

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

INGRID MATSUBARA SCHEIBEL

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS
DA LINHAGEM SH-SY5Y**

PORTO ALEGRE

2022

INGRID MATSUBARA SCHEIBEL

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS
DA LINHAGEM SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientadora: Ma. Carolina Saibro Girardi

PORTO ALEGRE

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Scheibel, Ingrid Matsubara
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO SORO DE PACIENTES COM
DOENÇA DE PARKINSON NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO
MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DA LINHAGEM SH-SY5Y / Ingrid
Matsubara Scheibel. -- 2022.

35 f.

Orientador: Daniel Pens Gelain.

Coorientadora: Carolina Saibro Girardi.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Doença de Parkinson. 2. SH-SY5Y. 3. Mitocôndria.
4. Diferenciação neuronal. I. Gelain, Daniel Pens,
orient. II. Girardi, Carolina Saibro, coorient. III.
Título.

INGRID MATSUBARA SCHEIBEL

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE
PARKINSON NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS
DA LINHAGEM SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientadora: Ma. Carolina Saibro Girardi

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Klamt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Daniel Gelain, pela oportunidade de aprendizado e de realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Carolina Girardi, pela dedicação, paciência e apoio não só durante o desenvolvimento deste trabalho como em tantos outros momentos.

Aos colegas do laboratório 32, pelo acolhimento e pelos ensinamentos ao longo da minha iniciação científica.

Aos colegas de curso, pela parceria e por tornarem a minha experiência na graduação ainda mais especial.

Às minhas amigas, Ana, Bárbara e Beatriz, pela amizade e por comemorarem todas as pequenas vitórias comigo.

Aos meus pais, pelo suporte e incentivo durante toda a minha graduação, e por estarem presentes em todos os momentos.

RESUMO

Alterações na composição do soro já foram observadas em amostras de pacientes com Doença de Parkinson. No entanto, o papel que elas exercem na progressão da doença ainda é pouco conhecido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos causados pela exposição ao soro de pacientes com DP em células da linhagem SH-SY5Y diferenciadas. Foram avaliados os parâmetros de diferenciação neuronal e de função mitocondrial, que são afetados na patologia da DP. A análise por MitoTracker indicou uma redução da quantidade de mitocôndrias funcionais nas células que foram expostas ao soro de pacientes com DP, mas a marcação por MitoSox mostrou que esse efeito não causou uma alteração dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a avaliação dos níveis de marcadores neuronais por imunofluorescência sugeriu que o tratamento com os soros de pacientes com DP não prejudicou o desenvolvimento do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y. Em conjunto, os resultados mostraram que as alterações presentes no soro de pacientes com DP podem contribuir para a patologia observada no cérebro, exercendo efeitos principalmente sobre a função mitocondrial.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, SH-SY5Y, Mitocôndria, Diferenciação neuronal.

ABSTRACT

Changes in serum composition have already been observed in samples from patients with Parkinson's disease. However, their role in disease progression is still poorly understood. Therefore, the aim of this work was to investigate the effects caused by exposure to the serum of patients with PD on differentiated SH-SY5Y cells. The parameters of neuronal differentiation and mitochondrial function, which are affected in the pathology of PD, were evaluated. MitoTracker analysis indicated a reduction in the amount of functional mitochondria in cells that were exposed to the serum from PD patients, but MitoSox labeling showed that this effect did not cause a change in reactive oxygen species levels. Furthermore, the evaluation of neuronal marker levels by immunofluorescence suggested that treatment with the serum from patients with PD did not impair the development of the neuronal phenotype of SH-SY5Y cells. Taken together, the results showed that the alterations present in the serum of patients with PD may contribute to the pathology observed in the brain, exerting effects specially on mitochondrial function.

Keywords: Parkinson's disease, SH-SY5Y, Mitochondria, Neuronal differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Protocolo de diferenciação neuronal e tratamentos.....	20
Figura 2	Avaliação do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y.....	22
Figura 3	Conteúdo mitocondrial de células SH-SY5Y expostas às amostras de soro.....	23
Figura 4	Níveis de superóxido mitocondrial de células SH-SY5Y expostas às amostras de soro.....	24
Figura 5	Níveis de proteínas anti-apoptóticas e viabilidade das células SH-SY5Y expostas às amostras de soro.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

α -sin	α -sinucleína
AR	Ácido retinóico
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DP	Doença de Parkinson
GBA	<i>Glucosylceramidase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NFL	Neurofilamento
Nurr1	<i>Nuclear receptor related 1</i>
NSC	<i>Neural stem cell</i>
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PITX3	<i>Paired Like Homeodomain 3</i>
PRKN	<i>Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
TH	Tirosina hidroxilase
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TOM20	<i>Translocase of outer membrane 20</i>

TOM40	<i>Translocase of outer membrane 40</i>
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion channel 1</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Doença de Parkinson.....	11
1.2.	Neurogênese e Diferenciação neuronal.....	12
1.3.	Disfunção Mitocondrial.....	13
1.4.	Alterações no Soro de Pacientes com Doença de Parkinson.....	14
1.5.	Linhagem Celular SH-SY5Y.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	Objetivo Geral.....	17
2.2.	Objetivos Específicos.....	17
3.	JUSTIFICATIVA.....	18
4.	METODOLOGIA.....	19
4.1.	Amostras.....	19
4.2.	Cultura Celular.....	19
4.3.	Diferenciação Neuronal e Tratamento.....	19
4.4.	Imunofluorescência.....	19
4.5.	MitoTracker e MitoSOX.....	20
4.6.	Análise estatística.....	20
5.	RESULTADOS.....	22
5.1.	Efeito dos soros de pacientes com DP no estabelecimento do fenótipo neuronal de células SH-SY5Y.....	22
5.2.	Efeito dos soros de pacientes com Doença de Parkinson na função mitocondrial de células SH-SY5Y.....	23
6.	DISCUSSÃO.....	25
7.	REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa que mais afeta pessoas globalmente. Em 2016, segundo o estudo da *Global Burden of Disease* havia 6,1 milhões de indivíduos diagnosticados com a doença no mundo, sendo 128 mil destes observados no Brasil (GBD 2016 NEUROLOGY COLLABORATORS, 2019; GBD 2016 PARKINSON'S DISEASE COLLABORATORS, 2018). Com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população, há uma previsão de que o número de casos possa dobrar até 2030, já que a idade avançada é um dos principais fatores de risco conhecidos para a DP (DORSEY et al., 2007). Esse cenário terá impactos tanto sociais como econômicos e demonstra a importância do desenvolvimento de estudos na área.

Os principais sintomas associados à DP e frequentemente utilizados para o seu diagnóstico são bradicinesia, caracterizada pela dificuldade de iniciar movimentos voluntários, rigidez muscular, tremor e perda do equilíbrio (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). No entanto, também são conhecidos diversos sintomas não-motores, que podem se manifestar nos pacientes até 10 anos antes dos motores. Alguns exemplos são apatia, distúrbios de sono, constipação, fadiga e perda de olfato e de paladar (JANKOVIC, 2008; PONT-SUNYER et al., 2015).

As causas que levam ao desenvolvimento da DP ainda não são totalmente compreendidas. Mutações em determinados genes como SNCA, LRRK2, PINK1, PRKN e GBA já foram descritas como responsáveis pela forma hereditária da DP, a qual é caracterizada pela idade de início precoce e pela progressão mais rápida dos sinais motores. No entanto, apenas 10% dos casos podem ser associados a esta classe. A grande maioria dos indivíduos com DP desenvolve a doença devido a uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; POLITO; GRECO; SERIPA, 2016). A exposição a pesticidas como rotenona e paraquat é um dos fatores de risco ambientais mais demonstrados por estudos epidemiológicos. Além desses, outros fatores ambientais e de estilo de vida, como o consumo de café e o hábito de fumar, já foram associados a um risco reduzido de desenvolvimento da doença. Porém, as explicações para este efeito permanecem controversas (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; POLITO; GRECO; SERIPA, 2016).

Em relação à neuropatologia, a DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra no mesencéfalo e pela presença dos corpos de Lewy, formados pelo acúmulo da proteína α -sin (POEWE et al., 2017). Apesar de essas serem as

principais características associadas à DP, atualmente se sabe que a doença é resultado de um conjunto de processos subjacentes que por fim levam à neurodegeneração e aos sintomas observados. Alterações na função mitocondrial e lisossomal, aumento da neuroinflamação e do estresse oxidativo e disfunção autofágica são alguns dos fatores que também influenciam na patogênese da DP e estão sendo cada vez mais investigados (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; HAUSER; HASTINGS, 2013; TUFEKCI et al., 2012).

A complexidade dos mecanismos celulares e a heterogeneidade da manifestação da doença em diferentes pacientes constituem uma barreira para o desenvolvimento de terapias eficazes contra a DP. Assim, apesar de haver grandes esforços, ainda não há nenhum tratamento disponível que seja capaz de curar a doença. Além disso, outro fator que dificulta o tratamento da DP está associado ao seu diagnóstico. A falta de critérios clínicos padrões somada à manifestação tardia dos sintomas motores resulta em taxas elevadas de erros e de diagnósticos tardios, que reduzem as possibilidades de controle da doença (TOLOSA; WENNING; POEWE, 2006; TOLOSA et al., 2021). Para melhorar esse cenário, pesquisas que buscam elucidar os mecanismos de progressão da doença se fazem necessárias, pois tornarão possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de retardá-la. Ademais, a procura por biomarcadores no sangue e no líquido cefalorraquidiano é uma alternativa promissora para o diagnóstico precoce, que se reflete em uma melhor possibilidade de intervenção (CHEN-PLOTKIN, 2014; SALAT et al., 2016).

1.2. Neurogênese e Diferenciação Neuronal

NSCs são células precursoras multipotentes que têm a capacidade de se diferenciar em linhagens gliais e neuronais em um processo chamado neurogênese adulta (ALVAREZ-BUYLLA; GARCÍA-VERDUGO; TRAMONTIN, 2001). No cérebro humano, esse processo ocorre nas zonas subventricular e subgranular do giro denteado, e pode ser ativado por diversas lesões cerebrais com o objetivo de gerar novos neurônios para reparar os danos. Estudos em modelos e pacientes com DP demonstraram alterações na proliferação, diferenciação e sobrevivência das NSCs, sugerindo que danos ao processo de neurogênese estão relacionados com a sua patogênese (REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014).

Um dos principais fatores de risco conhecidos para a DP é o envelhecimento e estudos mostram uma redução da proliferação das NSCs durante esse período, comprometendo a formação de novos neurônios (APPLE; SOLANO-FONSECA; KOKOVAY, 2017). Além disso, alguns dos sintomas não motores observados em pacientes com DP, como perda de olfato, depressão e ansiedade, também já foram descritos como consequência de uma

neurogênese desregulada (LE GRAND et al., 2015). Assim, danos à neurogênese podem estar envolvidos tanto no início como na progressão da doença.

Alguns genes associados à DP também desempenham papéis importantes para o desenvolvimento neuronal e para a neurogênese, como SNCA, NURR1, PITX3, PINK1 e LRRK2 (LE GRAND et al., 2015). Em especial, mutações ou duplicações que levam ao acúmulo da proteína α -sin comprometem o crescimento de neuritos, prejudicando de forma direta a diferenciação das NSCs (DESPLATS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Além desses fatores, a neuroinflamação, a depleção de dopamina e a disfunção mitocondrial, que são observados em pacientes com DP, também apresentam efeitos negativos sobre a neurogênese e podem estar envolvidos no seu comprometimento (HÖGLINGER et al., 2004).

1.3. Disfunção Mitocondrial

Apesar da DP familiar representar apenas uma pequena proporção dos casos, o estudo das mutações que levam ao seu desenvolvimento proporcionou um grande avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença. Mutações nos genes PINK1, PRKN e LRRK2 são conhecidas por causarem a DP familiar e as proteínas codificadas por eles desempenham funções associadas à função e à homeostase mitocondrial (RYAN et al., 2015). Assim, corroboram com a hipótese de que a disfunção mitocondrial tem um papel importante no processo de neurodegeneração. PINK1 e Parkin são proteínas essenciais para o controle de qualidade mitocondrial. Elas estão envolvidas na indução da mitofagia, que leva à degradação de mitocôndrias com danos. O mal funcionamento desse processo resulta em um acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, que liberam ROS em excesso (TREMPE; FON, 2013). A kinase LRRK2 apresenta diversas funções celulares e estudos já demonstraram que um aumento da sua atividade causa um aumento da fissão e uma redução da fusão mitocondrial. Essa alteração na dinâmica mitocondrial também interfere no seu funcionamento (WANG et al., 2012).

Além dos genes associados à DP hereditária, a investigação da relação entre determinadas toxinas inibidoras da atividade mitocondrial com o desenvolvimento da forma esporádica da doença também reforça o papel da disfunção mitocondrial na sua patogênese. Estudos epidemiológicos e em modelos animais demonstraram que a exposição a rotenona, MPTP e paraquat leva a um fenótipo consistente com o da DP (BETARBET et al., 2000). Estes compostos afetam a função mitocondrial através de danos à cadeia transportadora de elétrons e sugerem que as mitocôndrias têm um papel importante não só no desenvolvimento como no início da DP (GOLDMAN, 2014).

Estudos também já relacionaram a agregação da proteína α -sin, uma das principais marcas da DP, com a disfunção mitocondrial. Níveis baixos de α -sin são normalmente encontrados na mitocôndria. No entanto, o acúmulo da proteína dentro da organela pode prejudicar a função do complexo I, desencadeando um aumento do estresse oxidativo (LUTH et al., 2014). A interação entre α -sin e proteínas presentes na membrana externa mitocondrial, como VDAC1, TOM20 e TOM40, também já foi demonstrada. Ela prejudica a importação de proteínas para a mitocôndria e como consequência, leva a um aumento da produção de ROS e à perda do potencial da membrana mitocondrial (DI MAIO et al., 2016; ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018). Além disso, há evidências que sugerem uma interação bidirecional, segundo a qual a disfunção mitocondrial pode causar o acúmulo da α -sin, constituindo assim um ciclo de danos às células (ZALTIERI et al., 2015).

Todas essas evidências indicam que a disfunção mitocondrial é um processo patológico significativo para a morte neuronal e a degeneração observadas na DP. Os danos à cadeia respiratória e ao potencial de membrana somados às falhas nos processos de controle de qualidade mitocondrial e de dinâmica mitocondrial contribuem para o acúmulo de mitocôndrias com danos e para a produção excessiva de ROS. Como consequência, esses fenômenos resultam em um aumento do estresse celular, podendo levar à apoptose (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013).

1.4. Alterações no Soro de Pacientes com Doença de Parkinson

Além de distúrbios relacionados ao sistema nervoso, também são observadas alterações sistêmicas na DP. Análises de amostras de soro de pacientes com DP mostram diferenças significativas nos níveis de determinadas moléculas em comparação com o soro de indivíduos saudáveis. A investigação e a caracterização dessas alterações são importantes não só para possibilitar novas estratégias de diagnóstico, mas também para auxiliar na compreensão da progressão da doença, uma vez que as moléculas presentes no soro podem ser transportadas e induzir efeitos em diferentes sistemas.

As alterações mais importantes já verificadas correspondem a proteínas envolvidas em processos inflamatórios. Níveis elevados de IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, TNF- α , e IFN- γ foram detectados no soro de pacientes com DP em comparação com os controles, sugerindo que esses marcadores inflamatórios estão relacionados com a patologia da DP (VESELÝ et al., 2018); (BRODACKI et al., 2008; CHATTERJEE et al., 2020). Reforçando essa hipótese, estudos também observaram que alguns microRNAs relacionados à inflamação estão

diferencialmente expressos no soro de pacientes com DP e de controles saudáveis (BATISTELA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020).

Considerando o papel importante da α -sin na patogênese da DP, a sua utilização como biomarcador foi investigada. No entanto, a avaliação dos níveis totais de α -sin no soro mostrou resultados divergentes. Há estudos relatando quantidades maiores, menores e não significativamente diferentes de α -sin total em pacientes com DP em comparação com os controles (CHANG et al., 2019; CHATTERJEE et al., 2020; EMMANOUILIDOU et al., 2020; PARNETTI et al., 2019). Por outro lado, quando se considera apenas os níveis de α -sin oligomérica, os resultados mostram um aumento significativo presente no soro de indivíduos com DP (PARNETTI et al., 2019).

Apesar das evidências apontarem uma modificação na composição de fatores presentes no soro de pacientes com DP, ainda não está claro se ela é apenas uma consequência dos processos neuropatológicos que ocorrem no cérebro ou se é um dos mecanismos que causam a neurodegeneração. Então, neste trabalho foram utilizadas amostras de soro obtidas de pacientes com DP e de indivíduos saudáveis, e seus efeitos sobre células neuronais foram comparados *in vitro*. Visando investigar se as alterações no soro estão envolvidas com processos neuropatológicos da DP, foram avaliados parâmetros relacionados à função mitocondrial e à diferenciação neuronal.

1.5. Linhagem Celular SH-SY5Y

As células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y são amplamente utilizadas em pesquisas na área de neurociências por serem de origem humana, apresentarem características neuronais e pela facilidade de manutenção em laboratório (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). Além disso, é possível induzir a diferenciação neuronal das células SH-SY5Y através do tratamento com determinados compostos, levando ao desenvolvimento de um fenótipo de neurônio maduro. Quando diferenciadas, as células apresentam alterações morfológicas, como a extensão de neuritos, e expressam diversos marcadores neuronais, como TH, NeuN, NFL e Tau (GIRARDI et al., 2019; LOPES et al., 2010).

A capacidade de expressar TH, enzima necessária para a síntese de dopamina, confere às células um fenótipo de neurônio dopaminérgico. Devido a essa característica, a linhagem SH-SY5Y é considerada um modelo adequado para estudos relativos à DP, já que esse tipo de neurônio é o mais afetado pela doença (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017; XIE; HU; LI, 2010). Portanto, para investigar os efeitos que as alterações presentes no soro de pacientes

com DP causam no cérebro humano, foram utilizadas células da linhagem SH-SY5Y diferenciadas a partir de tratamentos com AR e BDNF.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da exposição ao soro de pacientes com Doença de Parkinson e de indivíduos saudáveis sobre processos neuropatológicos em células diferenciadas da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Investigar os efeitos da exposição ao soro de pacientes sobre o estabelecimento do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y por análise de imunofluorescência;
- b. Avaliar as consequências da exposição ao soro de pacientes sobre a função mitocondrial e os níveis de ROS nas células SH-SY5Y.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a perspectiva de aumento do número de casos de DP no mundo e a falta de tratamentos eficazes disponíveis, estudos que buscam elucidar os mecanismos por trás dos sintomas são importantes para reduzir os impactos à saúde e à qualidade de vida da população.

A investigação da contribuição de fatores externos ao SNC, como o soro, para a patologia observada no cérebro, pode expandir os conhecimentos acerca dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento e à progressão da DP. Além disso, a caracterização dos compostos que estão presentes em níveis alterados no soro de pacientes e que são responsáveis pelos efeitos observados fornecerá possíveis alvos terapêuticos ainda pouco explorados. Assim, essa linha de pesquisa poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas focadas em impedir a progressão da doença.

4. METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – 170212, com certificado de apresentação para apreciação ética 67574217.8.0000.5327. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1. Amostras

Para este estudo foram utilizadas amostras de soro de 15 pacientes com DP e de 15 indivíduos saudáveis, coletadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para os experimentos, as amostras foram combinadas em 10 *pools*, sendo 5 controles e 5 de pacientes com DP, cada um contendo 3 amostras.

4.2. Cultura Celular

Células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y provenientes da Coleção Europeia de Cultura Celular foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 1% de solução de antibióticos e 10% de SFB, a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para os experimentos foram utilizadas células entre 20 e 25 passagens.

4.3. Diferenciação Neuronal e Tratamento

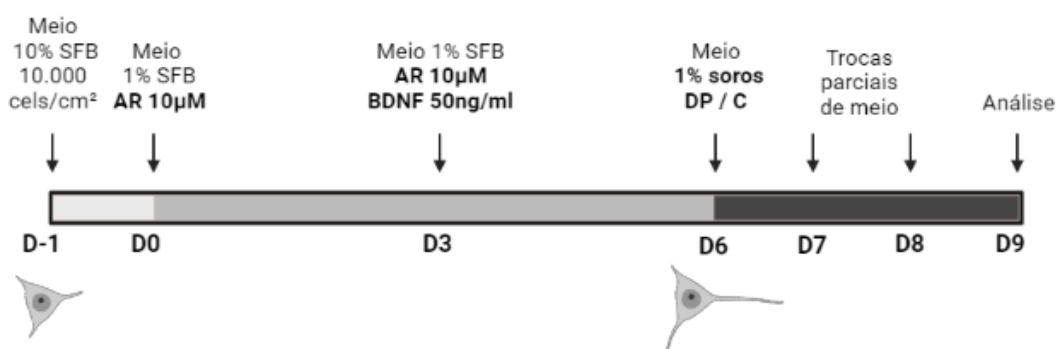
Para induzir a diferenciação neuronal, as células foram plaqueadas a uma confluência de 10 mil células/cm² em meio DMEM/F12 10% SFB e após 24 horas foram tratadas com AR 10 µM em meio DMEM/F12 1% SFB. Após 3 dias, as células foram tratadas com AR 10 µM e BDNF 50 ng/ml em meio DMEM/F12 1% SFB. No sexto dia de diferenciação, as células foram expostas às amostras de soro de pacientes com DP ou de indivíduos controle em meio DMEM/F12 na concentração de 1%. Nos dias sete e oito, foi realizada a troca de metade do volume de meio contendo as amostras de soro e as análises foram realizadas após 24 horas da última troca.

4.4. Imunofluorescência

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e incubadas com uma solução de PBS contendo Triton 0,2% e BSA 1% por 30 minutos para permeabilização e bloqueio. Depois, as células foram incubadas com os anticorpos primários para β3-tubulina (Invitrogen, ref #480011) e neurofilamento (Cell Signaling Technology, ref #2837) durante 15

horas a 4°C, seguida da incubação com os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor 488 e 555 (Life Technologies) por 45 minutos em temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram preparados em PBS com Triton 0,2% e BSA 1%. Por fim, as células foram incubadas com o marcador de DNA DAPI (1:2000 em PBS) por 10 minutos. As imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência (EVOS® FLoid® Cell Imaging Station, Life Technologies) e analisadas utilizando o software ImageJ.

Figura 1 - Protocolo de diferenciação neuronal e tratamentos



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

4.5. MitoTracker e MitoSOX

Para avaliar o conteúdo mitocondrial e os níveis de superóxido mitocondrial, as células SH-SY5Y foram incubadas com os marcadores MitoTracker Red 200 nM (Invitrogen, ref M22425) e MitoSOX Red 5 µM (Invitrogen, ref M36008), respectivamente, por 15 minutos, a 37°C. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e incubadas com DAPI por 10 minutos. As imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência (EVOS® FLoid® Cell Imaging Station, Life Technologies) e analisadas utilizando o software ImageJ.

4.6. Análise estatística

Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 8. As diferenças entre os grupos Parkinson e controle foram avaliadas utilizando o teste T de Student. As diferenças entre as amostras de homens e mulheres foram avaliadas utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Sidak.

5. RESULTADOS

Para avaliar os efeitos causados pelo soro de pacientes com DP nas células SH-SY5Y foram utilizadas amostras de 15 indivíduos diagnosticados com DP e de 15 indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo (Tabela 1), sem comorbidades. As amostras em questão foram selecionadas a partir de um conjunto de cerca de 150 amostras, de um estudo que está analisando as alterações na composição dos soros. Após a realização do protocolo de indução da diferenciação neuronal com AR e BDNF, as células foram tratadas com as amostras de soro combinadas em *pools* durante três dias. Ao final desse período, as células foram submetidas a diferentes ensaios para verificar os possíveis efeitos causados pela exposição.

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo

	Controle (n = 15)	Parkinson (n = 15)
Idade (anos)	54,2 ± 11,8	51,3 ± 6,5
Sexo (F / M)	9 / 6	9 / 6
Tempo de diagnóstico (anos)	-	8,4 ± 3,4
UPDRS	-	88,4 ± 28,2

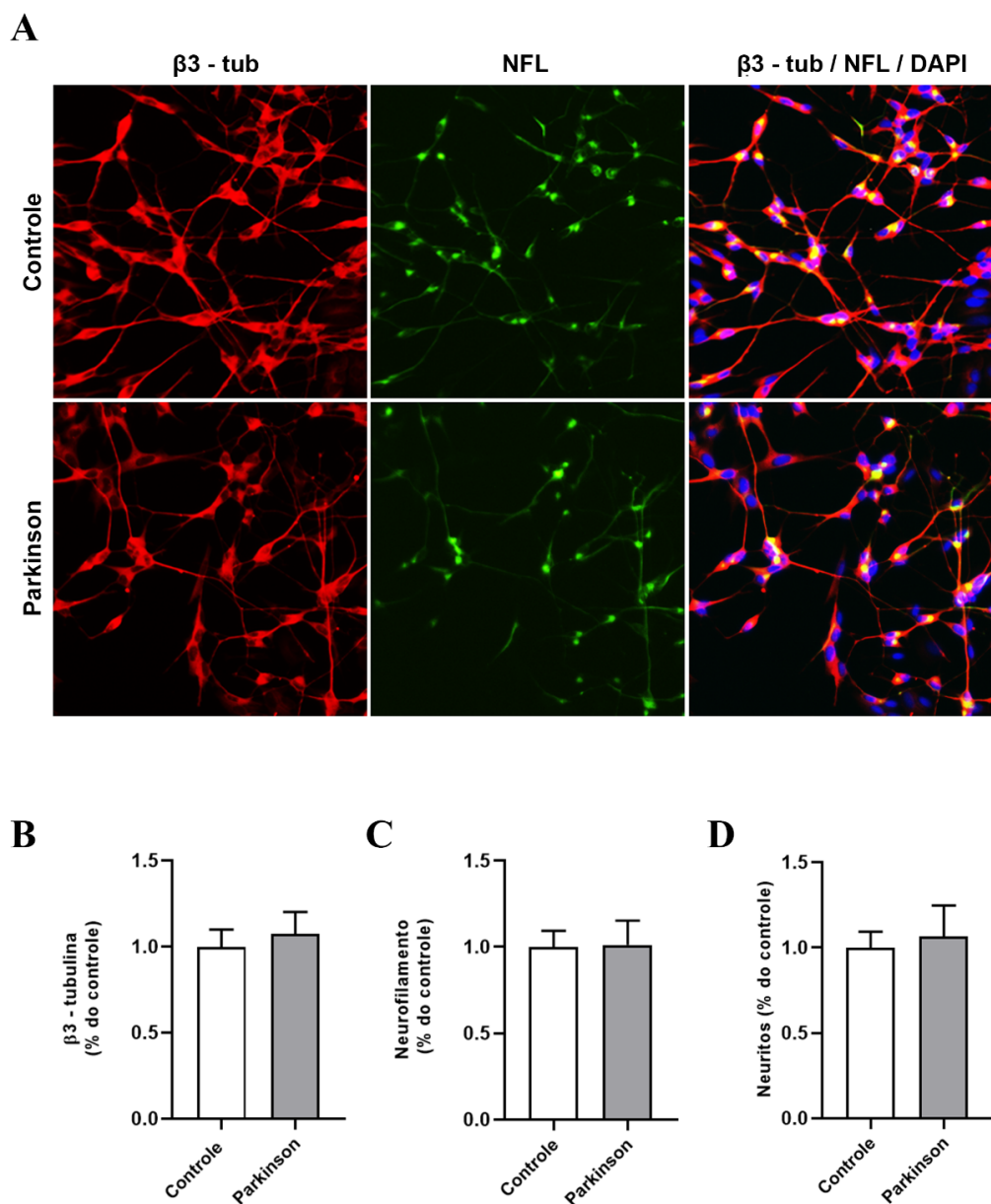
Dados expressos como média ± desvio padrão. UPDRS = *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*.

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

5.1. Efeito dos soros de pacientes com DP no estabelecimento do fenótipo neuronal de células SH-SY5Y

Quando diferenciadas, as células da linhagem SH-SY5Y desenvolvem um perfil caracterizado pelo aumento da expressão de marcadores neuronais e por alterações morfológicas. Portanto, para verificar se o soro de pacientes com DP interfere no estabelecimento desses parâmetros, foram avaliados os níveis das proteínas β 3-tubulina e NFL, características de neurônios diferenciados, e o comprimento dos neuritos, que são projeções do corpo celular dos neurônios. A análise por imunofluorescência não mostrou diferenças nos níveis dos marcadores neuronais e no comprimento dos neuritos entre os grupos (Figura 2), indicando que a exposição ao soro de pacientes com DP não afetou os parâmetros do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y.

Figura 2 - Avaliação do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y



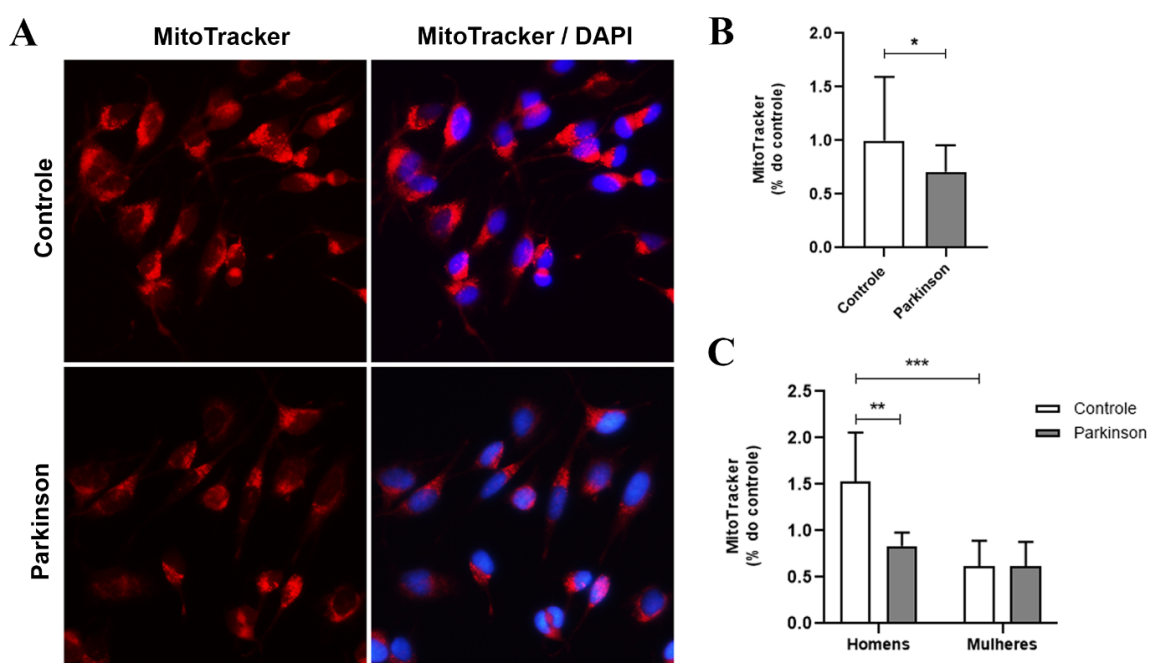
(A) Imagens de microscopia de fluorescência de células SH-SY5Y marcadas com anticorpos para $\beta 3$ -tubulina e neurofilamento. O núcleo celular foi corado com DAPI. A quantificação da intensidade de fluorescência de (B) $\beta 3$ -tubulina e (C) neurofilamento após a diferenciação foi obtida pela razão entre a fluorescência total e a quantidade de núcleos marcados com DAPI, utilizando o software ImageJ. (D) O comprimento de neuritos foi obtido pela razão entre o comprimento total de neuritos e o número de núcleos marcados com DAPI, utilizando o plugin NeuronJ do software ImageJ. Os resultados são apresentados como porcentagem da média do controle.

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

5.2. Efeito dos soros de pacientes com Doença de Parkinson na função mitocondrial de células SH-SY5Y

Para avaliar o efeito dos soros sobre o conteúdo mitocondrial funcional das células foi utilizada a sonda MitoTracker, que se acumula nas mitocôndrias de acordo com o potencial de membrana. As células que foram expostas ao soro de pacientes com DP apresentaram uma pequena redução da intensidade do sinal do MitoTracker em comparação com as células expostas ao soro de indivíduos controle (Figura 3 (A, B)). A análise dos resultados de acordo com o sexo mostrou que esse efeito foi dependente do sexo dos pacientes. As células expostas ao soro de homens saudáveis apresentaram níveis maiores de mitocôndrias funcionais do que as que foram expostas ao soro de mulheres saudáveis; quando expostas ao soro de pacientes com DP, no entanto, esses níveis foram reduzidos. Já quando são consideradas apenas as células expostas ao soro de mulheres, não é observada uma diferença entre o grupo controle e o grupo com DP (Figura 3 (C)). Esse resultado sugere que determinados fatores presentes no soro de pacientes com DP podem prejudicar a função mitocondrial das células neuronais e que esse efeito ocorre de maneira distinta entre homens e mulheres.

Figura 3 - Conteúdo mitocondrial de células SH-SY5Y expostas às amostras de soro



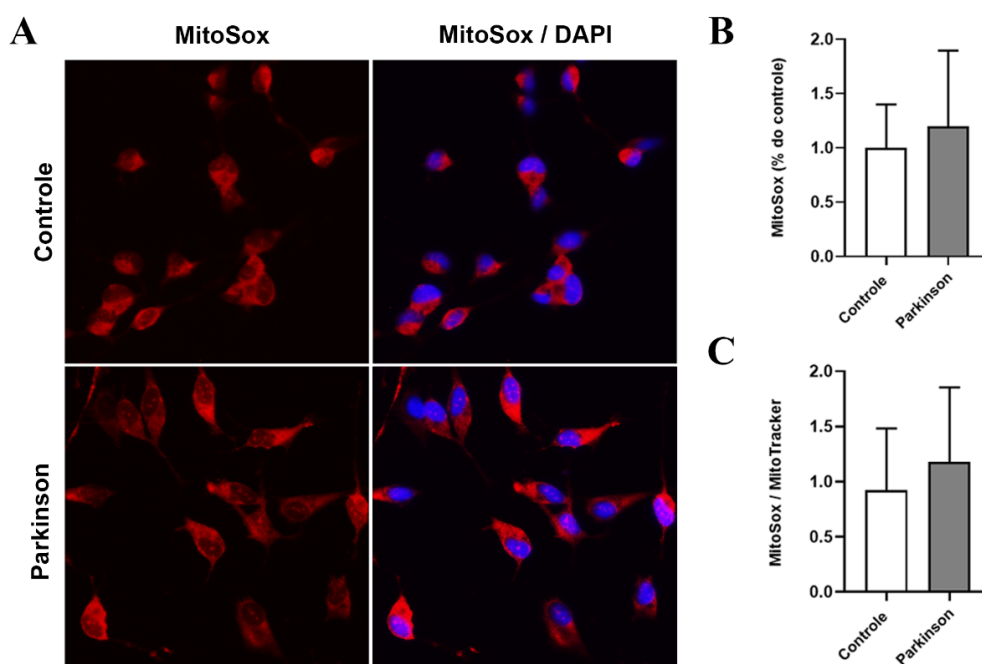
(A) Imagens de microscopia de células SH-SY5Y marcadas com MitoTracker Red após a exposição ao soro de pacientes com DP ou de indivíduos saudáveis. O núcleo celular foi corado com DAPI. (B) A quantificação da intensidade de fluorescência foi obtida pela razão entre a fluorescência do MitoTracker e a quantidade de núcleos marcados com DAPI, utilizando o software ImageJ. (C) Comparação dos níveis de MitoTracker nas células

expostas ao soro de homens e mulheres. Os resultados são apresentados como porcentagem da média do controle. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,005$ e *** indica $p < 0,0001$.

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Como a disfunção mitocondrial está associada com o acúmulo de ROS, foi avaliado se a redução da viabilidade das mitocôndrias induzida pela exposição ao soro de pacientes com DP também produz esse efeito. Para isso, as células foram marcadas com MitoSox, um corante que é direcionado especificamente para as mitocôndrias e exibe fluorescência após reagir com o superóxido. Não foi observada uma diferença significativa entre os níveis de superóxido mitocondrial das células tratadas com soro de pacientes com DP e de indivíduos controle (Figura 4 (A, B)). Além disso, a razão entre MitoSox e MitoTracker, que reflete a produção de ROS por mitocôndria, também não demonstrou alterações entre os dois grupos (Figura 4 (C)). Esses resultados indicam que o soro de pacientes com DP não induziu alterações significativas na produção de ROS nas mitocôndrias das células SH-SY5Y.

Figura 4 - Níveis de superóxido mitocondrial de células SH-SY5Y expostas às amostras de soro



(A) Imagens de microscopia de células SH-SY5Y marcadas com MitoSox Red após a exposição ao soro de pacientes com DP ou de indivíduos saudáveis. O núcleo celular foi corado com DAPI. (B) A quantificação da intensidade de fluorescência foi obtida pela razão entre a fluorescência do MitoSox e a quantidade de núcleos marcados com DAPI, utilizando o software ImageJ. Os resultados são apresentados como porcentagem da média do grupo controle. (C) Razão entre as fluorescências do MitoSox e do MitoTracker.

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

6. DISCUSSÃO

Evidências obtidas de modelos experimentais e de pacientes com DP permitiram a descoberta de diferentes processos neuropatológicos responsáveis pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos e pelo desenvolvimento dos sintomas característicos. Elas apontam para a DP como uma condição complexa e multifatorial, e não apenas restrita ao SNC. Alterações na composição do soro de pacientes com DP já foram encontradas por diferentes estudos, no entanto a contribuição destes fatores periféricos para a patogênese observada no cérebro ainda não é conhecida. Neste trabalho, avaliamos os efeitos causados pela exposição ao soro de pacientes com DP na linhagem celular SH-SY5Y. Mais especificamente, observamos que as alterações na composição do soro de pacientes com DP podem prejudicar a atividade mitocondrial das células, mas parecem não ter efeitos sobre parâmetros do fenótipo neuronal.

A neurogênese adulta é o processo pelo qual novos neurônios são formados a partir de NSCs. Seu funcionamento correto depende de diferentes estímulos que vão regular a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação destas células. Diversos estudos sugerem que componentes da resposta imune podem ser capazes de modular a neurogênese adulta em diferentes níveis (MATHIEU et al., 2010). Em especial, a avaliação do papel de diferentes citocinas na diferenciação das NSCs mostrou que elas podem exercer efeitos opostos. Enquanto IL-1 β , TNF- α e IL-6 causam uma redução, TGF- β e IL-4 promovem um aumento da diferenciação neuronal (DAS; BASU, 2008). Além disso, em experimentos realizados em modelo animal da DP foi observado que o tratamento anti-inflamatório é capaz de induzir um aumento da ativação das NSCs, reforçando um papel prejudicial da inflamação para a neurogênese (WORLITZER et al., 2012). Considerando as alterações nos níveis de marcadores inflamatórios já encontradas no soro de pacientes com DP (BRODACKI et al., 2008; VESELÝ et al., 2018), nossa hipótese era de que a exposição das células a esse soro poderia prejudicar as etapas finais da diferenciação ou ainda, causar uma regressão desse processo. Entretanto, os resultados mostraram que as amostras de soro de pacientes com DP não afetaram o estabelecimento do fenótipo neuronal das células SH-SY5Y, já que elas apresentaram níveis de marcadores e alterações morfológicas similares às do grupo controle.

A disfunção no processo de neurogênese adulta já foi observada tanto em pacientes como em modelos da DP (REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014). De acordo com nossos resultados, as alterações na composição do soro dos pacientes parecem não estar relacionadas com esse comprometimento. No entanto, considerando o modelo celular e as

condições específicas de exposição utilizados, não é possível excluir a possibilidade de associação entre as alterações no soro e danos à neurogênese. Para isso, são necessários mais estudos investigando os efeitos da exposição aos soros em estágios iniciais de diferenciação e também em outros processos importantes para a neurogênese, como a proliferação e a migração das células. Além disso, outros mecanismos e alterações no próprio cérebro também podem ser responsáveis pela disfunção no processo de neurogênese na DP. Mutações no gene da α -sin, assim como o acúmulo da proteína podem levar a uma redução da neurogênese adulta, como evidenciado em experimentos utilizando camundongos transgênicos (MAY et al., 2012; WINNER et al., 2004). Ademais, o estudo dos genes relacionados à DP sugere que determinadas mutações podem impactar a proliferação, manutenção e diferenciação das células tronco e progenitoras (LE GRAND et al., 2015).

Ao investigar os efeitos da exposição ao soro de pacientes com DP sobre a função mitocondrial das células SH-SY5Y, nós verificamos uma redução da quantidade de mitocôndrias marcadas com MitoTracker. Esse marcador é sensível ao potencial transmembrana e reflete o funcionamento correto dos processos de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, essenciais para a função mitocondrial. Portanto, esse resultado indica que componentes presentes no soro de pacientes com DP podem causar danos à atividade mitocondrial que afetam o potencial de membrana. Além disso, quando avaliamos os resultados das amostras de homens e mulheres separadamente, observamos efeitos distintos. No grupo controle, as células expostas ao soro de homens apresentaram níveis significativamente maiores de mitocôndrias funcionais do que as expostas ao soro de mulheres. Já no grupo com DP, as células expostas ao soro de homens e mulheres apresentaram níveis similares. Esses resultados demonstram diferentes efeitos de acordo com o sexo e sugerem a presença de alterações na composição do soro de homens e mulheres. Estudos epidemiológicos indicam que o sexo é um fator que influencia no desenvolvimento e na expressão fenotípica da DP. Assim, a evidência do efeito diferencial sobre a função mitocondrial também pode estar relacionada com este fato (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019). No entanto, devido a grande variabilidade entre as amostras, será necessário investigar essa associação com um número maior de participantes.

A redução da viabilidade mitocondrial, evidenciada pela marcação do MitoTracker, também já foi verificada em células de origem murina da linhagem PC12 expostas à paraquat e em neurônios de camundongos com uma mutação no gene GBA, ambos utilizados como modelos da DP (LI et al., 2019; ZHOU et al., 2017). Esses resultados reforçam o papel da disfunção mitocondrial na patogênese da DP e demonstram que ela pode ocorrer devido a

diferentes fatores. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que as alterações presentes no soro de pacientes com DP também podem exercer efeitos diretos sobre a atividade mitocondrial de células neuronais, constituindo mais um mecanismo que contribui para a progressão da doença.

Além de impactar a neurogênese, a inflamação também pode contribuir para a disfunção mitocondrial observada em várias doenças neurodegenerativas (VAN HORSSSEN; VAN SCHAİK; WITTE, 2019). Em modelo animal, foi demonstrado que a morte de neurônios dopaminérgicos que ocorre após a injeção intraestriatal com LPS é precedida por danos à função mitocondrial causados pela inflamação (HUNTER et al., 2007). Já em experimentos realizados com uma linhagem celular de hipocampo de camundongo, a exposição a baixas doses de TNF- α prejudicou a atividade mitocondrial, levando a uma redução da taxa de respiração e do potencial transmembrana (DOLL et al., 2015). Assim, na DP, a disfunção mitocondrial pode ser uma consequência não só do aumento da neuroinflamação mas também do aumento de marcadores inflamatórios no soro.

Outro fator presente na patogênese da DP que já foi associado à disfunção mitocondrial é a proteína α -sin. Em células SH-SY5Y, o tratamento com oligômeros de α -sin inibe a importação de proteínas necessárias para a função mitocondrial, através da interação com o receptor TOM20. Como consequência, há uma diminuição da respiração e do potencial de membrana mitocondrial (DI MAIO et al., 2016). Efeitos similares também foram observados em neurônios primários de camundongos expressando a mutação A53T no gene da α -sin (LI et al., 2013). Portanto, é possível que alterações nos níveis de α -sin, já descritas em amostras de soro de pacientes com DP, sejam um dos fatores responsáveis pela redução do conteúdo mitocondrial funcional observado em nossos resultados (WILLIAMS; SCHULZ; SIERKS, 2016).

Níveis elevados de ROS estão associados à patologia da DP e são uma consequência, em sua maior parte, de danos às mitocôndrias, que são uma das principais fontes de ROS das células (SINGH et al., 2019). Em pacientes com DP, há um aumento do estresse oxidativo, caracterizado por níveis elevados de biomarcadores oxidativos e pela redução da atividade antioxidante (KHAN; ALI, 2018). Além disso, falhas na atividade do complexo I mitocondrial foram encontradas no cérebro de pacientes, podendo levar a um aumento da produção do radical superóxido e uma redução da síntese de ATP (KEENEY et al., 2006; SCHAPIRA et al., 1990). As toxinas ambientais MPTP e rotenona utilizadas para induzir a DP em modelos experimentais, assim como diversas mutações associadas à doença também causam diferentes danos à função mitocondrial e reforçam o papel patogênico de ROS para a

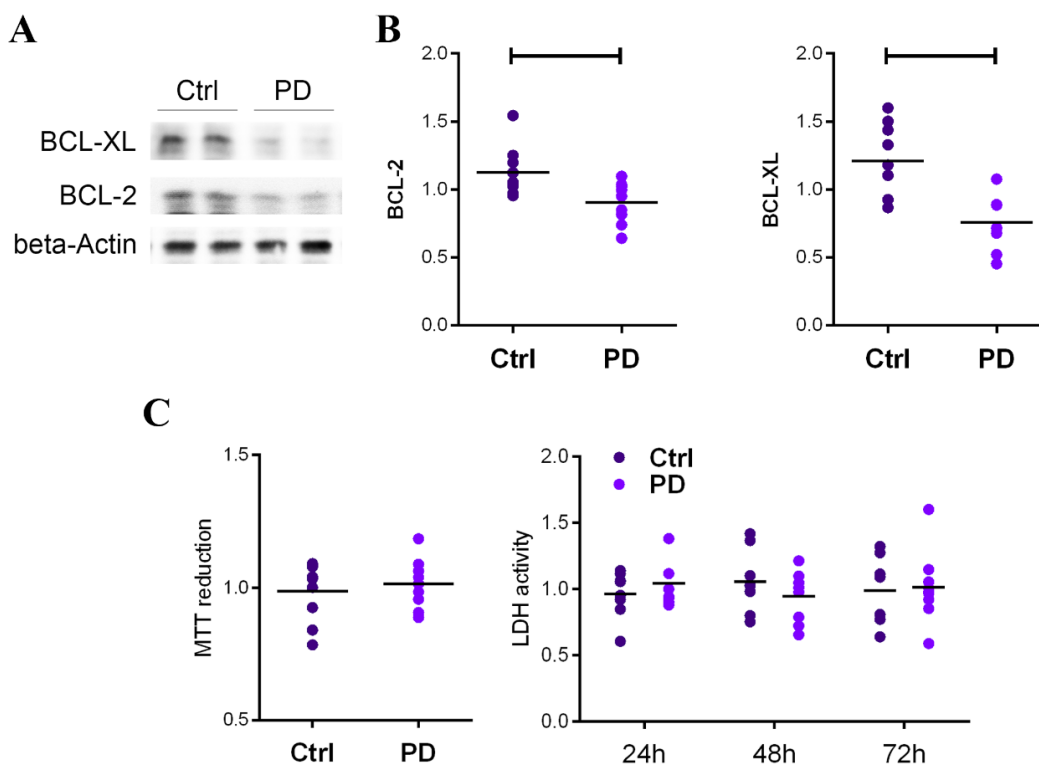
DP (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Apesar de o tratamento com os soros de pacientes com DP ter induzido uma redução da quantidade de mitocôndrias polarizadas, ele não afetou significativamente os níveis de superóxido mitocondrial, demonstrados pela marcação com MitoSox. É possível que os danos à função mitocondrial causados pelas alterações na composição do soro tenham gerado apenas um pequeno aumento na liberação de ROS que a defesa antioxidante das células foi capaz de conter. No entanto, mesmo não apresentando um aumento do estresse oxidativo devido ao acúmulo de ROS, as células expostas ao soro dos pacientes com DP podem ficar mais suscetíveis a outros danos, já que sua função mitocondrial está afetada.

O estresse causado pela disfunção mitocondrial e pelo acúmulo de ROS também pode desencadear a ativação da via intrínseca de apoptose, sendo um dos mecanismos propostos para a morte dos neurônios dopaminérgicos na DP (DIONÍSIO; AMARAL; RODRIGUES, 2021). Durante esse processo, ocorre a fragmentação das mitocôndrias e a permeabilização da membrana externa, que facilitam a liberação de proteínas pró-apoptóticas (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). O acúmulo de ROS intensifica essa resposta através da regulação dos níveis das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, que estabilizam a membrana mitocondrial e previnem a liberação dos fatores pró-apoptóticos (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição ao soro dos pacientes com DP induziu uma redução dos níveis das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, revelando um possível efeito pró-apoptótico. Entretanto, a avaliação da viabilidade celular sugeriu que essa redução não causou danos significativos (Figura 5).

Para melhor compreender a relação entre as alterações na composição do soro e a disfunção mitocondrial, será interessante investigar qual o mecanismo envolvido na redução do conteúdo de mitocôndrias funcionais observada. Dentre os processos que podem levar à disfunção mitocondrial nas células estão, alterações na dinâmica e morfologia mitocondriais, danos à cadeia respiratória e ao transporte de proteínas. A avaliação desses processos nas células expostas ao soro de pacientes com DP poderá auxiliar na compreensão da relação direta entre as alterações da composição do soro com a disfunção mitocondrial. Outro ponto que deverá ser investigado são as consequências deste dano à função mitocondrial para as células. A análise de parâmetros inflamatórios e da ativação de vias apoptóticas, assim como mais ensaios de estresse oxidativo podem indicar se os soros dos pacientes estão relacionados com outros aspectos da neuropatologia da DP. Para confirmar os resultados obtidos em outro modelo, os experimentos realizados com as amostras de soro deverão ser repetidos em cultura

Figura 5 - Níveis de proteínas anti-apoptóticas e viabilidade das células SH-SY5Y expostas às amostras de soro



(A) Análise por Western blot e (B) quantificação dos níveis das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL em células SH-SY5Y expostas ao soro de pacientes com DP e de indivíduos controle. (C) Avaliação da viabilidade celular por meio dos ensaios de redução de MTT e de atividade de LDH.

Fonte: Girardi, C.S. (não publicado)

de células primárias. Em especial, a avaliação dos efeitos sobre a diferenciação neuronal realizada em cultura primária de NSCs fornecerá resultados mais precisos e representativos. Por fim, para entender quais fatores presentes no soro dos pacientes são de fato responsáveis pelos efeitos observados, a avaliação e comparação da composição das amostras de soro estão sendo realizadas.

Como conclusão, o presente trabalho demonstrou que alterações na composição do soro de pacientes com DP podem prejudicar a função mitocondrial das células da linhagem SH-SY5Y. Com isso, sugere que fatores periféricos não são apenas uma consequência da patologia observada no cérebro, mas também exercem um efeito sobre as células, podendo acentuar a progressão da doença. O aprofundamento desta linha de evidências poderá auxiliar na compreensão dos processos envolvidos com a patogênese da DP, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e de estratégias terapêuticas capazes de melhorar o prognóstico dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; TRAMONTIN, A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 287–293, Apr. 2001.
- APPLE, D. M.; SOLANO-FONSECA, R.; KOKOVAY, E. Neurogenesis in the aging brain. **Biochemical Pharmacology**, v. 141, p. 77–85, 1 Oct. 2017.
- BATISTELA, M. S. et al. An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **The International journal of neuroscience**, v. 127, n. 6, p. 547–558, Jun. 2017.
- BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, Dec. 2000.
- BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10291, p. 2284–2303, 12 Jun. 2021.
- BRODACKI, B. et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. **Neuroscience Letters**, v. 441, n. 2, p. 158–162, 22 Aug. 2008.
- CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's disease in women and men: what's the difference? **Journal of Parkinson's disease**, v. 9, n. 3, p. 501–515, 2019.
- CHANG, C.-W. et al. Plasma and Serum Alpha-Synuclein as a Biomarker of Diagnosis in Patients With Parkinson's Disease. **Frontiers in neurology**, v. 10, p. 1388, 2019.
- CHATTERJEE, K. et al. Inflammasome and α -synuclein in Parkinson's disease: A cross-sectional study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 338, p. 577089, 15 Jan. 2020.
- CHEN-PLOTKIN, A. S. Unbiased approaches to biomarker discovery in neurodegenerative diseases. **Neuron**, v. 84, n. 3, p. 594–607, 5 Nov. 2014.
- DAS, S.; BASU, A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 6, p. 1199–1208, 1 May 2008.
- DESPLATS, P. et al. α -Synuclein induces alterations in adult neurogenesis in Parkinson disease models via p53-mediated repression of Notch1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 38, p. 31691–31702, 14 Sep. 2012.
- DI MAIO, R. et al. α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 342, p. 342ra78, 8 Jun. 2016.
- DIONÍSIO, P. A.; AMARAL, J. D.; RODRIGUES, C. M. P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 67, p. 101263, May 2021.
- DOLL, D. N. et al. Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 132, n. 4, p. 443–451, Feb. 2015.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 30 Jan. 2007.

EMMANOUILIDOU, E. et al. Peripheral alpha-synuclein levels in patients with genetic and non-genetic forms of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 73, p. 35–40, Apr. 2020.

GBD 2016 NEUROLOGY COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurology**, v. 18, n. 5, p. 459–480, May 2019.

GBD 2016 PARKINSON'S DISEASE COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, Nov. 2018.

GIRARDI, C. S. et al. Nuclear RXR α and RXR β receptors exert distinct and opposite effects on RA-mediated neuroblastoma differentiation. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1866, n. 3, p. 317–328, Mar. 2019.

GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 141–164, 2014.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 35–42, Mar. 2013.

HÖGLINGER, G. U. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 726–735, Jul. 2004.

HUNTER, R. L. et al. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1375–1386, Mar. 2007.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368–376, Apr. 2008.

KEENEY, P. M. et al. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 19, p. 5256–5264, 10 May 2006.

KHAN, Z.; ALI, S. A. Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Iranian journal of neurology**, v. 17, n. 3, p. 137–144, 6 Jul. 2018.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in Molecular Biology**, v. 1078, p. 9–21, 2013.

LE GRAND, J. N. et al. Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 773–797, Feb. 2015.

- LI, H. et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations. **Autophagy**, v. 15, n. 1, p. 113–130, Jan. 2019.
- LI, L. et al. Human A53T α -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e85815, 31 Dec. 2013.
- LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain Research**, v. 1337, p. 85–94, 14 Jun. 2010.
- LUTH, E. S. et al. Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 31, p. 21490–21507, 1 Aug. 2014.
- MATHIEU, P. et al. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 6, p. 1368–1385, Mar. 2010.
- MAY, V. E. L. et al. Impaired olfactory bulb neurogenesis depends on the presence of human wild-type alpha-synuclein. **Neuroscience**, v. 222, p. 343–355, 11 Oct. 2012.
- NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145–1159, 16 Mar. 2012.
- OLIVEIRA, L. M. A. et al. Elevated α -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. **Cell death & disease**, v. 6, p. e1994, 26 Nov. 2015.
- OLIVEIRA, S. R. et al. Circulating Inflammatory miRNAs Associated with Parkinson's Disease Pathophysiology. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, 23 Jun. 2020.
- PARNETTI, L. et al. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 18, n. 6, p. 573–586, Jun. 2019.
- POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, p. 17013, 23 Mar. 2017.
- POLITO, L.; GRECO, A.; SERIPA, D. Genetic profile, environmental exposure, and their interaction in parkinson's disease. **Parkinson's disease**, v. 2016, p. 6465793, 31 Jan. 2016.
- PONT-SUNYER, C. et al. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). **Movement Disorders**, v. 30, n. 2, p. 229–237, Feb. 2015.
- REGENSBURGER, M.; PROTS, I.; WINNER, B. Adult hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: impact on neuronal survival and plasticity. **Neural plasticity**, v. 2014, p. 454696, 3 Jul. 2014.
- ROCHA, E. M.; DE MIRANDA, B.; SANDERS, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 109, n. Pt B, p. 249–257, Jan. 2018.

RYAN, B. J. et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 200–210, Apr. 2015.

SALAT, D. et al. Challenges of modifying disease progression in prediagnostic Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 15, n. 6, p. 637–648, May 2016.

SCHAPIRA, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 3, p. 823–827, Mar. 1990.

SINGH, A. et al. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 8, 22 Apr. 2019.

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

SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139 Suppl 1, p. 318–324, Oct. 2016.

TOLOSA, E.; WENNING, G.; POEWE, W. The diagnosis of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 1, p. 75–86, 1 Jan. 2006.

TOLOSA, E. et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 20, n. 5, p. 385–397, May 2021.

TREMPE, J.-F.; FON, E. A. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. **Frontiers in neurology**, v. 4, p. 38, 19 Apr. 2013.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. e13031, Dec. 2019.

TUFEKCI, K. U. et al. Inflammation in Parkinson's disease. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 88, p. 69–132, 2012.

VAN HORSSSEN, J.; VAN SCHAIK, P.; WITTE, M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? **Neuroscience Letters**, v. 710, p. 132931, 25 Sep. 2019.

VESELÝ, B. et al. Interleukin 6 and complement serum level study in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 5, p. 875–881, May 2018.

WANG, X. et al. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 9, p. 1931–1944, 1 May 2012.

WILLIAMS, S. M.; SCHULZ, P.; SIERKS, M. R. Oligomeric α -synuclein and β -amyloid variants as potential biomarkers for Parkinson's and Alzheimer's diseases. **The European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 1, p. 3–16, Jan. 2016.

WINNER, B. et al. Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 63, n. 11, p. 1155–1166, Nov. 2004.

WORLITZER, M. M. et al. Anti-inflammatory treatment induced regenerative oligodendrogenesis in parkinsonian mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 4, p. 33, 14 Aug. 2012.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 10, 24 Jan. 2017.

XIE, H.; HU, L.; LI, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 8, p. 1086–1092, 20 Apr. 2010.

ZALTIERI, M. et al. Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Synaptic Pathology in Parkinson's Disease: Who's on First? **Parkinson's disease**, v. 2015, p. 108029, 31 Mar. 2015.

ZHOU, Q. et al. Pharmacological manipulations of autophagy modulate paraquat-induced cytotoxicity in PC12 cells. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 8, n. 2, p. 13–22, 15 Jun. 2017.