistente com resultados prévios (98). Ocorreu aumento do diâmetro médio do NeuroMag e redução da carga superficial após a conjugação com os oligos, o que sugere efetiva absorção na superfície do NeuroMag (114). As mudanças no tamanho da partícula podem indicar o espaço preenchido pelos oligonucleotídeos ao seu redor, assim como a redução do potencial Zeta pode ser explicada por mudança de carga elétrica, visto que os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos são carregados negativamente (98), (138).

Um aspecto importante que devemos destacar é a via de administração utilizada nesse trabalho: a injeção i.c.v. O local escolhido permitiu a biodistribuição eficiente dos oligos pela camada ependimária, alcançando neurônios e células da glia do estriado (114). Esse achado corrobora estudos anteriores que utilizaram o ventrículo lateral como via de administração de agentes neuroprotetores (139). A rota i.c.v., portanto, possui um potencial em promover, de forma eficaz e ampla, a distribuição dos oligonucleotídeos no estriado, região que por sua vez é anatomicamente extensa.

É importante ressaltar que para considerarmos a estratégia proposta nesse trabalho como promissora, a nossa ferramenta biotecnológica deve cumprir a sua função. De fato, demonstramos em trabalho anterior que a transfecção de inibidores de miR-134 em neurônios estriatais de ratos silenciou a expressão do microRNA alvo, cujo efeito perdurou por pelo menos sete dias após a injeção i.c.v. (114). Esse resultado concorda com outro achado do nosso grupo, no qual o silenciamento do miRNA alvo reduziu a perda dopaminérgica *in vitro* (126). Os inibidores de microRNAs complexados com NeuroMag são, portanto, potenciais ferramentas para diminuir o conteúdo de microRNAs superexpressos em doenças cerebrais como a DP, em que a degeneração estriatal é um marco patológico da doença.

Uma vez estabelecidos o modelo da rotenona e a estratégia de *delivery* dos oligos, investigamos os efeitos da reposição de miR-7 em animais com

parkinsonismo induzido por rotenona. Conforme havíamos exposto anteriormente, miR-7 tem expressão diminuída no modelo da neurotoxina e tal depleção contribuiu para a perda de neurônios nigroestriatais e microgliose. Hipotetizamos que a restauração do conteúdo de miR-7 poderia diminuir a neurodegeneração induzida por rotenona. Para tanto, estudos indicam que terapias estabelecidas antes do estágio clínico do Parkinson apresentam maior potencial terapêutico em relação às realizadas tardiamente (15). Dessa forma, decidimos transfectar, via injeção i.c.v., oligonucleotídeos sintéticos mimetizadores do microRNA 7 (miR-7 *mimic*) carregados por NeuroMag em ratos antes da injúria por rotenona. Nesse sentido, o efeito da reposição deveria perdurar pelo menos até o término das injeções de rotenona. Esses objetivos demandaram a sintetização de oligonucleotídeos mimetizadores de miR-7 com adição de cinco citosinas aneladas a cinco guaninas na extremidade oposta ao da região de reconhecimento - tecnologia conhecida como *RNAi Cap* - para aumento da eficiência de silenciamento gênico e diminuição de efeitos inespecíficos (140).

Estudos prévios relataram expressão reduzida de miR-7 em animais expostos a 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) e em pacientes parkinsonianos, evidenciando a participação do microRNA no mecanismo patológico da doença (85, 111). A reposição deste miRNA via miR-7 *mimic* em células SH-SY5Y revelou efeito neuroprotetor diante do insulto de MPP+. Concomitantemente, a redução dos níveis de miR-7 provocou morte dopaminérgica no mesmo modelo, reforçando a sua participação na neurodegeneração (109). Um dos marcos patológicos da doença é a perda de neurônios TH positivos nigroestriatais, resultando na perda motora característica do distúrbio (11).

Com base no exposto, hipotetizamos que a reposição de miR-7 protegeria neurônios dopaminérgicos nigrais da injúria induzida por rotenona, refletindo em um maior número de células vivas. A injeção i.c.v. de miR-7 *mimic* protegeu neurônios da substância negra no parkinsonismo induzido por rotenona. Potenciais mecanismos desta neuroproteção de miR-7, envolvendo a atividade mitocondrial, podem ser sugeridos. A toxina rotenona é capaz de bloquear o sistema mitocondrial I, resultando em diminuição de ATP, aumento de estresse oxidativo e morte celular. No que se refere à mitocôndria, o seu potencial de membrana é regulado pela proteína poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP). Em condições de toxicidade, PTP é degradada, gerando a despolarização da membrana e consequente fragmentação da

organela (141, 142). MiR-7 é responsável pela regulação do canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1) da PTP. A elevada expressão deste miRNA reduziu a degradação mitocondrial induzida por MPP⁺ em células dopaminérgicas SH-SY5Y e em neurônios corticais primários. Especula-se que a interferência de miR-7 sobre canais VDAC1 reduziria a liberação de elementos pró-apoptóticos como citocromo c e cálcio no citoplasma (143), diminuindo assim a morte celular.

A disfunção mitocondrial também resulta na redução de ATP, elevando a taxa de glicólise celular. Chaudhuri et al. revelaram que o miR-7 silencia o fator de transcrição RelA, favorecendo o ciclo de glicólise, culminando na proteção das células SH-SY5Y expostas à MPP⁺ (144). De forma semelhante, miR-7 auxilia no controle do estresse oxidativo, consequência da inibição do complexo I mitocondrial, o que é aspecto crítico na morte da célula dopaminérgica (145, 146). Espécies reativas de oxigênio induzem severos efeitos, como inibição da cadeia respiratória mitocondrial, acúmulo de radicais livres e lesões nas fitas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (147, 148). O microRNA 7 suprime a proteína associada à ECH tipo Kelch 1 (Keap1), aumentando a atividade do fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2), culminando na elevada expressão de genes antioxidantes. A superexpressão deste miRNA também induz elevação dos níveis de glutathiona, diminuindo em 50% a presença de hidroperóxidos em células SH-SY5Y lesadas por MPP⁺ (112). Por outro lado, a deficiência de miR-7 agravaria o estresse oxidativo celular. Considerando que o mecanismo patológico da rotenona é semelhante ao do MPP⁺ - via inibição do complexo I mitocondrial, sugerimos que a neuroproteção observada em nosso trabalho decorre das ações benéficas de miR-7 contra mecanismos patológicos induzidos pela toxina, principalmente relacionados à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo.

Neste ponto, trataremos do papel de miR-7 sobre a neuroinflamação. Conforme descrito previamente, células microgliais possuem participação na resposta inflamatória em regiões com perda neuronal (149, 150). O fator de transcrição NF- κ B é responsável pela regulação gênica envolvida na inflamação e morte celular (151). Estudos demonstraram que o miR-7 silencia o fator RelA, componente de NF- κ B (109, 152-154). Consequentemente, a reposição do miRNA diminuiria a injúria de células SH-SY5Y induzida por MPP⁺ devido à supressão de NF- κ B (109). Os nossos resultados revelam que ratos parkinsonianos tratados com miR-7 *mimic* apresentaram tendência de redução da microgliose na substância negra. Tal achado

corroborar resultados de Choi et al. (109) e reforçam o papel de miR-7 no controle da neuroinflamação.

Os resultados do presente estudo e de trabalhos anteriores sobre o microRNA 7 revelam seu papel protetor contra mecanismos subjacentes da doença de Parkinson, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, e acúmulo de alfa-sinucleína, evidenciando tratar-se de alvo promissor para terapêutica da doença. Estudos complementares com outros modelos de sinucleinopatia poderão confirmar a eficácia de imitadores de miR-7 no controle do parkinsonismo experimental, além de examinar aspectos como toxicidade, farmacocinética, e curva dose-resposta.

6. CONCLUSÃO

Considerando-se os seguintes resultados desta dissertação:

✓ A rotenona induz uma assinatura aberrante de microRNAs no estriado de animais parkinsonianos;

✓ A nanopartícula NeuroMag é capaz de transfectar oligonucleotídeos no estriado mediante injeção intracerebroventricular, revelando potencial estratégia de *delivery* de fármacos de RNAi;

✓ A reposição de miR-7 via oligonucleotídeos sintéticos imitadores deste miRNA protege os neurônios dopaminérgicos nigrais diante do insulto da rotenona.

Concluimos que microRNAs estão envolvidos na neurobiologia do Parkinson experimental e que miR-7 é alvo terapêutico promissor para reduzir a perda de células dopaminérgicas e a microgliose da substância negra.

7. REFERÊNCIAS

1. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14(2):223-36; discussion 2.
2. Lewy FH. Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch: Z Nervenheilk;* 1914. p. 50-5.
3. Lewy FH. Paralysis agitans. I Pathologische Anatomie, in: M Lewandowsky (Ed), *Handbuch der Neurologie.* Berlin: Springer; 1912. p. 920-33.
4. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997;388(6645):839-40.
5. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord.* 2017;32(9):1264-310.
6. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(6):525-35.
7. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003;157(11):1015-22.
8. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:193-222.
9. Fahn S. The 200-year journey of Parkinson disease: Reflecting on the past and looking towards the future. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018;46 Suppl 1:S1-S5.
10. Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P. Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011;17(10):717-23.
11. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
12. Marsden CD. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1983;19:121-41.
13. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991;114 (Pt 5):2283-301.
14. de la Fuente-Fernández R, Schulzer M, Kuramoto L, Cragg J, Ramachandiran N, Au WL, et al. Age-specific progression of nigrostriatal dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2011;69(5):803-10.

15. Postuma RB, Berg D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(11):622-34.
16. Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ. Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol*. 2012;124(2):153-72.
17. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J*. 2012;31(14):3038-62.
18. Rohn TT. Targeting alpha-synuclein for the treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(2):174-9.
19. Yong-Kee CJ. Mitochondrial Dysfunction Precedes Other Sub-Cellular Abnormalities in an In Vitro Model Linked with Cell Death in Parkinson's Disease. In: E. Sidorova AH, G Perera , J. E. Nash, editor. 2012.
20. Hauser DN, Hastings TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis*. 2013;51:35-42.
21. Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*. 2011;91(4):1161-218.
22. Polymeropoulos MH. Autosomal dominant Parkinson's disease and alpha-synuclein. *Ann Neurol*. 1998;44(3 Suppl 1):S63-4.
23. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44(4):601-7.
24. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*. 2004;55(2):164-73.
25. Cookson MR. Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(9):a009415.
26. Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ, Rohé CF, Zini M, Canesi M, et al. The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. *J Med Genet*. 2005;42(11):e65.
27. Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:141-64.

28. Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease: a population-based case-control study in Europe. EUROPARKINSON Study Group. *Neurology*. 1999;52(9):1876-82.
29. Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2002;23(4-5):487-502.
30. Gash DM, Rutland K, Hudson NL, Sullivan PG, Bing G, Cass WA, et al. Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. *Ann Neurol*. 2008;63(2):184-92.
31. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2009;34(2):279-90.
32. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999;46(4):598-605.
33. Jankovic J, Poewe W. Therapies in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(4):433-47.
34. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 2002;24(4):308-18.
35. Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res*. 2010;184:17-33.
36. Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;171(11):750-61.
37. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Electron microscopy of Lewy bodies in the amygdala-parahippocampal region. Comparison with inclusion bodies in the MPTP-treated squirrel monkey. *Adv Neurol*. 1996;69:217-28.
38. Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(9):920-34.
39. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 2011;119(6):866-72.

40. Johnson ME, Bobrovskaya L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology*. 2015;46:101-16.
41. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1301-6.
42. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res*. 2002;136(1):317-24.
43. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1989;26(6):719-23.
44. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*. 1989;1(8649):1269.
45. Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, et al. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem*. 2007;101(6):1491-504.
46. Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):92-6.
47. Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*. 2003;84(3):491-502.
48. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*. 2003;179(1):9-16.
49. Mulcahy P, O'Doherty A, Paucard A, O'Brien T, Kirik D, Dowd E. Development and characterisation of a novel rat model of Parkinson's disease induced by sequential intranigral administration of AAV- α -synuclein and the pesticide, rotenone. *Neuroscience*. 2012;203:170-9.
50. Ravenstijn PG, Merlini M, Hameetman M, Murray TK, Ward MA, Lewis H, et al. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;57(2):114-30.

51. Xiong N, Huang J, Zhang Z, Xiong J, Liu X, Jia M, et al. Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. *PLoS One*. 2009;4(11):e7878.
52. Tapias V, Cannon JR, Greenamyre JT. Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone Parkinson's disease model. *J Neurosci Res*. 2010;88(2):420-7.
53. Alam M, Schmidt WJ. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res*. 2004;153(2):439-46.
54. Salama M, Ellaithy A, Helmy B, El-Gamal M, Tantawy D, Mohamed M, et al. Colchicine protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(7):836-43.
55. Sonia Angeline M, Chatterjee P, Anand K, Ambasta RK, Kumar P. Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. *Neuroscience*. 2012;220:291-301.
56. Sonia Angeline M, Sarkar A, Anand K, Ambasta RK, Kumar P. Sesamol and naringenin reverse the effect of rotenone-induced PD rat model. *Neuroscience*. 2013;254:379-94.
57. Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm Res*. 2017;34(7):1339-63.
58. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
59. Ramalingam P, Palanichamy JK, Singh A, Das P, Bhagat M, Kassab MA, et al. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA*. 2014;20(1):76-87.
60. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
61. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097-101.
62. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887-901.
63. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.

64. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA*. 2012;18(11):2083-92.
65. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
66. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
67. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D154-8.
68. Qiu L, Tan EK, Zeng L. microRNAs and Neurodegenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2015;888:85-105.
69. Batistela MS, Josviak ND, Sulzbach CD, de Souza RL. An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Int J Neurosci*. 2017;127(6):547-58.
70. Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(12):911-20.
71. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64-71.
72. Hébert SS, De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 2009;32(4):199-206.
73. Spano M, Signorelli M, Vitaliani R, Aguglia E, Giometto B. The possible involvement of mitochondrial dysfunctions in Lewy body dementia: a systematic review. *Funct Neurol*. 2015;30(3):151-8.
74. Xie Y, Chen Y. microRNAs: Emerging Targets Regulating Oxidative Stress in the Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2016;10:298.
75. Heman-Ackah SM, Hallegger M, Rao MS, Wood MJ. RISC in PD: the impact of microRNAs in Parkinson's disease cellular and molecular pathogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2013;6:40.
76. Teixeira Dos Santos MC, Bell R, da Costa AN. Recent developments in circulating biomarkers in Parkinson's disease: the potential use of miRNAs in a clinical setting. *Bioanalysis*. 2016;8(23):2497-518.
77. Marques TM, Kuiperij HB, Bruinsma IB, van Rumund A, Aerts MB, Esselink RAJ, et al. MicroRNAs in Cerebrospinal Fluid as Potential Biomarkers for Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Mol Neurobiol*. 2017;54(10):7736-45.
78. Mushtaq G, Greig NH, Anwar F, Zamzami MA, Choudhry H, Shaik MM, et al. miRNAs as Circulating Biomarkers for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Med Chem*. 2016;12(3):217-25.

79. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 2007;317(5842):1220-4.
80. Mouradian MM. MicroRNAs in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2012;46(2):279-84.
81. Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:16-27.
82. Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. 2000;404(6776):394-8.
83. Lakso M, Vartiainen S, Moilanen AM, Sirviö J, Thomas JH, Nass R, et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem*. 2003;86(1):165-72.
84. Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*. 2000;287(5456):1265-9.
85. Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):13052-7.
86. Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2012;133(2):142-50.
87. 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. *Mol Ther*. 2017;25(10):2404-14.
88. Ishida M, Selaru FM. miRNA-Based Therapeutic Strategies. *Curr Anesthesiol Rep*. 2013;1(1):63-70.
89. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*. 2010;70(18):7027-30.
90. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med*. 2014;6(7):851-64.
91. Wang Y, Yang Z, Le W. Tiny But Mighty: Promising Roles of MicroRNAs in the Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease. *Neurosci Bull*. 2017;33(5):543-51.
92. Buxton ILO BL. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. Goodman and Gilman's The

Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc; 2011. p. 17-40.

93. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014;15(8):541-55.

94. Zhao J, Feng SS. Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(14):2199-228.

95. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev.* 2009;109(2):259-302.

96. Zhao C, Strappe PM, Lever AM, Franklin RJ. Lentiviral vectors for gene delivery to normal and demyelinated white matter. *Glia.* 2003;42(1):59-67.

97. Pezzoli D, Chiesa R, De Nardo L, Candiani G. We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J Appl Biomater Funct Mater.* 2012;10(2):82-91.

98. Soto-Sánchez C, Martínez-Navarrete G, Humphreys L, Puras G, Zarate J, Pedraz JL, et al. Enduring high-efficiency in vivo transfection of neurons with non-viral magnetoparticles in the rat visual cortex for optogenetic applications. *Nanomedicine.* 2015;11(4):835-43.

99. Yiu HH. Engineering the multifunctional surface on magnetic nanoparticles for targeted biomedical applications: a chemical approach. *Nanomedicine (Lond).* 2011;6(8):1429-46.

100. Pickard MR, Chari DM. Robust uptake of magnetic nanoparticles (MNPs) by central nervous system (CNS) microglia: implications for particle uptake in mixed neural cell populations. *Int J Mol Sci.* 2010;11(3):967-81.

101. Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(14-15):1300-31.

102. Morais LH, Lima MM, Martynhak BJ, Santiago R, Takahashi TT, Ariza D, et al. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. *Pharmacol Rep.* 2012;64(5):1081-90.

103. Bassani TB, Gradowski RW, Zaminelli T, Barbiero JK, Santiago RM, Boschen SL, et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Res.* 2014;1593:95-105.

104. Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *J Vis Exp.* 2009(28).

105. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
106. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press; 2005.
107. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18 Suppl 1:S210-2.
108. Kaur K, Gill JS, Bansal PK, Deshmukh R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2017;381:308-14.
109. Choi DC, Chae YJ, Kabaria S, Chaudhuri AD, Jain MR, Li H, et al. MicroRNA-7 protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death by targeting RelA. *J Neurosci*. 2014;34(38):12725-37.
110. Li S, Lv X, Zhai K, Xu R, Zhang Y, Zhao S, et al. MicroRNA-7 inhibits neuronal apoptosis in a cellular Parkinson's disease model by targeting Bax and Sirt2. *Am J Transl Res*. 2016;8(2):993-1004.
111. 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*. 2016;11:28.
112. 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*. 2015;89:548-56.
113. Horst CH, Schlemmer F, de Aguiar Montenegro N, Domingues ACM, Ferreira GG, da Silva Ribeiro CY, et al. Signature of Aberrantly Expressed microRNAs in the Striatum of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats. *Neurochem Res*. 2018;43(11):2132-40.
114. Titze de Almeida SS, Horst CH, Soto-Sánchez C, Fernandez E, Titze de Almeida R. Delivery of miRNA-Targeted Oligonucleotides in the Rat Striatum by Magnetofection with Neuromag. *Molecules*. 2018;23(7).
115. Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS, Ferreira NR, Fontanari C, Faccioli LH, Del Bel E. Suppressing nNOS Enzyme by Small-Interfering RNAs Protects SH-SY5Y Cells and Nigral Dopaminergic Neurons from 6-OHDA Injury. *Neurotox Res*. 2019.

116. Issy AC, Nascimento GC, Abreu GHD, Tristão FS, Del-Bel E, Duarte T, et al. Differential behavioral and glial responses induced by dopaminergic mechanisms in the iNOS knockout mice. *Behav Brain Res.* 2018;350:44-53.
117. Emborg ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods.* 2004;139(2):121-43.
118. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005;2(3):484-94.
119. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):225-41.
120. 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. *Mov Disord.* 2014;29(4):454-62.
121. Doppler K, Jentschke HM, Schulmeyer L, Vadasz D, Janzen A, Luster M, et al. Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2017;133(4):535-45.
122. Graebner AK, Tarsy D, Shih LC, Vanderhorst V, Kulkarni O, Kaplan S, et al. Clinical Impact of 123I-iodoflupane SPECT (DaTscan) in a Movement Disorder Center. *Neurodegener Dis.* 2017;17(1):38-43.
123. Tolosa E, Borghet TV, Moreno E, Group DCUPSS. Accuracy of DaTSCAN (123I-iodoflupane) SPECT in diagnosis of patients with clinically uncertain parkinsonism: 2-year follow-up of an open-label study. *Mov Disord.* 2007;22(16):2346-51.
124. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11.
125. Lu J, Xu Y, Quan Z, Chen Z, Sun Z, Qing H. Dysregulated microRNAs in neural system: Implication in pathogenesis and biomarker development in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2017;365:70-82.
126. Horst CH, Titze-de-Almeida R, Titze-de-Almeida SS. The involvement of Eag1 potassium channels and miR-34a in rotenone-induced death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol Med Rep.* 2017;15(4):1479-88.
127. Rostamian Delavar M, Baghi M, Safaeinejad Z, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Differential expression of miR-34a, miR-141, and miR-9 in

- MPP+-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *Gene*. 2018;662:54-65.
128. Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca BV, Gotovac K, Violante S, et al. Convergence of miRNA expression profiling, α -synuclein interacton and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(10):e25443.
129. Caputo V, Sinibaldi L, Fiorentino A, Parisi C, Catalanotto C, Pasini A, et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. *PLoS One*. 2011;6(12):e28656.
130. Khalil H, Alomari MA, Khabour OF, Al-Hieshan A, Bajwa JA. Relationship of circulatory BDNF with cognitive deficits in people with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2016;362:217-20.
131. Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;29:66-71.
132. Lungu G, Stoica G, Ambrus A. MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neurosci Lett*. 2013;553:153-8.
133. Cho KJ, Song J, Oh Y, Lee JE. MicroRNA-Let-7a regulates the function of microglia in inflammation. *Mol Cell Neurosci*. 2015;68:167-76.
134. Guedes J, Cardoso AL, Pedroso de Lima MC. Involvement of microRNA in microglia-mediated immune response. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:186872.
135. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater*. 2013;12(11):967-77.
136. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*. 2007;8(3):173-84.
137. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(2):129-38.
138. Puras G, Mashal M, Zárata J, Agirre M, Ojeda E, Grijalvo S, et al. A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *J Control Release*. 2014;174:27-36.
139. Bariotto-Dos-Santos K, Padovan-Neto FE, Bortolanza M, Dos-Santos-Pereira M, Raisman-Vozari R, Tumas V, et al. Repurposing an established drug: an emerging role for methylene blue in L-DOPA-induced dyskinesia. *Eur J Neurosci*. 2019;49(6):869-82.

140. Nolte A, Ott K, Rohayem J, Walker T, Schlensak C, Wendel HP. Modification of small interfering RNAs to prevent off-target effects by the sense strand. *N Biotechnol.* 2013;30(2):159-65.
141. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med.* 2004;25(4):365-451.
142. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):177-96.
143. Chaudhuri AD, Choi DC, Kabaria S, Tran A, Junn E. MicroRNA-7 Regulates the Function of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Targeting VDAC1 Expression. *J Biol Chem.* 2016;291(12):6483-93.
144. Chaudhuri AD, Kabaria S, Choi DC, Mouradian MM, Junn E. MicroRNA-7 Promotes Glycolysis to Protect against 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced Cell Death. *J Biol Chem.* 2015;290(19):12425-34.
145. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005;11 Suppl 1:S3-7.
146. Hu Q, Wang G. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2016;5:14.
147. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 2014;16(2):217-30.
148. Titze-de-Almeida SS, Lustosa CF, Horst CH, Bel ED, Titze-de-Almeida R. Interferon Gamma potentiates the injury caused by MPP(+) on SH-SY5Y cells, which is attenuated by the nitric oxide synthases inhibition. *Neurochem Res.* 2014;39(12):2452-64.
149. Perry VH. Innate inflammation in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9):a009373.
150. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, et al. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:488.
151. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011;12(8):695-708.

152. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995;9(22):2723-35.
153. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(5):392-401.
154. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.

APÊNDICE A - THE INVOLVEMENT OF EAG1 POTASSIUM CHANNELS AND MIR-34A IN ROTENONE-INDUCED DEATH SH-SY5Y CELLS

MOLECULAR MEDICINE REPORTS

The involvement of Eag1 potassium channels and miR-34a in rotenone-induced death of dopaminergic SH-SY5Y cells

CAMILA HILLESHEIM HORST, RICARDO TITZE-DE-ALMEIDA and SIMONEIDE SOUZA TITZE-DE-ALMEIDA

Technology for Gene Therapy Laboratory, Central Institute of Sciences,
Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil

Received December 28, 2015; Accepted November 25, 2016

DOI: 10.3892/mmr.2017.6191

Abstract. The loss of dopaminergic neurons and the resultant motor impairment are hallmarks of Parkinson's disease. The SH-SY5Y cell line is a model of dopaminergic neurons, and allows for the study of dopaminergic neuronal injury. Previous studies have revealed changes in Ether à go-go 1 (Eag1) potassium channel expression during p53-induced SH-SY5Y apoptosis, and the regulatory involvement of microRNA-34a (miR-34a) was demonstrated. In the present study, the involvement of Eag1 and miR-34a in rotenone-induced SH-SY5Y cell injury was investigated. Rotenone is a neurotoxin, which is often used to generate models of Parkinson's disease, since it causes the death of nigrostriatal neurons by inducing intracellular aggregation of alpha synuclein and ubiquitin. In the present study, rotenone resulted in a dose-dependent decrease in cell viability, as revealed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and trypan blue cell counting assays. In addition, Eag1 was demonstrated to be constitutively expressed by SH-SY5Y cells, and involved in cell viability. Suppression of Eag1 with astemizole resulted in a dose-dependent decrease in cell viability, as revealed by MTT assay. Astemizole also enhanced the severity of rotenone-induced injury in SH-SY5Y cells. RNA interference against Eag1, using synthetic small interfering RNAs (siRNAs), corroborated this finding, as siRNAs potentiated rotenone-induced injury. Eag1-targeted siRNAs (kv10.1-3 or EAG1hum_287) resulted in a statistically significant 16.4-23.5% increase in vulnerability to rotenone. An increased number of apoptotic nuclei were observed in cells transfected with EAG1hum_287. Notably, this siRNA intensified rotenone-induced apoptosis, as revealed by an increase

in caspase 3/7 activity. Conversely, a miR-34a inhibitor was demonstrated to exert neuroprotective effects. The viability of cells exposed to rotenone for 24 or 48 h and treated with miR-34a inhibitor was restored by 8.4-8.8%. In conclusion, Eag1 potassium channels and miR-34a are involved in the response to rotenone-induced injury in SH-SY5Y cells. The neuroprotective effect of miR-34a inhibitors merits further investigations in animal models of Parkinson's disease.

Introduction

Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disorder (1). The etiology of Parkinson's disease is complex, and comprises genetic and environmental factors. Agricultural pesticides are well-established causes of parkinsonism (2). Among them is the toxin rotenone; a lipophilic molecule that easily crosses the blood-brain barrier. Rotenone mimics several features observed in Parkinson's disease, including dopaminergic neuronal death, oxidative stress, behavioral changes and inflammation (3,4). In addition, rotenone results in an intracellular aggregation of synuclein and ubiquitin that resembles Lewy bodies, a classic hallmark of Parkinson's disease (5,6). The rotenone model has previously been used in *in vitro* and *in vivo* studies to investigate the neurobiology of Parkinson's disease (3).

The loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, followed by a decrease in striatal dopamine content, is a neurochemical change observed in patients with Parkinson's disease (7). In the present study, the SH-SY5Y neuronal cell line was used as an *in vitro* model of dopaminergic neurons. It mimics several features of dopaminergic neuronal death in a well-controlled environment of cultured cells, remaining a valuable cell line for studies relating to neurotoxicity (8). A previous study using SH-SY5Y cells revealed that Ether à go-go 1 (Eag1) potassium channels are the final effectors of a signaling cascade triggered by p53. Activation of p53, which results in cell cycle arrest or apoptosis, reduced the expression of Eag1 channel (9). Previous studies using the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model of Parkinson's disease revealed that 6-OHDA results in the p53-dependent death of dopaminergic cells, which was correlated with a decrease in Eag1 immunoreactivity (10,11).

Eag1 channels are associated with the physiology of excitable cells, and are involved in cell cycle progression and growth (12-14). However, the lack of specific Eag1 channel

Correspondence to: Dr Simoneide Souza Titze-de-Almeida, Technology for Gene Therapy Laboratory, Central Institute of Sciences, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasília, 128 Darcy Ribeiro Academic Campus, Brasília 70910-900, Brazil
E-mail: simoneide.silva@gmail.com

Key words: Eag1, neurodegenerative diseases, rotenone, RNA interference

APÊNDICE B - SIGNATURE OF ABERRANTLY EXPRESSED MICRORNAs IN THE STRIATUM OF ROTENONE-INDUCED PARKINSONIAN RATS

Neurochemical Research
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2638-0>

ORIGINAL PAPER



Signature of Aberrantly Expressed microRNAs in the Striatum of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats

Camila Hillesheim Horst¹ · Franciele Schlemmer¹ · Natália de Aguiar Montenegro¹ · Ana Carolina Martins Domingues¹ · Gabriel Ginani Ferreira¹ · Cinthia Yara da Silva Ribeiro¹ · Rafael Rocha de Andrade² · Elaine Del Bel Guimarães³ · Simoneide Souza Titze-de-Almeida¹ · Ricardo Titze-de-Almeida¹

Received: 22 May 2018 / Revised: 25 August 2018 / Accepted: 11 September 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a highly complex brain disorder regarding clinical presentation, pathogenesis, and therapeutics. The cardinal motor signs, i.e., rigidity, bradykinesia, and unilateral tremors, arise in consequence of a progressive neuron death during the prodromal phase. Although multiple transmission systems are involved in disease neurobiology, patients will cross the line between the prodromal and early stage of diagnosed PD when they had lost half of the dopaminergic nigrostriatal cells. As the neurons continue to die ascending the neuroaxis, patients will face a more disabling disease with motor and nonmotor signs. Shedding light on molecular mechanisms of neuron death is an urgent need for understanding PD pathogenesis and projecting therapeutics. This work examined the expression of microRNAs in the striatum of parkinsonian rats chronically exposed to rotenone (2.5 mg/Kg, i.p., daily for 10 days). Rotenone caused motor deficits, the loss of TH(+) cells in the nigrostriatal pathway, and a marked microgliosis. This parkinsonian rat striatum was examined at 26 days after the last rotenone injection, for quantification of microRNAs, miR-7, miR-34a, miR-26a, miR-132, miR-382, and Let7a, by qPCR. Parkinsonian rats presented a significant increase in miR-26a and miR-34a (1.5 and 2.2 fold, respectively, $P < 0.05$), while miR-7 (0.5 fold, $P < 0.05$) and Let7a were downregulated. This work reports for first time microRNAs aberrantly expressed in the striatum of rotenone-induced parkinsonian rats, suggesting that this dysregulation may contribute to PD pathogenesis. Beyond revealing new clues of neurodegeneration, our findings might prime further studies targeting miRNAs for neuroprotection or even for diagnosis proposal.

Keywords Parkinson's disease · Rotenone · Neurodegeneration · Striatum · miRNA

Introduction

Two hundred years back, James Parkinson published the seminal treatise "*An Essay on the Shaking Palsy*" presenting the first clinically based description of a neurological disease that was named after him [1]. Although the knowledge regarding Parkinson's disease (PD) have evolved drastically in the last decades, the scientific community will spend much effort in drawing a detailed picture of such prevalent neuropathology [2]. Up to 3% of the people around age 65 will develop Parkinson, the second-most common neurodegenerative disease [3]. Indeed, PD assumes the first place among the hypokinetic movement disorders [4].

Patients with PD will face a yet incurable disease [5]. Levodopa is the widely used treatment that effectively improves motor signs; drug effects, however, diminish after

✉ Ricardo Titze-de-Almeida
ricardotitze.unb@gmail.com

¹ Technology for Gene Therapy Laboratory, Central Institute of Sciences, FAV, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal 70910-900, Brazil

² Experimental Surgery Laboratory, Medicine School, University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil


³ Department of Morphology Physiology and Basic Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, USP-Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo (USP), São Paulo 14040-904, Brazil

APÊNDICE C - DELIVERY OF MIRNA-TARGETED OLIGONUCLEOTIDES IN THE RAT STRIATUM BY MAGNETOFECTION WITH NEUROMAG



Article

Delivery of miRNA-Targeted Oligonucleotides in the Rat Striatum by Magnetofection with Neuromag[®]

Simoneide Souza Titze de Almeida ^{1,†}, Camila Hillesheim Horst ^{1,†} ,
Cristina Soto-Sánchez ^{2,3,4}, Eduardo Fernandez ^{2,3} and Ricardo Titze de Almeida ^{1,*}

¹ Technology for Gene Therapy Laboratory, Central Institute of Sciences, FAV, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; simoneide.silva@gmail.com (S.S.T.d.A.); horstcamila@gmail.com (C.H.H.)

² Neuroprosthetics and Visual Rehabilitation Research Unit, Bioengineering Institute, Miguel Hernández University, 03202 Alicante, Spain; csoto@goumh.umh.es (C.S.-S.); e.fernandez@umh.es (E.F.)

³ Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine—CIBER-BBN, 28029 Madrid, Spain

⁴ Biotechnology Department, University of Alicante, 03080 Alicante, Spain

* Correspondence: ricardotitze.unb@gmail.com; Tel.: +55-61-31077222

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: T.J. Thomas

Received: 19 June 2018; Accepted: 21 July 2018; Published: 23 July 2018



Abstract: MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression at posttranscriptional level by triggering RNA interference. In such a sense, aberrant expressions of miRNAs play critical roles in the pathogenesis of many disorders, including Parkinson's disease (PD). Controlling the level of specific miRNAs in the brain is thus a promising therapeutic strategy for neuroprotection. A fundamental need for miRNA regulation (either replacing or inhibition) is a carrier capable of delivering oligonucleotides into brain cells. This study aimed to examine a polymeric magnetic particle, Neuromag[®], for delivery of synthetic miRNA inhibitors in the rat central nervous system. We injected the miRNA inhibitor complexed with Neuromag[®] into the lateral ventricles next to the striatum, by stereotaxic surgery. Neuromag[®] efficiently delivered oligonucleotides in the striatum and septum areas, as shown by microscopy imaging of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled oligos in astrocytes and neurons. Transfected oligos showed efficacy concerning miRNA inhibition. Neuromag[®]-structured miR-134 anti-miR (0.36 nmol) caused a significant 0.35 fold decrease of striatal miR-134, as revealed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In conclusion, the polymeric magnetic particle Neuromag[®] efficiently delivered functional miRNA inhibitors in brain regions surrounding lateral ventricles, particularly the striatum. This delivery system holds potential as a promising miRNA-based disease-modifying drug and merits further pre-clinical studies using animal models of PD.

Keywords: miRNA; nanoparticles; Neuromag[®]; delivery

1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous short noncoding RNAs that cause post-transcriptional gene silencing in healthy cells. Knocking down first requires the binding of miRNA guide strands, complexed with silencing proteins, to complementary sequences in 3'-untranslated region (3'-UTR) of the target mRNAs. This silencing complex will ultimately cause translational repression or mRNA degradation [1]. RNAi is thus a crucial mechanism of gene regulation. Conversely, aberrant expressions of miRNAs play critical roles in the neuropathology of brain diseases [2]. Therefore, exogenous synthetic oligonucleotides have been used to modulate the content of specific

ANEXO A - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA UNB DOC Nº 2267/2015



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de abril de 2015.



DECLARAÇÃO


Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL DE PARKINSON – PARTICIPAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NA NEURODEGENERAÇÃO POR ROTENONA DE ÁREAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS.", UnBDaC n.º 22267/2015, sob responsabilidade do Professor Ricardo Títze de Almeida foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Ratos Wistar: 20*. A presente aprovação é válida pelo período de 6/04/2015 a 6/04/2019.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
 Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.




ANEXO B - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA UNB DOC Nº 45524/2016



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

DECLARAÇÃO

Brasília, 19 de maio de 2016.

Declaramos que o projeto intitulado “**TERAPIA GÊNICA DO PARKINSON EXPERIMENTAL VIA INIBIDORES DE MIR-34A E MIR-134 NANOESTRUTURADOS EM MAGNETOLIPOSSOMAS.**”, UnBDoC n.º 45524/2016, sob responsabilidade do Professor Ricardo Titze de Almeida foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 52. A presente aprovação é válida pelo período de 01/06/2016 a 01/06/2020.

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.