

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Análise do papel de Miro-1 sobre a toxicidade da alfa-sinucleína  
em modelo celular da doença de Parkinson.**

**Thaís Alexandre Falkembach Andreis**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo.

Orientadora:

**Profa. Dra. Merari de Fátima  
Ramires Ferrari**

São Paulo

2022

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Modelo celular de neurodegeneração genética e inibição do gene Miro-1 .....	15
3.2. Caracterização dos neurônios .....	16
3.3. Ensaio de MTT .....	16
3.4. Ensaio de Viabilidade Celular - Calceína AM.....	16
3.5. Western Blot.....	17
3.6. Células THP-1 .....	17
3.7. Detecção dos níveis de citocina.....	18
3.8. Produção de Óxido Nítrico .....	18
3.9. Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS .....	18
5. DISCUSSÃO .....	24
6. CONCLUSÕES.....	25
7. REFERÊNCIAS .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

A30P - mutação Ala30Pro da proteína alfa-sinucleína

A53T - mutação Ala53Thr da proteína alfa-sinucleína

ATF6 - fator de transcrição 6

Bcl-2 - do inglês, *B-cell CLL/lymphoma 2*

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

CHOP - proteína homóloga de C/EBP

DAMP - padrão molecular associado a danos (do inglês, *damage-associated molecular patterns*)

ERO - espécie reativa de oxigênio

EV - vetor vazio (do inglês, *empty vector*)

GDNF - fator neurotrófico derivado de células gliais (do inglês, *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor*)

IL - interleucina

iPS - célula tronco pluripotente induzida (do inglês, *induced pluripotent stem cells*)

IRE1 $\alpha$  - proteína quinase dependente de inositol 1 $\alpha$

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)

NF-kB - fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLRP3 - do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing protein 3*

PAMP - padrão molecular associado a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

PERK - proteína quinase residente no retículo endoplasmático semelhante à PKR

PINK1 - quinase 1 induzida por PTEN (do inglês, *PTEN-induced kinase 1*)

RE - retículo endoplasmático

TLR - receptores do tipo toll (do inglês, *toll like receptor*)

TNF - fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

UPR - resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês, *unfolded protein response*)

WT - selvagem (do inglês, *wild type*)

XBP-1 - fator de transcrição proteína de ligação ao X-box

## RESUMO

ANDREIS, THAIS A F. **Análise do papel de Miro-1 sobre a toxicidade na alfa-sinucleína em modelo celular da doença de Parkinson.** 2022. no. 1139-21. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, mitocôndria, Miro-1, CRISPR/Cas9, alfa-sinucleína, inflamação

**Introdução:** A alfa-sinucleína é responsável pela maturação e liberação de vesículas pré-sinápticas. Mutações, como a A30P e a A53T, podem ser bastante prejudiciais à viabilidade celular. Uma das principais características da doença de Parkinson é a presença de agregados proteicos de alfa-sinucleína, conhecidos como corpos de Lewy. A proteína Miro-1 tem papel essencial no transporte mitocondrial anterógrado e retrógrado e na mitofagia mediada por PINK1/Parkina. Experimentos do nosso grupo de pesquisa observaram que a deleção de Miro-1 parece proteger da morte leveduras que expressam alfa-sinucleína exógena. Desta forma, é relevante avaliar a influência do silenciamento de Miro-1 na superexpressão de alfa-sinucleína, tanto na perspectiva da viabilidade celular e estresse do retículo endoplasmático, quanto na possível ativação da resposta pró-inflamatória.

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo é estabelecer a relação entre os níveis da proteína Miro-1 e a toxicidade promovida pela superexpressão da alfa-sinucleína. Para isso, avaliou-se os efeitos da diminuição da expressão de Miro-1 em neurônios que expressam alfa-sinucleína selvagem (WT) e mutante (A30P e A53T) em relação à morte celular, estresse do retículo endoplasmático, mitofagia e resposta inflamatória.

**Materiais e métodos:** Células SH-SY5Y foram diferenciadas em neurônios dopaminérgicos e transfectadas com plasmídeos de alfa-sinucleína selvagem e mutante (A30P e A53T), além da utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 para redução da expressão de Miro-1. A fim de se estudar a viabilidade celular, foram realizados ensaio de MTT e de calceína AM. Por meio do Western Blot, foram possíveis análises de proteínas como caspase3, XBP-1, CHOP, Bip e ATF6. As células THP-1 foram utilizadas para avaliação da inflamação, juntamente com as técnicas de quantificação de óxido nítrico e ELISA para TNF- $\alpha$ . Para a análise estatística, os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), adotando o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

**Resultados:** É possível afirmar que a superexpressão de alfa-sinucleína na forma selvagem e mutante, principalmente A53T, afeta a viabilidade celular. No entanto, o silenciamento da Miro-1 parece proteger as células do estresse e da consequente morte celular, como pode-se observar nas marcações de Western Blot e no ensaio de MTT e de calceína AM. O aumento na resposta UPR dos grupos CRISPR + A30P e CRISPR + A53T pode estar relacionado com o papel essencial que a Miro-

1 tem para a célula e o estresse gerado por seu silenciamento. Este aumento pode estar associado também à fase inicial dos efeitos da expressão de alfa-sinucleína mutante em que há uma regulação compensatória das chaperonas envolvidas no correto enovelamento e encaminhamento das proteínas. Além disso, foi possível observar que a diminuição de Miro-1 também sugere uma redução na resposta pró-inflamatória no SNC, protegendo as células da toxicidade gerada pela neuroinflamação crônica, presente em pacientes da doença de Parkinson.

**Conclusão:** Os resultados apontam para a confirmação da hipótese de que o silenciamento da proteína Miro-1, quando há superexpressão da alfa-sinucleína, é capaz de proteger a célula do estresse do retículo endoplasmático, da ativação do sistema UPR, da neuroinflamação e, posteriormente, da apoptose.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente às minhas famílias, Andreis e Oliveira, mas em especial Arthur, Meire e Rogério, por toda a parceria, amor, brincadeiras e “força Thatha” que eu recebo de vocês todos os dias, com certeza não seria quem sou hoje sem o apoio e paciência de vocês.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos do colégio (Aline, Gabriel, Guilherme, Gustavo, Julia, Juliana, Leonardo) e da faculdade (José Wellington, Lucas, Raely, Rafael, Renan, Tainã (in memoriam)), presentes em todos os eventos marcantes e prazerosos dos meus anos acadêmicos e que me dão o maior orgulho de chamar de companheiros “Sabinianos” e farmacêuticos.

Por fim, tenho muito a agradecer à minha orientadora e meu coorientador de coração, Merari e Renato, que não só criaram um ambiente acolhedor para o início da minha vida acadêmica, mas também me ensinaram muito do que entendo sobre ciência. Aos amigos de laboratório, não tenho como retribuir pelas risadas, abraços quentinhos quando os experimentos dão errado, o grupo de fofocas e os “bota dentro/bota fora”, vocês fizeram toda a diferença!

Obrigada também à professora Jeanine, que não só alegrou muitas das aulas de Química Farmacêutica, mas que também virou uma amiga de coração e que sua presença completa o trio de professores especiais e queridos da minha banca de TCC.

## 1. INTRODUÇÃO

### Doença de Parkinson e a proteína alfa-sinucleína

Em 1817, o médico britânico James Parkinson descreveu pela primeira vez o seguinte conjunto de sinais: “movimento involuntário trêmulo, com força muscular diminuída, propensão de curvatura do tronco para frente, com sentidos e intelecto permanecendo ilesos” de seis pacientes. Estes sintomas foram chamados na época de “paralisia agitante” e atualmente é conhecida como Doença de Parkinson. Sabe-se que esta é caracterizada pela presença de agregados da proteína alfa-sinucleína, também chamados de corpos e neuritos de Lewy, em neurônios dopaminérgicos da substância negra.

A proteína citosólica alfa-sinucleína é responsável pela maturação e liberação de vesículas pré-sinápticas, compostas por neurotransmissores, e pode desencadear danos funcionais quando apresenta alterações em sua estrutura (KOPRICH, 2017; LI, 2021; CARDINALE, 2021). Mutações na alfa-sinucleína podem ser bastante prejudiciais à viabilidade celular, dentre elas a Ala30Pro (A30P) está associada à disfunção do metabolismo lipídico e a Ala53Thr (A53T) que apresenta maior toxicidade e rápido aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MELO, 2022). A alta expressão da proteína selvagem pode gerar má formação, facilitando o acúmulo da alfa-sinucleína em monômeros, fibrilas e oligômeros, componentes dos corpos de Lewy.

Estes agregados prejudicam a função mitocondrial e do retículo endoplasmático (RE). Como consequência natural do envelhecimento, há a diminuição da autofagia e decorrente excesso de cargas a serem degradadas, as mitocôndrias não funcionais se acumulam, causam o aumento da produção de EROs e desbalanço da homeostase do cálcio juntamente com o RE, ativando a resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês, *unfolded protein response* - UPR). Este processo sinaliza para a expressão de chaperonas específicas para o correto enovelamento das proteínas e, no caso de manutenção do estresse do RE, há

desencadeamento da morte celular.

O controle motor é feito por centros encefálicos como os núcleos da base, que são compostos pelo corpo estriado, globo pálido interno e externo, substância negra e subtálamo. A fim de realizar um movimento, o córtex motor sinaliza aos componentes do núcleo da base, que o retornam com duas respostas contrárias - a excitatória da via direta e a inibitória, da indireta. A dopamina é essencial nesse processo, possibilitando a execução do movimento de forma controlada (figura 1). No entanto, nos contextos do envelhecimento e da doença de Parkinson, a morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra diminui consideravelmente a quantidade do neurotransmissor, enviando sinais contrários ao córtex, os quais geram o tremor involuntário característico da doença.

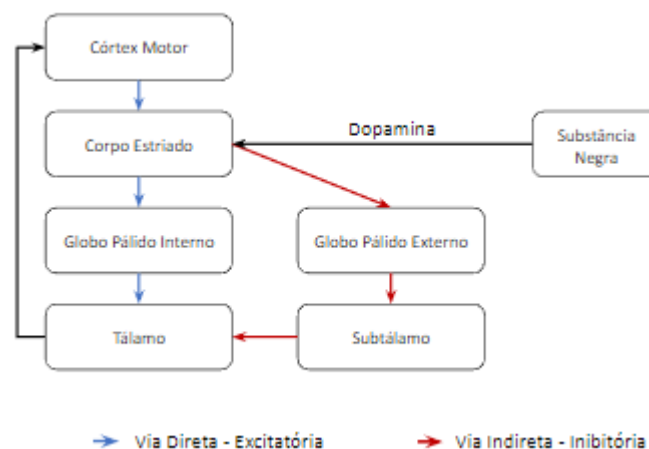


Figura 1. Esquema das vias direta e indireta na comunicação entre córtex motor e os núcleos da base para realização do movimento.

### Alfa-sinucleína e Estresse do Retículo Endoplasmático

Para as proteínas serem consideradas funcionais, elas precisam interagir com as chaperonas e adquirir certa conformação tridimensional, etapa conhecida como enovelamento, o qual ocorre no retículo endoplasmático. Após este processo, a proteína recém-formada passa por um controle de qualidade, no qual três sensores estão envolvidos: proteína quinase dependente de inositol 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ),



proteína quinase residente no retículo endoplasmático semelhante à PKR (PERK) e fator de transcrição 6 (ATF6). Elas são responsáveis por monitorar o ambiente e detectar proteínas mal enoveladas, sinalizando-as para a degradação. Caso a produção destas malformações seja alta, o RE fica sobrecarregado, o sistema UPR é ativado e as três proteínas sensores sinalizam à célula para aumentar a síntese de RE. Se o nível permanecer alto, proteínas mal enoveladas começam a ser liberadas e há sinalização para sistemas de degradação intracelular, como a autofagia (PINTO, 2012).

A proteína Bip interage com os três sensores citados acima, o que os mantém em estado inativo. Com a ativação do sistema UPR, a ligação das proteínas reguladoras com a Bip é rompida, por esta ter maior afinidade por proteínas mal enoveladas (WALTER, 2011). A cascata da Ire-1 leva à atividade de duas proteínas principais: a XBP-1, a qual participa da transcrição de chaperonas e genes ligados à degradação de proteínas, e a TRAF-2, responsável por ativar a caspase-12, sinal indutor de morte específico para o estresse do RE (NAKAGAWA, 2000). Já a ATF6 se transloca para o complexo de Golgi e é clivada, na qual o seu fragmento N-terminal (ATF6f) migra para o núcleo, onde é responsável indiretamente pela expressão de genes para chaperonas residentes, como a Bip, e também participa da transcrição de XBP-1. Por fim, a via PERK está bastante ligada com a proteína CHOP, relacionada com a morte celular pela expressão reduzida do fator antiapoptótico Bcl-2, a superexpressão de Bim (fator pró-apoptótico da família Bcl-2) (DANIAL, 2004) e da indução na expressão do receptor de morte 5 (DR5) (CHAUDHARY, 1997). De maneira oposta, células que não expressam a PERK são mais suscetíveis à morte celular durante a ativação do sistema UPR (HARDING, 2000), o que comprova os papéis de sinalização pró-apoptótica, mas também de sobrevivência, da via PERK. A figura 2 exemplifica a ação das proteínas relacionadas à UPR.

Na doença de Parkinson, os corpos e neuritos de Lewy, se presentes em grande quantidade, podem levar à ativação da resposta UPR e iniciar a morte de neurônios da substância negra. Estudos indicam que o estresse do retículo

endoplasmático está presente desde o início da neurodegeneração (MERCADO, 2013; ROUSSEL, 2013). A redução na expressão de CHOP diminuiu a susceptibilidade de neurônios dopaminérgicos a neurotoxinas que induzem a doença de Parkinson (SILVA, 2005), enquanto a deficiência de ATF6 $\alpha$  apresentou resultado contrário (EGAWA, 2011; HASHIDA, 2012).

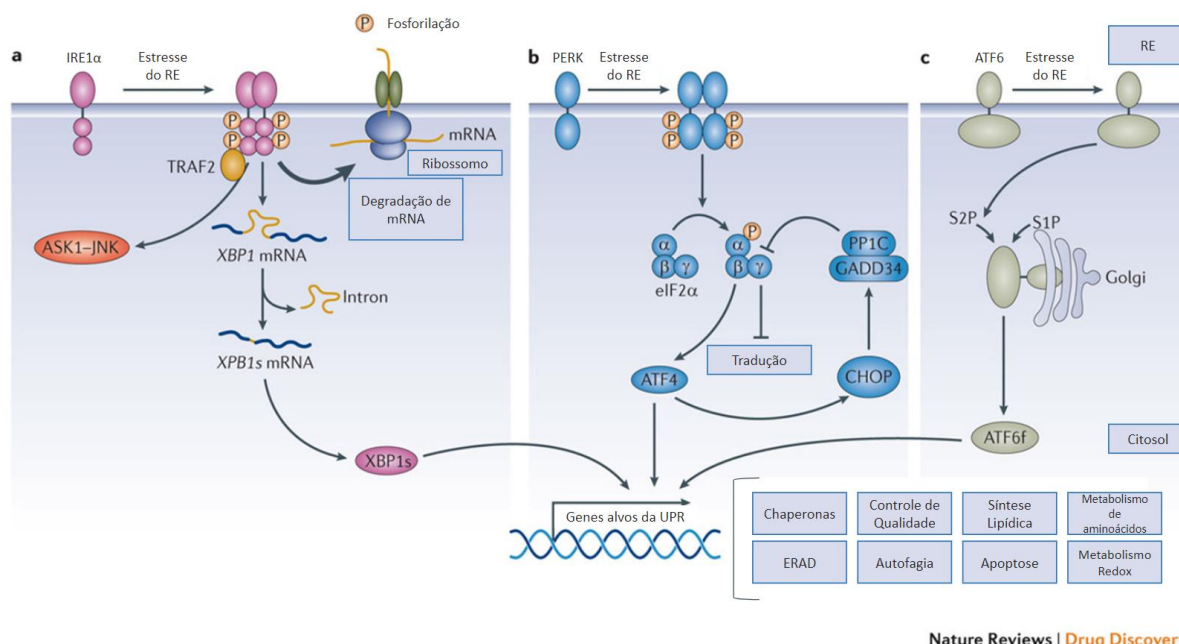


Figura 2. Adaptada de Hetz, 2022, Nature Reviews Drug Discovery. Figura representativa das três proteínas sensores da resposta UPR. **a.** IRE1 $\alpha$  processa o mRNA do fator de transcrição proteína de ligação ao X-box (XBP-1). Ao ser ativado, superexpressa um subgrupo de genes relacionados ao enovelamento de proteínas, degradação de proteínas associado ao RE, controle de qualidade de proteínas e biogênese de organelas. Também ativa sinais para apoptose, como o fator 2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF2). **b.** A ativação da via da PERK aumenta a síntese de proteínas em geral e também pode promover apoptose, através da proteína homóloga de C/EBP (CHOP). **c.** A ATF6, em situações de estresse do RE, se transfere para o complexo de Golgi, onde libera seu domínio citosólico (ATF6f) que controla a superexpressão de genes específicos do sistema UPR voltados à degradação de proteínas.

## Doença de Parkinson e o Sistema Imune

A resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC) tem grande participação das microglias, as quais representam a maior população de células imunes residentes, responsáveis por monitorar o ambiente e pelo processo de fagocitose. No momento em que padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ativam a microglia, ela assume formas ameboides e com largas extensões, sendo então conhecida como M1. Este fenótipo possui alto número de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade 1 e 2 (MHC-I e MHC-II), produz citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL6 e TNF) e afetam a barreira hematoencefálica, permitindo a infiltração de células imunes periféricas (monócitos e células T). As microglias também podem ser ativadas e assumir o fenótipo M2, caracterizado por produzir resolvinas e citocinas anti-inflamatórias, como a IL4 e IL10.

Segundo Mayne (2020), o sistema imune no SNC pode atuar como amigo ou inimigo, dependendo das condições em que se encontra. Em um indivíduo saudável, as células T reguladoras e as Th2 liberam IL-4 e IL-10, os quais aumentam a síntese do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), conhecido por ser neuroprotetor, e redução da ativação da microglia, o que diminui a produção de EROs e ativação de NF-kB. Em contraste, com o envelhecimento e em doenças neurodegenerativas, há alterações na barreira hematoencefálica, que ocasionam maior permeabilidade, e a ativação de microglias aumenta o recrutamento de células T para o SNC. Células iPS de mesencéfalo e células T ativadas de pacientes mostraram aumento na morte neuronal, associada ao aumento na produção de IL-17 e de receptores de IL-17. De maneira complementar, o efeito degenerativo foi suprimido com o tratamento prévio dos neurônios com anticorpos neutralizantes de IL-17 ou do receptor de IL-17, sugerindo o papel das células Th17 na morte neuronal da doença de Parkinson (Sommer, 2019).

A exposição de células neurais a fibrilas de alfa-sinucleína pré-formadas gera a liberação de fatores pró-inflamatórios pela microglia, aumentando a atividade

fagocítica e propagação de alfa-sinucleína de maneira similar aos príons (proteínas enoveladas corretamente passam a apresentar alterações estruturais quando interagem com as formas mal enoveladas) (CHESSELET, 2012; KIM, 2013). De modo resumido, a alfa-sinucleína extracelular pode atuar como DAMP e ativar a microglia por meio do receptor do tipo toll 2 (TLR2) (LI, 2021; CARDINALE, 2021), ao mesmo tempo em que as fibrilas da proteína ativam NF- $\kappa$ B. Estes dois processos ativam a microglia e o inflamassoma NLRP3 que, a partir da atividade proteolítica da caspase 1, leva à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18 (LI, 2021; CARDINALE, 2021). Há também a síntese de alfa-sinucleína truncada, que tende a produzir maior quantidade de agregados proteicos, levando a um aumento da citotoxicidade pelo excesso de resposta inflamatória (LI, 2021; CARDINALE, 2021), conforme ilustrado na figura 3.

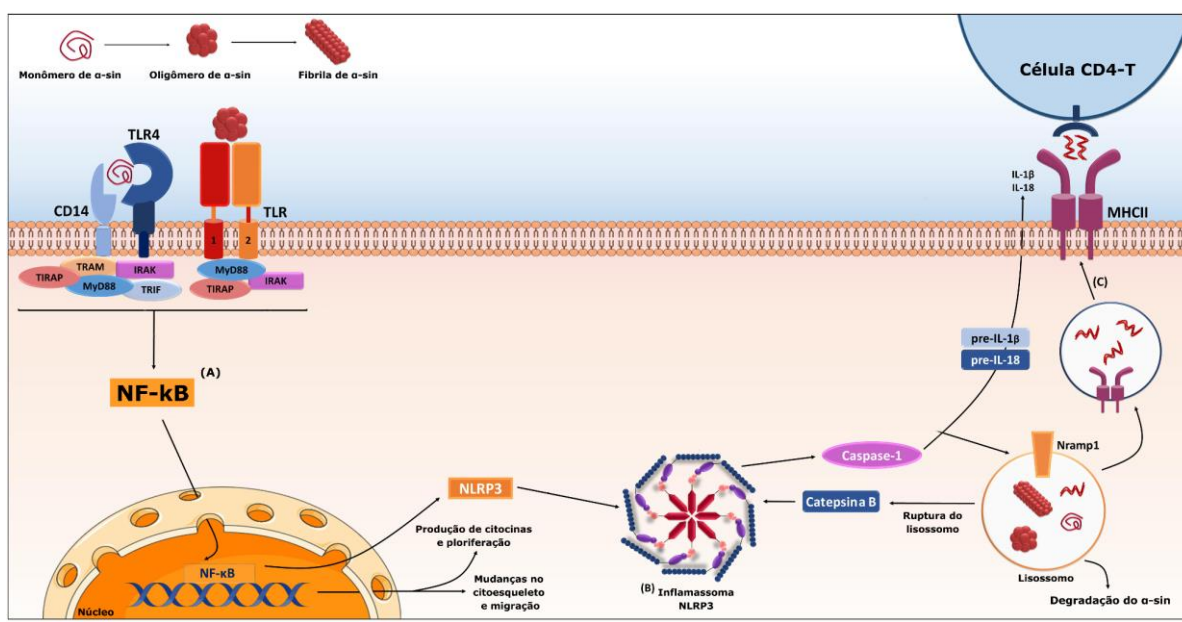


Figura 3. Adaptada de Ferreira, 2018, Frontiers. Ação inflamatória da alfa-sinucleína sobre a microglia.

### Miro-1

A proteína Miro-1 está localizada na membrana externa da mitocôndria e atualmente pode ser considerada como uma das assinaturas moleculares da

doença de Parkinson (GROSSMAN, 2020). Tem papel essencial no transporte mitocondrial anterógrado (do corpo celular para a periferia do axônio) e retrógrado (da periferia do axônio para o corpo celular), na comunicação entre retículo endoplasmático e mitocôndria (KORNMAN, 2011) e na mitofagia mediada por PINK1 e Parkina. O silenciamento de Miro-1 em cultura primária de neurônios de camundongos gerou distribuição mitocondrial irregular e a decorrente diminuição na complexidade dendrítica (LÓPEZ-DOMÉNECH, 2016). No entanto, a superexpressão da proteína levou à degeneração de neurônios dopaminérgicos em moscas, provavelmente associado ao atraso na reciclagem de mitocôndrias não funcionais pela mitofagia provocada pelo excesso de Miro-1 (LIU, 2012).

Para preservar os longos axônios e a liberação e reciclagem de neurotransmissores (YELLEN, 2018), os neurônios dependem constantemente da atividade mitocondrial, visto sua importância para geração de energia celular, regulação da homeostase e mediação dos níveis de cálcio intracelular (FRANCO-IBORRA, 2016). A formação dos agregados proteicos de alfa-sinucleína e o aumento de mitocôndrias não funcionais também são responsáveis por levar os neurônios dopaminérgicos à morte, além de todos os mecanismos citados anteriormente.

Experimentos do nosso grupo de pesquisa observaram que a deleção da Miro-1, embora tóxica para células saudáveis, parece proteger da morte leveduras que expressam alfa-sinucleína exógena - mutações A30P e A53T (Figura 4) (MELO, 2022). Desta forma, é relevante avaliar a influência do silenciamento de Miro-1 no contexto da superexpressão de alfa-sinucleína selvagem e exógena, tanto na perspectiva da viabilidade celular e estresse do retículo endoplasmático, quanto nos possíveis efeitos da ativação da resposta pró-inflamatória.

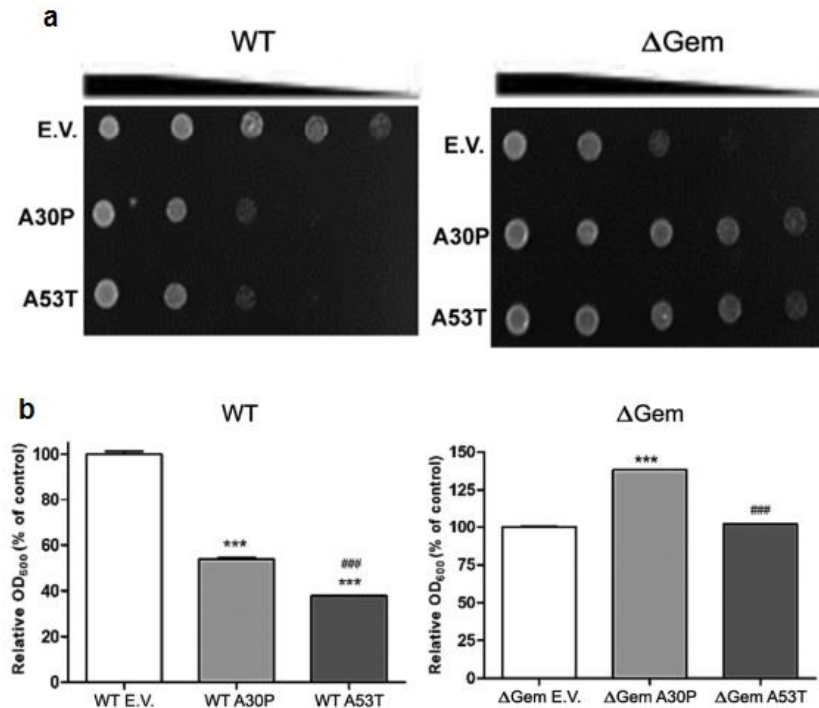


Figura 4. Adaptado de MELO, 2022, Molecular and Cellular Neuroscience. (a) Diluição em série de extratos de levedura selvagem (WT) e deleção da proteína Gem ( $\Delta$ Gem), ortólogo da Miro-1 humana. Células WT que expressam alfa-sinucleína mutante apresentam diminuição no crescimento em comparação às células expressando vetor vazio (EV), enquanto células  $\Delta$ Gem mostram capacidade de crescimento aumentada.

## 2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é estabelecer a relação entre os níveis da proteína Miro-1 e a toxicidade promovida pela superexpressão da alfa-sinucleína. Para isso, avaliou-se os efeitos da diminuição da expressão de Miro-1 em neurônios, derivados de neuroblastoma, que expressam alfa-sinucleína selvagem (WT) e mutante (A30P e A53T) em relação aos seguintes aspectos:

- 1) morte celular;
- 2) estresse do retículo endoplasmático;
- 3) mitofagia;
- 4) resposta inflamatória.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo utiliza um modelo celular de neurodegeneração a fim de entender o papel de Miro-1 nos processos que desencadeiam a morte neuronal. Esse desafio será alcançado utilizando as ferramentas detalhadas a seguir.

#### 3.1. Modelo celular de neurodegeneração genética e inibição do gene Miro-1

Células SH-SY5Y (94030304, Sigma) foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 (Sigma D8437) suplementado com 20% v/v soro fetal bovino (F7524 Sigma), 100 unidades/litro de penicilina e 100 mg/litro de estreptomicina (P4333 Sigma). As células permaneceram incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

O gene Miro-1 foi silenciado nessas células pelo método de edição gênica CRISPR/Cas9, como protocolo específico descrito previamente (Kanfer *et al.*, 2015). O laboratório recebeu a doação do vetor pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh- hSpCas9 de Benoît Kornmann, autor do artigo "Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F" (KORNMANN, 2015). Desta forma, os plasmídeos já contêm as sequências do Cas9, Miro exon 7 e Miro exon 8. A certificação da inibição completa do gene Miro-1 em diferentes clones foi aferida por Western Blot.

A fim de criar um modelo para estudar os mecanismos de toxicidade da alfa-sinucleína, as SH-SY5Y controles e as células com redução nos níveis da Miro-1 foram transfectadas com plasmídeos contendo um vetor vazio (*Empty Vector* - EV), um inserto de alfa-sinucleína constitutiva (selvagem ou *Wild Type* - WT) ou as mutações Ala30Pro (A30P) e Ala53Thr (A53T). Os níveis de expressão da alfa-sinucleína e da Miro-1 foram quantificados por Western Blot.

As células foram diferenciadas em neurônios adicionando 10µM de ácido retinóico ao meio, o qual foi trocado a cada 2 dias por 5 dias, e então as células foram mantidas em DMEM suplementado com 10µM de ácido retinóico e 10 ng/ml de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), para promover o crescimento das extensões neurais, por até mais 6 dias, ou enquanto forem viáveis (estudos anteriores do laboratório

demonstraram que células SH-SY5Y que expressam Miro-1 começam a morrer 8 dias após o início da expressão da alfa-sinucleína).

Os neurônios foram caracterizados por imunocitoquímica empregando-se anticorpo anti-MAP2. Foi realizado ensaio de MTT, bem como Western Blot para caspase 3, a fim de quantificar a viabilidade celular na presença e ausência de expressão de Miro-1 e com expressão das diferentes formas da alfa-sinucleína.

### **3.2. Caracterização dos neurônios**

As células foram fixadas com uma solução gelada de paraformaldeído 4% seguida de metanol por 1 minuto a cada fixação, e permeabilizadas com Triton X100 a 0,2% para posterior incubação com o anticorpo primário específico para a MAP-2 com a intenção de caracterizar a diferenciação dessas células. Secundariamente, as células foram incubadas com anticorpos fluorescentes específicos para o anticorpo primário possibilitando a visualização dessas proteínas.

### **3.3. Ensaio de MTT**

A reação de redução do MTT foi monitorada pela absorbância a 570 nm, o que se correlaciona diretamente com o número de células viáveis permitindo então a análise quantitativa desse parâmetro (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi conduzido utilizando células plaqueadas em placas de 96 poços, as quais foram incubadas com 20µL de MTT (5mg/ml, Sigma) por poço durante 1 hora em incubadora de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o meio de cultura contendo MTT foi descartado, as células solubilizadas com 200µl de DMSO por poço e submetidas a análise dos níveis de absorbância (570 nm) utilizando-se de leitor de placas (Epoch, Biotek).

### **3.4. Ensaio de Viabilidade Celular - Calceína AM**

Células plaqueadas em placas de 96 poços foram incubadas com 20µL de Calcein AM (Invitrogen C1430) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o meio de cultura contendo Calcein AM foi descartado, foram adicionados 200µL de PBS por poço e a placa foi submetida à análise dos níveis de absorbância (485 nm) utilizando-se espectrofotômetro (Polar Star 2).



### **3.5. Western Blot**

As células em cultura foram lisadas e homogeneizadas utilizando-se 200µL de tampão de lise constituído de NP40, deoxicolato de sódio, SDS, EDTA, EGTA e coquetel inibidor de proteases (Sigma). A quantidade de proteína foi analisada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva de calibração foi feita utilizando-se albumina em quantidade de 0 a 16 µg de proteína por poço.

As amostras (30µg) das culturas de células foram aplicadas às canaletas do gel de poliácridamida a 12% para fracionamento. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueada e incubada com os seguintes anticorpos primários: anti-caspase3 ativada (para avaliação da morte celular), anti-Miro-1 (para certificação da ausência da proteína nos grupos submetidos à edição do DNA), anti-alfa-sinucleína (para avaliação de seus níveis endógenos bem como para certificação da eficiência da expressão exógena), anti-CHOP e anti-ATF6 (para avaliação do estresse do retículo endoplasmático), anti-pink1 e anti-parkina (para avaliação da mitofagia).

Os anticorpos secundários foram conjugados a uma peroxidase (HRP), a incubação das membranas com estes anticorpos foi feita à temperatura ambiente durante 45 minutos. As membranas foram então lavadas e a marcação foi revelada através de incubação com reagente quimioluminescente (Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante 1 minuto e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences).

O controle de loading foi feito pela coloração da membrana com Ponceau após a corrida e transferência do gel para a membrana. Os filmes e a membrana corada com Ponceau foram quantificados por densitometria óptica usando o programa ImageJ (NIH).

### **3.6. Células THP-1**

A linhagem celular monocítica THP-1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) foi mantida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, penicilina/gentamicina e 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A diferenciação para macrófagos foi realizada plaqueando a uma densidade de 5 x

10<sup>5</sup> células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 50 nM de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 72 horas (HAMON, 2018).

### **3.7. Detecção dos níveis de citocina**

Após a diferenciação das células THP-1, o meio condicionado (transfecção de alfa-sinucleína + CRISPR Miro-1) foi adicionado às células por 48 horas para estímulo. Os níveis de citocina foram quantificados pelo ensaio de ELISA sanduíche (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com as especificações do fabricante (B&D).

### **3.8. Produção de Óxido Nítrico**

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas foi medida usando o método de Griess, conforme descrito por Ding e colaboradores (1998). Resumidamente, 50 µl de sobrenadante foi incubado com 50 µL de reagente de Griess (preparado com reagentes da Sigma, St Louis, MO, USP) por 5 minutos em temperatura ambiente. A concentração foi determinada medindo a densidade ótica (OD) a 550 nm em referência a uma solução padrão de nitrato de sódio (NaNO<sub>2</sub>).

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) usando o programa GraphPad Prism para Windows (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA), adotando o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os experimentos foram feitos em triplicata (réplicas técnicas) e repetidos pelo menos 3 vezes (réplicas biológicas).

## **4. RESULTADOS**

### Análise dos níveis de Miro-1 e alfa-sinucleína

Os níveis de Miro-1 foram reduzidos conforme pode-se notar na figura 5, ilustrando a efetividade da ação da transfecção dos plasmídeos específicos de

CRISPR/Cas. Assim como os níveis de alfa-sinucleína insolúvel aumentaram após a transfecção (Figura 5).

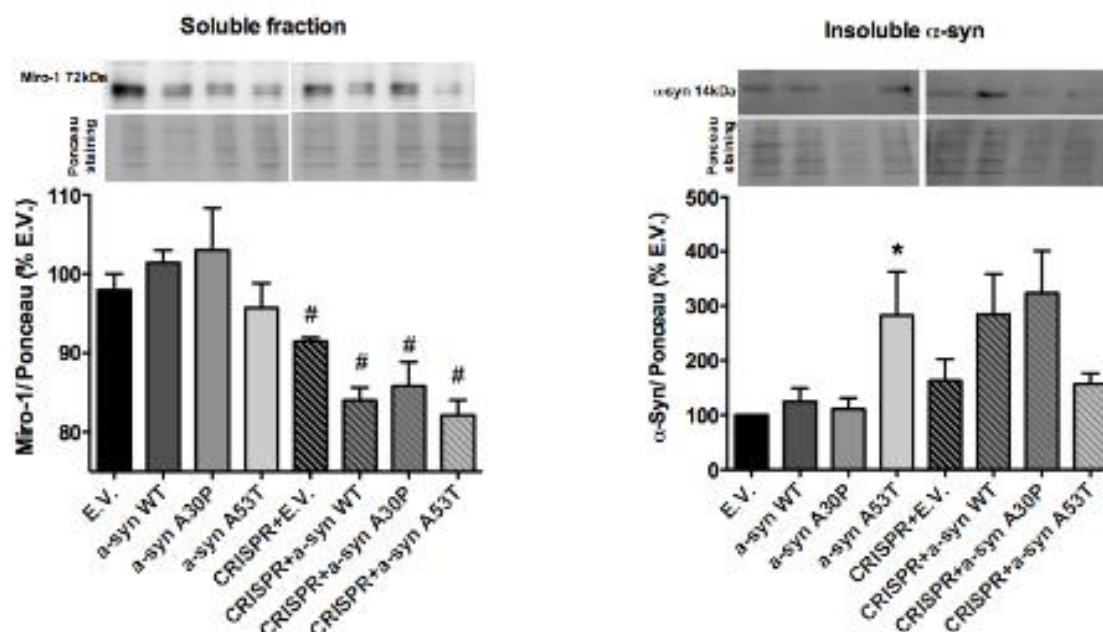


Figura 5. Western blot para quantificação dos níveis de miro-1 e alfa-sinucleína. Os lisados celulares foram preparados a partir de células SH-SY5Y diferenciadas e transfectadas com alfa-sinucleína e CRISPR Miro-1 e analisadas por Western Blot marcando as proteínas Miro-1 (72 kDa) e alfa-sinucleína (14 kDa). Analisado utilizando o Graphpad, 2 way ANOVA, #  $p < 0.05$  comparado com as amostras sem CRISPR, \*  $p < 0.05$  comparado com o EV, Bonferroni post test,  $n = 3$ .

### Análise do estresse do retículo endoplasmático

Para a avaliação do estresse do retículo endoplasmático, foram realizadas marcações por Western Blot (figuras 6 e 7) para as proteínas: Bip, ATF6, CHOP, XBP-1 e caspase 3 (ativada indiretamente pela CHOP e sinaliza célula para apoptose).

As proteínas Bip e XBP-1 não apresentaram diferenças significativas (Figura 6). Como esperado, os grupos CRISPR + WT, CRISPR + A30P e CRISPR + A53T, em relação à CRISPR + EV, mostraram diminuição nos níveis de caspase-3,

enquanto a ATF6 aumentou nos últimos dois grupos e a CHOP teve redução considerável no grupo CRISPR + A53T (Figura 7).

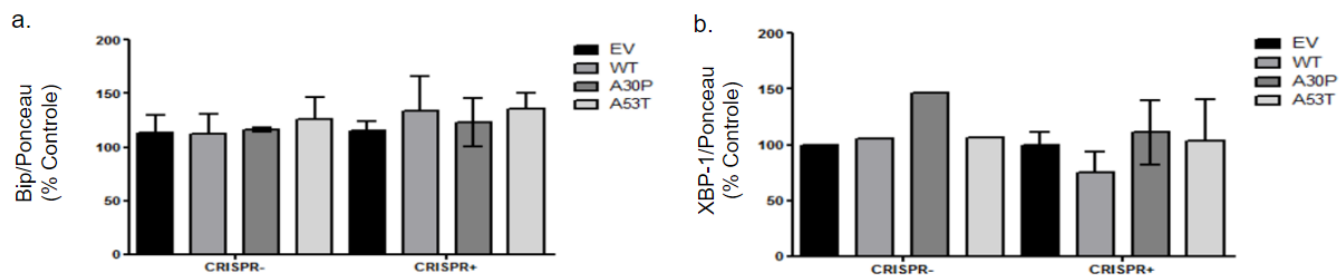


Figura 6. Western blot com células SH-SY5Y diferenciadas. Os lisados celulares foram preparados a partir de células SH-SY5Y diferenciadas e transfectadas com alfa-sinucleína e CRISPR Miro-1 e analisadas por Western Blot marcando as proteínas **a.** ATF-6 total (90 kDa), ATF-6 clivada (50 kDa) e **b.** XBP1 (52-54 kDa). 30 µg de cada amostra de proteína foi aplicada a cada poço. A quantidade de proteína total foi marcada utilizando Ponceau e foi utilizada como controle de loading. Analisado utilizando o Graphpad, 2 way ANOVA, Bonferroni post tests, n=2.

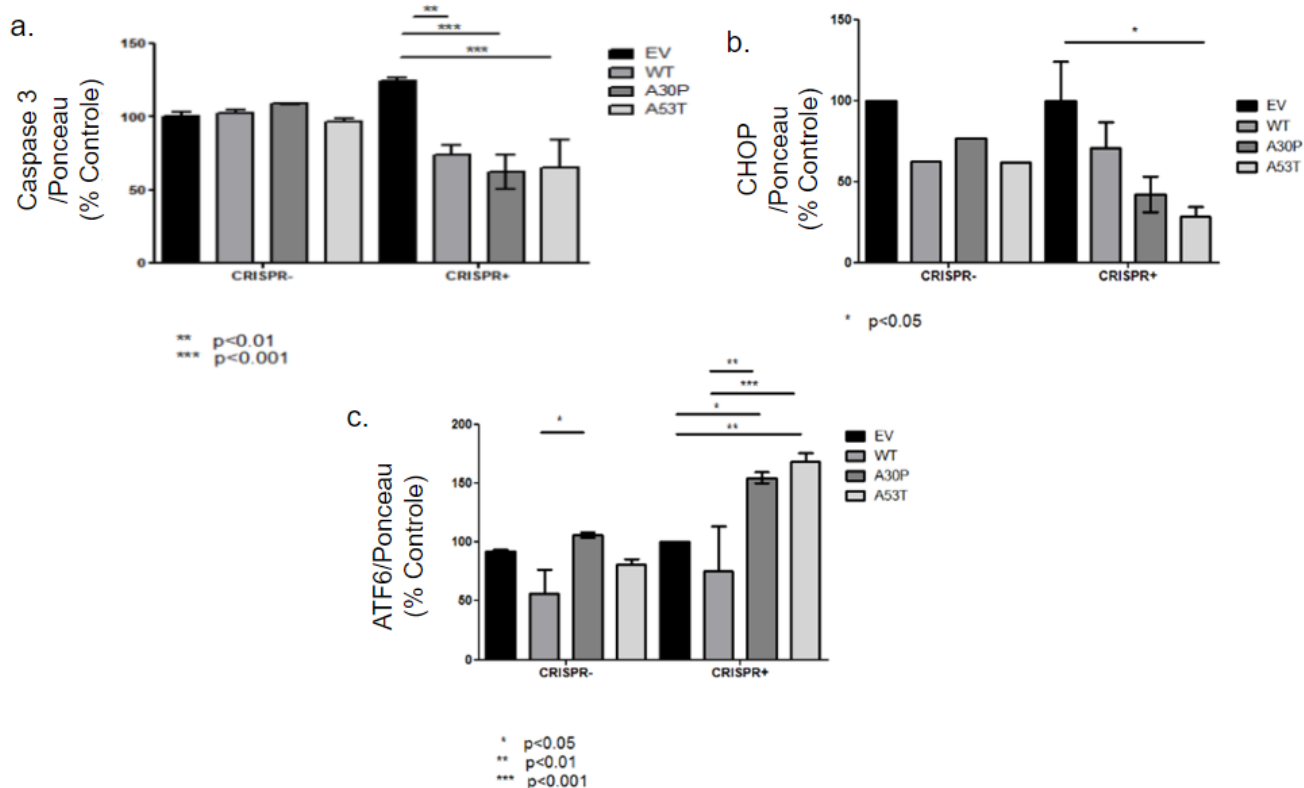


Figura 7. Western blot com células SH-SY5Y diferenciadas. Os lisados celulares foram preparados a partir de células SH-SY5Y diferenciadas e transfectadas com alfa-sinucleína e CRISPR Miro-1 e analisadas por Western Blot marcando as proteínas **a.** ATF-6 total (90 kDa), ATF-6 clivada (50 kDa) e **b.** XBP1 (52-54 kDa). 30 µg de cada amostra de proteína foi aplicada a cada poço. A quantidade de proteína total foi marcada utilizando Ponceau e foi utilizada como controle de loading. Analisado utilizando o Graphpad, 2 way ANOVA, Bonferroni post tests, n=2.

Estes resultados mostram que a redução na expressão de Miro-1, quando a alfa-sinucleína está superexpressa, ativa significativamente a resposta UPR, mas é capaz de diminuir o processo de apoptose.

### Viabilidade celular

Melo e colaboradores (2022) observaram que a ausência de Gem1 (ortólogo da Miro-1) promove a diminuição do efeito da alfa-sinucleína em leveduras. Para investigar se o mesmo ocorre em células humanas, realizou-se o ensaio de MTT, o qual é utilizado para quantificar a atividade mitocondrial, visto que a alfa-sinucleína interage com a mitocôndria e pode torná-la disfuncional. Foi realizado também ensaio de viabilidade celular pelo ensaio da calceína AM que identifica as células capazes de metabolizar o reagente (viáveis) tornando-as fluorescentes (JENNER, 2021). Em ambos os experimentos, o grupo com superexpressão de alfa-sinucleína A53T mostrou viabilidade celular bastante reduzida, o que retornou a níveis similares ao controle com o silenciamento de Miro-1 (figura 8).

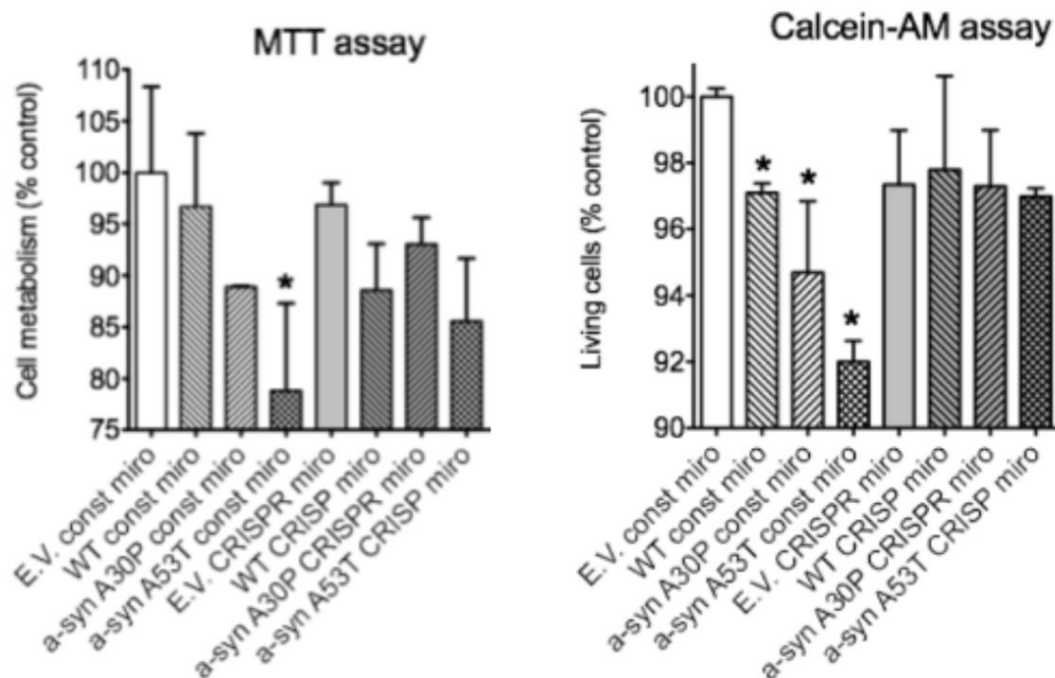


Figura 8. Análise dos níveis de viabilidade celular, através dos experimentos de MTT e calceína AM, em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos e transfectadas com plasmídeos de alfa-sinucleína e CRISPR/Cas9 para o silenciamento da proteína Miro-1.

### Resposta do sistema imune às transfecções e CRISPR Miro-1

A fim de se avaliar a possível ativação dos macrófagos, os meios condicionados das células SH-SY5Y diferenciadas, transfectadas e após processo de CRISPR foram adicionados às células THP-1. Na figura 9 é possível observar que o estímulo por 24 horas não foi suficiente para ativar as células THP-1. Como o controle positivo está acima, pode-se concluir que o ELISA em si foi bem-sucedido, mas que as células não liberaram quantidade suficiente de TNF- $\alpha$  para ser detectada pelo método. Uma das hipóteses levantadas é que não haviam muitas células nas placas de cultura de SH-SY5Y (confluência menor de 70%), o que pode ter liberado pouco estímulo para que a THP-1 se ativasse e produzisse níveis mais altos de TNF- $\alpha$ . Outra hipótese é que as células THP-1 possam ser menos sensíveis aos estímulos gerados pelas células neuronais derivadas das SH-SY5Y. No entanto, as células estimuladas por 48 horas apresentaram respostas acima do

controle negativo, o que pode indicar que a presença dos plasmídeos pode ter desencadeado uma resposta basal das células THP-1, já que até o grupo EV promoveu aumento na expressão de TNF- $\alpha$ .

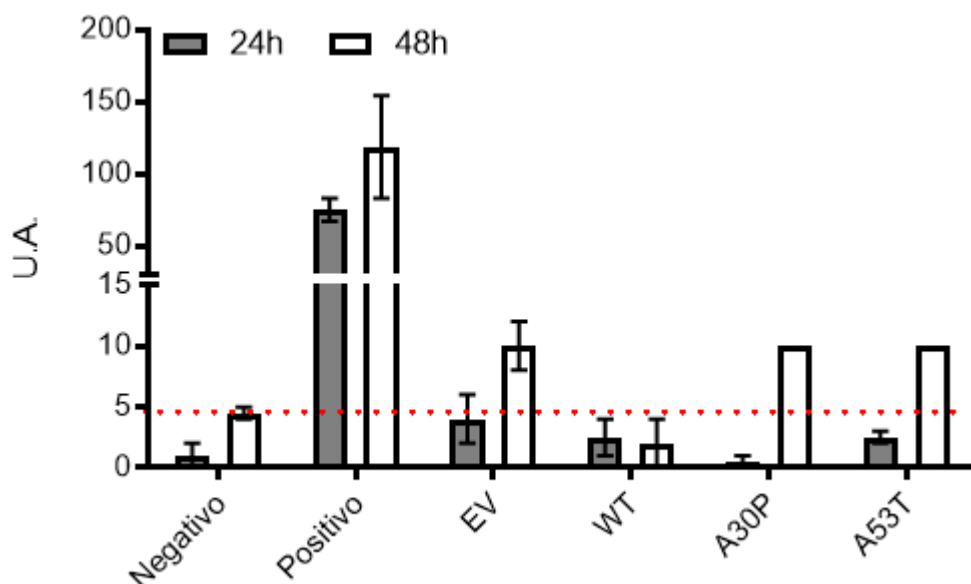


Figura 9. Análise do experimento ELISA do meio de cultura de células THP-1 após 24 e 48 horas de estímulo com o meio condicionado de células SH-SY5Y após transfecção e CRISPR. Analisado utilizando o Graphpad, 2 way ANOVA, Bonferroni post tests, n=2.

Também foi realizada quantificação de óxido nítrico após estímulo por 24 horas com os meios condicionados das células SH-SY5Y diferenciadas e transfectadas. Ainda que não apresente diferença estatística, é possível ver diminuição da síntese de óxido nítrico com a expressão reduzida de Miro-1 (figura 10).

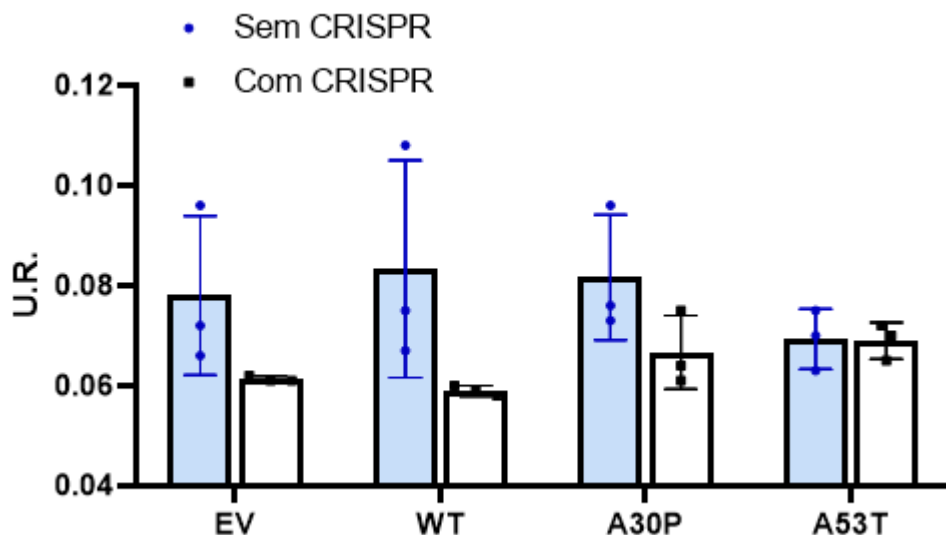


Figura 10. Análise da quantificação da síntese de óxido nítrico, após 24 horas de estímulo com o meio condicionado de células SH-SY5Y após transfecção e CRISPR. Analisado utilizando o Graphpad, 2 way ANOVA, Bonferroni post tests, n=2.

## 5. DISCUSSÃO

É possível afirmar que a superexpressão de alfa-sinucleína na forma selvagem e nas mutações, principalmente A53T, afeta a viabilidade celular. No entanto, o silenciamento da Miro-1 parece proteger as células do estresse e da consequente morte celular, como pode-se observar nas marcações de Western Blot (figura 7a e 7b) e no ensaio de MTT e de calceína AM (figura 8). Essa afirmação também corrobora com antigas observações e artigos do laboratório (MELO, 2022) que levaram à criação deste projeto.

O aumento na resposta UPR dos grupos CRISPR + A30P e CRISPR + A53T (figura 7c) pode estar relacionado com o papel essencial da Miro-1 para a célula e o estresse gerado por sua redução. Este aumento pode estar associado também à fase inicial dos efeitos da expressão de alfa-sinucleína mutante, em que há uma regulação compensatória das chaperonas envolvidas no correto enovelamento e encaminhamento das proteínas. Ressalta-se também que a diminuição da expressão de Miro-1 leva à diminuição de depósitos intracelulares de alfa-



sinucleína, o que pode estar relacionado à diminuição dos efeitos tóxicos desta proteína.

Além disso, ainda que seja apenas um primeiro resultado, é possível observar que a diminuição de Miro-1 também sugere redução da resposta pró-inflamatória no SNC, protegendo as células da toxicidade gerada pela neuroinflamação crônica, presente em pacientes da doença de Parkinson. Sugere-se a realização de experimentos adicionais utilizando outros modelos celulares para o estudo da neuroinflamação.

## **6. CONCLUSÕES**

Primeiro, gostaria de destacar que os resultados apresentados neste trabalho são o conjunto de observações pessoais e de colegas do laboratório.

Por fim, os resultados apontam para a confirmação da hipótese de que o silenciamento da proteína Miro-1, quando há superexpressão da alfa-sinucleína, pode proteger a célula do estresse do retículo endoplasmático, da ativação do sistema UPR, da neuroinflamação e, posteriormente, da apoptose.

## 7. REFERÊNCIAS

BRADFORD, M M et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, p. 248-254, 7 maio 1976. DOI 10.1006/abio.1976.9999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>. Acesso em: 7 fev. 2016.

CARDINALE, Antonella et al. Alpha-Synuclein as a Prominent Actor in the Inflammatory Synaptopathy of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 17 jun. 2021.

CHAUDHARY, P M et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, 1 dez. 1997. DOI 10.1016/s1074-7613(00)80400-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9430227/>. Acesso em: 28 set. 2022.

CHESELET, Marie-Francoise et al. A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics*, p. 297-314, 9 abr. 2012. DOI 10.1007/s13311-012-0104-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22350713/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

DANIAL, Nika N et al. Cell death: critical control points. *Cell*, p. 205-219, 23 jan. 2004. DOI 10.1016/s0092-8674(04)00046-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744432/>. Acesso em: 30 set. 2022.

DING, A. H., NATHAN, C. F. and STUERHR, D. J. (1998). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141, 2407-2412

EGAWA, Naohiro et al. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 $\alpha$ , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem*, p. 7947-7957, 11 mar. 2011. DOI 10.1074/jbc.M110.156430. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21131360/>. Acesso em: 26 out. 2021.

FERREIRA, Sara A et al. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Frontiers*, 6 ago. 2018. DOI 10.3389/fncel.2018.00247. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00247/full>. Acesso em: 18 set. 2022.

FRANCO-IBORRA, Sandra et al. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at?. *Neuroscientist*, 1 jun. 2016. DOI 10.1177/1073858415574600. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25761946/>. Acesso em: 27 set. 2022.

GROSSMANN, Dajana et al. The Emerging Role of RHOT1/Miro1 in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Front. Neurol.*, 1 set. 2020. DOI 10.3389/fneur.2020.00587. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.00587/full>. Acesso em: 9 fev. 2022.

HAMON, Rhys et al. Bushfire smoke is pro-inflammatory and suppresses macrophage phagocytic function. *Nature Scientific Reports*, 7 set. 2018. DOI 10.1038/s41598-018-31459-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31459-6>. Acesso em: 7 dez. 2021.

HARDING, H P et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 1 nov. 2000. DOI 10.1016/s1097-2765(00)00108-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11106749/>. Acesso em: 30 set. 2022.

HASHIDA, Koji et al. ATF6 $\alpha$  promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 6 abr. 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0047950. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23112876/>. Acesso em: 23 nov. 2021.

HETZ, Claudio et al. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, p. 703-719, 30 ago. 2013. DOI <https://doi.org/10.1038/nrd3976>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd3976>. Acesso em: 25 set. 2022.

JENNER, Edward. Calcein-AM is Cell-Permeable Fluorescent Dye used to Determine the Cell Viability. 2 nov. 2021. Disponível em: <https://www.immune-system-research.com/dye/calcein-am-is-cell-permeable-fluorescent-dye-used-to-determine-the-cell-viability/2021-11-02/>. Acesso em: 1 jul. 2019.

KIM, Changyoun et al. Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*, 4 jun. 2013. DOI 10.1038/ncomms2534. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23463005/>. Acesso em: 30 mar. 2021.

KOPRICH, James B et al. Animal models of  $\alpha$ -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nature Review Neuroscience*, p. 515-529, 18 set. 2017. DOI 10.1038/nrn.2017.75. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747776/>. Acesso em: 20 jul. 2022.

KORNMANN, Benoit et al. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 23 ago. 2011. DOI 10.1073/pnas.1111314108. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21511113/>. Acesso em: 1 out. 2022.

KORNMANN, Benoit et al. Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F. *Nature Communications*, 11 ago. 2015. DOI 10.1038/ncomms9015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms9015>. Acesso em: 1 set. 2016.

LI, Yunna et al. Targeting Microglial Alpha-Synuclein TLRs/NF-kappaB/NLRP3 Inflammasome Axis in Parkinson's Disease. *Frontiers in Immunology*, 8 out. 2021.

LIU, Song et al. Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*, 1 jan. 2012. DOI 10.1371/journal.pgen.1002537. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396657/>. Acesso em: 1 out. 2022.

LÓPEZ-DOMÉNECH, Guillermo et al. Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites. *Cell Rep*, 4 out. 2016. DOI 10.1016/j.celrep.2016.09.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27705781/>. Acesso em: 7 set. 2022.

MAYNE, Katie et al. Aging and Neurodegenerative Disease: Is the Adaptive Immune System a Friend or Foe?. *Front. Aging Neurosci.*, 23 set. 2020. DOI 10.3389/fnagi.2020.572090. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2020.572090/full>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MELO, Thaiany Q et al. Absence of Gem1 (mammalian Miro/Rhot) Mitigates Alpha-Synuclein Toxicity in a Yeast Model of Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16 jul. 2022.

MERCADO, Gabriela et al. An ERcentric view of Parkinson's Disease. *Trends Mol Med*, p. 165-175, 19 mar. 2013. DOI 10.1016/j.molmed.2012.12.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352769/>. Acesso em: 15 jul. 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, p. 55-63, 16 dez. 1983. DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>. Acesso em: 7 jan. 2016.

NAKAGAWA, Tadashi et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, p. 98-103, 6 jan. 2000. DOI Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10638761/#affiliation-1>. Acesso em: 30 set. 2022.

PINTO, Camila B. EFEITO da desregulação da via UPR sobre a expressão da ciclina A1 em linfócitos B humanos. 2012. Dissertação (Pós Graduação - Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012. DOI 10.11606/D.42.2012.tde-30012013-103651. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-30012013-103651/pt-br.php>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ROUSSEL, Benoit D et al. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol*, p. 105-118, 12 jan. 2013. DOI 10.1016/S1474-4422(12)70238-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23237905/>. Acesso em: 15 jul. 2021.

SILVA, Robert M et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J Neurochem*, p. 974-986, 5 nov. 2005. DOI 10.1111/j.1471-4159.2005.03428.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16135078/>. Acesso em: 27 jul. 2021.

SOMMER, Annika et al. Th17 Lymphocytes Induce Neuronal Cell Death in a Human iPSC-Based Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, 6 jun. 2019. DOI 10.1016/j.stem.2019.04.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31173705/>. Acesso em: 11 fev. 2022.

WALTER, Peter et al. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 25 nov. 2011. DOI 10.1126/science.1209038. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22116877/>. Acesso em: 29 set. 2021.

YELLEN, Gary et al. Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J Cell Biol*, 2 jul. 2018. DOI 10.1083/jcb.201803152. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29752396/>. Acesso em: 6 set. 2022.

---

Data e assinatura da aluna

---

Data e assinatura da orientadora