



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus **DE SOBRAL**
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AURILENE GOMES CAJADO

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES TRANSCRICIONAIS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO NEURODEGENERATIVO PROVOCADAS POR 6-
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)**

SOBRAL
2015

AURILENE GOMES CAJADO

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES TRANSCRICIONAIS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO NEURODEGENERATIVO PROVOCADAS POR 6-
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal
do Ceará – UFC, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas
Orientador: Rodrigo Maranguape Silva
da Cunha

Co-orientador: Ricardo Basto Souza

**SOBRAL
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- C139a Cajado, Aurilene Gomes.
 Análise das alterações transcricionais envolvidas no processo neurodegenerativo provocadas por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). / Aurilene Gomes Cajado. – 2016.
 58 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2016.
 Área de Concentração: Macromoléculas.
 Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.
 Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Basto Souza.
1. Doença de Parkinson. 2. Oxidopamina. 3. MiRNA. I. Título.

AURILENE GOMES CAJADO

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES TRANSCRICIONAIS ENVOLVIDAS NO
PROCESSO NEURODEGENERATIVO PROVOCADAS POR 6-
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal
do Ceará – UFC, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas

Aprovada em: 30/09/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Orientador)
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Prof. Dr. Ricardo Basto Souza (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
Instituto Superior de Tecnologia Aplicada- INTA

*Ao meu mestre e pai
Luiz G. Gomes, dedico.
(in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, JC e Maria Santíssima com todos seus anjos e santos por estarem sempre comigo e agirem na minha vida de forma silenciosa e misteriosa me levantando quando eu insistia em cair e me lembrando por quais motivos deveria lutar. Agradeço pela luz e amor de Deus em minha vida que permite que eu jamais siga sozinha.

À minha família, em especial a minha tia Ângela e minha avó/mãe Maria, pela educação, amor e apoio incondicional. À Tayane, que é a parte mais doce da minha vida. À minha mãe Socorro, minhas tias Luciene e Anete e ao 'tio' Henrique. À minha afilhada Dagylla, ao meu irmão Daniel e aos primos Leonardo, Jorge e Nayane bem como seus filhos Carlos Eduardo e Elizabeth. Agradeço pelo apoio e por fazerem parte da minha vida.

Ao professor Rodrigo Maranguape pela oportunidade de estágio no seu grupo de pesquisa e por ser o orientador neste trabalho.

Ao professor Ricardo Basto pela co-orientação, por ser gentilmente atencioso aos problemas que ocorreram durante o processo de desenvolvimento deste trabalho, por seu apoio ativo nas correções e sugestões para o aprimoramento deste. Foi um privilégio conviver um profissional como você.

Ao Rauzilto que além de amigo contribuiu de forma imprescindível para esse trabalho, agradeço por todas as vezes que me esclareceu dúvidas e me apontou sugestões para o melhoramento deste trabalho.

Ao professor João Garcia, por fazer parte da banca examinadora e por suas sugestões oportunas para a finalização desta dissertação.

Aos amigos Jedson Aragão, Nayane Hardy e Mônica Valéria por todos os momentos de alegrias, tristezas, comilanças e confidências compartilhadas. Agradeço pelo encorajamento e conselhos nos momentos de dúvida que foram fundamentais para minha superação.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular, do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) que me ajudaram direta e indiretamente na realização desse trabalho entre eles ao amigo Paulo de Tarso por sua gentileza e ajuda. Em especial, agradeço ao Daniel de Brito, pelos primeiros ensinamentos no âmbito da pesquisa, por sua amizade e incentivo.

As meninas do AP103 e agregados, Brenda Lia, Flávia, Tarciana, Isabela, Beatriz, Gleiciane, TiaRay, pela amizade, por todo apoio e pela convivência agradável, foram anos maravilhosos e muito divertidos.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará, por contribuir na minha formação profissional.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Aceita as surpresas que transformam teus planos, derrubam teus sonhos, dão rumo totalmente diverso ao teu dia e, quem sabe, à tua vida. Não há acaso. Dá liberdade ao Pai, para que Ele mesmo conduza a trama dos teus dias.”

Dom Helder Câmara

“Quem como Deus? - Mika-El.”

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é o distúrbio do movimento neurodegenerativo mais comum que tem prevalência em função da idade. Esta enfermidade é considerada uma desordem multifatorial provocada por mutações genéticas e fatores ambientais que influenciam a progressão da doença. A maioria dos casos de DP é esporádico e idiopático, provavelmente resultante de uma combinação de herança poligênica, exposições ambientais e interações gene/ambiente complexas, provocando disfunção neural lenta, combinado com o envelhecimento. Apesar de décadas de estudos intensivos, mecanismos fisiopatológicos e moleculares dessa doença ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente nos modelos animais. Contudo, a Biologia Molecular têm propiciado avanços significativos no entendimento das vias envolvidas no processo degenerativo. Isso se deve ao surgimento de técnicas de sequenciamento e ao aperfeiçoamento contínuo de algoritmos e programas de Bioinformática. Atrélado a isso, nesse estudo, objetivou-se identificar alterações transcricionais relacionadas à micro RNAs não codificadores (miRNAs) e *Splicing* alternativo em *Striatum* de *Rattus norvegicus albinus* submetidos ao modelo parkinsoniano induzido por injeção unilateral de 6-OHDA (6-hidroxidopamina). A análise foi feita a partir de dois grupos (n=10): grupo Sham, submetido ao estresse cirúrgico, e o grupo 6-OHDA, submetido ao modelo da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. A partir da confirmação do parkinsonismo através dos testes comportamentais, foi extraído o RNA seguido pelo sequenciamento dos transcritos usando a plataforma Illumina Hi-Seq2000. As análises *in silico* foram feitas pelo cálculo da expressão relativa por FPKM (*reads* por quilobase de transcritos por milhões de *reads* mapeados) que normalizou os genes encontrados e mensurou a contagem dos *reads* obtidos. A partir desses dados, foi feita a análise de expressão relativa (FPKM relativo) de miRNAs com diferenças qualitativas e dos *splicings* variantes do gene BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) que apresentaram valores de expressão menores que 0,25 e maiores que 4. No presente estudo, foram identificados 62 miRNAs e 96.970 isoformas com leituras mapeadas nos grupos Sham e 6-OHDA. Dentre os principais achados obtidos, sugere-se, o envolvimento dos miRNAs, Mir6314 e Mir6333, no mecanismo de neurodegeneração induzidos por 6-OHDA. Adicionalmente, foram verificadas as variantes transcricionais do gene BDNF e o nível de expressão destas. Percebeu-se que, independente do produto proteico resultante, o nível de expressão transcricional de BDNF pode variar e, um dos fatores que contribuem para a essa diferença, são as regiões não codificadoras, como a região 5'UTR, sugerindo que os miRNAs podem atuar nesta região. Portanto, esses resultados representam achados inovadores para a área da neurotranscriptômica, com foco para o modelo parkinsoniano induzido por 6-OHDA.

PALAVRAS- CHAVE: Doença de Parkinson, transcriptoma, miRNA, *Splicing* alternativos, FPKM relativo

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disorder of movement which has precedence to function of the age. This disease is considered a multifactorial disorder caused by genetic mutations and environmental factors that influence disease progression. Most cases of idiopathic PD are sporadic and probably resulting from a combination of polygenic inheritance, environmental exposures and gene/environment interactions complex, causing neural dysfunction combined with slow aging. Despite decades of intensive studies, pathophysiological and molecular mechanisms of this disease are not yet fully understood, especially in animal models. However, molecular biology have led to significant advances in the understanding of the pathways involved in the degenerative process. This is due to the emergence of sequencing techniques and continuous improvement of algorithms and bioinformatics programs. Coupled to this, this study aimed to identify transcriptional changes related to micro RNAs noncoding (miRNAs) and Alternative Splicing in striatum of *Rattus norvegicus Albinus* submitted to Parkinsonian model induced by unilateral injection of 6-OHDA (6-hydroxydopamine). The analysis was made from two groups (n = 10): one sham group underwent the surgical stress and the second was made to the model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA. From the confirmation of Parkinsonism through behavioral tests, it was extracted the RNA followed by sequencing of transcripts using the Illumina Hi-Seq2000 platform. Analyses in silico were made by calculating the relative expression by FPKM (reads per kilobase transcripts per million mapped reads) that normalized genes found and measured the count obtained reads. From these data, the analysis of relative expression was made (FPKM relative) of miRNAs with qualitative differences and splicings variants of the BDNF gene (Brain Derived Neurotrophic Factor) which showed lower expression values than 0.25 and greater than 4. In the present study, we identified 62 miRNAs and 96,970 readings isoforms mapped in 6-OHDA and sham groups. Among the main findings obtained, it is suggested, the involvement of miRNAs, Mir6314 and Mir6333 in neurodegeneration mechanism induced by 6-OHDA. In addition, it was verified the transcript variants of BDNF gene and the expression level thereof. It was noticed that, regardless of the resulting protein product, the level of BDNF transcriptional expression can vary, and one of the factors that contribute to this difference are the noncoding regions such as 5'UTR region, suggesting that miRNAs can work in this area. Therefore, these results represent innovative findings in the area of neurotranscriptomic, focusing to parkinsonian model induced by 6-OHDA.

KEYWORDS: Parkinson's disease, transcriptome, miRNA, alternative *splicing*, relative FPKM

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Alinhamento dos aminoácidos referente às isoformas de BDNF	44
Figura 2 -	Predição do peptídeo sinal de isoformas do gene BDNF	45
Figura 3 -	Alinhamento dos nucleotídeos referente às isoformas de BDNF	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Toxinas usadas em modelos de DP e o processo patológico envolvido	24
Tabela 2 -	Genética Molecular dos principais genes associados à Doença de Parkinson	28
Tabela 3 -	Modulação epigenética provocado por toxinas ambientais e drogas terapêuticas em Doença de Parkinson	29
Tabela 4 -	miRNA diferencialmente expressos nos grupos Sham e 6-OHDA	42
Tabela 5 -	Análise dos <i>splicing</i> variantes do gene BDNF, expressão relativa e suas distribuições nos grupos Sham e 6-OHDA	42

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Doença de Parkinson
SNC	Substância negra, <i>pars compacta</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ncRNA	RNA não condificador
RNA _m	RNA mensageiro
6-OHDA	6-hidroxidopamina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
L-dopa	Isômero levógiro da diidroxifenilalanina
D1	Receptor do circuito direto (ativador)
D2	Receptor do circuito indireto (inibidor)
DLC	Demência com Corpos de Lewy
MAS	Atrofia de Múltiplos Sistemas
DCB	Degeneração Corticobasal
PSP	Paralisia Supranuclear Progressiva
GABA	Ácido gama-aminobutírico
MAOBI _s	Inibidores de Monoamina Oxidase tipo B
DDCI _s	Inibidores da Dopamina Descarboxilase
COMTI _s	Inibidores da catecol-O-metiltransferase
3-OMD	3-O-metildopa
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
DAT	Transportadores de membrana de dopamina
NAT	Transportadores de membrana noradrenalina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
SNCA	Gene que codifica a proteína pré-sináptica α -sinucleína
LRRK2	Leucina Rica em Repetições Cinase 2
EIF4G1	Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 4G1
HDAC	Inibidores como histonas desacetilases
DNMT _s	DNA metiltransferase
UTR	Região não codificadora
pb	Pares de base
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region in gene 8</i>

Pré-RNA	Transcritos primários de RNA
GTP	Trifosfato de Guanosina
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
AGO1	Argonalta tipo 1
AGO2	Argonalta tipo 2
ATP	Adenosina trifosfato
Corpos P	Corpos de processamento
Pitx3	<i>Pituitary homeobox 3</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
snRNPs	Pequena ribonucleoproteína nuclear
snRNAs	Pequenos RNAs nucleares
AMPA	Receptor ionotrópico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
FPKM	<i>Reads</i> por kilobase de transcritos por milhões de <i>reads</i> mapeados
i.p.	Intraperitoneal
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
AP	Antero-posterior
V	Vertical
L	Médio-lateral
μL	Microlitro
μg	Micrograma
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
°C	Graus Célcus
DEPC	Dietilpirocarbonato
nm	nanometro
Sham	Controle negativo
cDNA	DNA complementar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
AB	Absorbância
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração
N-terminal	Extremidade da cadeia polipeptídica amino-terminal

NM	Identificação de mRNAs pelo NCBI
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Células da Glia
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Epidemiologia e características clínicas da Doença de Parkinson	17
2.2	Patologia	19
2.3	Tratamentos	21
2.3.1	Tratamento farmacológico	22
2.3.2	Tratamentos cirúrgicos	23
2.3.3	Fisioterapia e terapia ocupacional	23
2.4	Modelos experimentais	24
2.4.1	O modelo de 6-OHDA	25
2.5	Pesquisa genética	26
2.5.1	Epigenética	28
2.5.1.1	Pequenos transcritos de ncRNA (microRNA) e fatores associados à DP	30
2.5.2	Processo de <i>splincing</i> alternativo	32
2.5.3	Análises Transcriptômicas como ferramenta na investigação de patologias	34
3	OBJETIVO	36
3.1	Geral	36
3.2	Específicos	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Animais	37
4.2	Indução do Modelo de Doença de Parkinson através de injeção unilateral de 6-OHDA em ratos	37
4.3	Confirmação do parkinsonismo e dissecação do striatum (corpo estriado)	38
4.4	Extração do RNA total	38
4.4.1	Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total	38
4.5	Análises Transcriptômicas	38
4.5.1	Sequenciamento do RNA utilizando a plataforma Illumina Hi-Seq2000	39
4.6	Análises <i>in silico</i>	39
4.6.1	Mapeamento, contagem das leituras e classificação	39
4.6.2	Alinhamento múltiplo de sequências	40

4.6.3	Predição do peptídeo sinal	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Confirmação do parkinsonismo e verificação da qualidade e quantidade dos RNAs extraídos do Corpo Estriado de Ratos	41
5.2	Confirmação do Sequenciamento dos RNA pela Próxima Geração de Sequenciamento (NGS)	41
5.3	Perfil de miRNA em animais parkinsonianos	41
5.4	Análise de <i>splicing</i> variantes e expressão relativa nos grupos Sham e 6-OHDA	42
5.5	Alinhamento das sequências de aminoácidos e predição do peptídeo sinal	42
5.6	Alinhamento das sequências de nucleotídeos e análise das regiões não codificadoras (5'e 3'UTR)	46
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	50
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é o distúrbio do movimento neurodegenerativo com maior prevalência em função da idade (TRINH, FARRER, 2013). Em 1817, o médico James Parkinson publicou “Essay on the Shaking Palsy” e pela primeira vez descreveu as características gerais da patologia que atualmente é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a Doença de Alzheimer (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003).

O Mal de Parkinson é considerado uma desordem multifatorial provocada por mutações genéticas e fatores ambientais que influenciam a progressão da doença. Sua etiopatogenia é caracterizada principalmente pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nas fibras nigroestriatais na região da substância negra, *pars compacta*, (SNc) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A DP tem distribuição universal, estima-se que cerca de 6 milhões de pessoas no mundo são afetadas por essa enfermidade, provocando gastos que chegam a bilhões de dólares (BOVÉ; PERIER, 2012). No Brasil, o Ministério da Saúde estima que cerca de 200 mil casos sejam calculados, com predominância nas regiões Sudeste e Sul (MS, 2014). Esses números tendem a aumentar de acordo com o aumento da expectativa de vida da população, devido o processo de envelhecimento está relacionado com o aparecimento desta enfermidade (VALADAS et al., 2014).

Apesar do número crescente de estudos relacionados com o Mal de Parkinson, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a essa patogênese permanecem obscuros (JANKOVIC, 2008) e, conseqüentemente, os métodos utilizados no tratamento apenas minimizam os sintomas a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essa enfermidade, portando atualmente não há cura para DP (BEAL, 2010).

Vários modelos *in vitro* e *in vivo* são usados na tentativa de reproduzir os efeitos provocados pela DP. Apesar de décadas de estudos intensivos, mecanismos fisiopatológicos e moleculares dessa doença ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente nos modelos animais (BETARBET et al., 2002). Contudo, a Biologia Molecular têm propiciado avanços significativos no entendimento das vias envolvidas no processo degenerativo.

O surgimento de técnicas de sequenciamento tem permitido um crescente aumento no número de dados de forma rápida e segura, auxiliando no mapeamento de genes envolvidos no processo patogênico, assim como, na obtenção do transcriptoma e proteoma submetidos as mais diversas condições. Adicionalmente, estudos epigenéticos têm contribuído para esclarecer lacunas de hereditariedade que envolve essa patogenia (MULLIN; SCHAPIRA, 2015). Tais exemplos sugerem a diversidade de conhecimentos que podem ser gerados a partir da análise molecular, contribuindo para compreensão de diversas patologias entre elas as neurológicas. Desse modo, vários grupos de pesquisas estão motivados a utilizarem tais ferramentas para obtenção de dados complementares que auxiliem no esclarecimento de diversos processos moleculares.

Atrelado a isso, nesse estudo, daremos ênfase nos pequenos transcritos de ncRNA (microRNA) e sua relação com *splicing* alternativo em modelo parkinsoniano induzido por injeção unilateral de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) no *striatum* de *Rattus norvegicus albinus* a fim de obter um perfil transcriptômico e identificar potenciais mecanismos regulatórios associados ao processo neurodegenerativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia e características clínicas da Doença de Parkinson

A DP tem distribuição universal, sem distinção de classe social. Estima-se que em 2030 o número de pessoas acometidas por essa enfermidade seja de 8,7 a 9,7 milhões no mundo (WIRDEFELDT et al., 2011; BAUMANN, 2012). No Brasil, cerca de 200 mil casos são calculados, com predominância nas regiões Sudeste e Sul (MS, 2014). A média de pacientes acometidos pela DP nos países industrializados é de aproximadamente 0,3%. Essa porcentagem aumenta de acordo com a idade, cerca de 1% em pessoas com mais de 60 anos, subindo para 4-5% em indivíduos com 85 anos. A idade média de início é de 60 anos, contudo há casos de pacientes onde a doença tem início precoce, e se desenvolve antes dos 50 anos. A DP é prevalente em homens com proporções que variam em até 3:1 com relação às mulheres. Essa diferença pode ser atribuída aos efeitos protetores do estrogênio e genes de susceptibilidade recessiva no cromossomo X (DEXTER; JENNER, 2013; TRINH; FARRER, 2013; WIRDEFELDT, et al., 2011). Tipicamente a DP é uma doença crônica e lentamente progressiva, com duração média de 15 anos após o diagnóstico, contudo, frequentemente há sobrevida em até duas décadas ou mais (ELBAZ, 2003 *apud* SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

DP é considerada uma desordem multifatorial provocada por mutações genéticas e fatores ambientais que influenciam a progressão da doença. A maioria dos casos é esporádico e idiopático provavelmente resultante de uma combinação de herança poligênica, exposições ambientais e interações gene/ambiente complexas, provocando disfunção neural lenta combinado com o envelhecimento. Na minoria dos casos, a DP pode ser herdada por distúrbios mendelianos (LANDGRAVE-GÓMEZ et al., 2015; GAO et al., 2011; NUYTEMANS et al., 2010). Algumas das interações epidemiológicas resultante de fatores ambientais são: abuso de drogas intravenosas tais como o contaminante da heroína, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP); exposição ao pesticida rotenona e ao herbicida paraquat. Além da exposição ocupacional a metais pesados como o manganês e ferro tem sido sugerido como fator que contribuem para a incidência da DP (TORRÃO et al., 2012; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011). Muitos estudos têm avaliado fatores habituais e dietéticos, e ambos os tabagismo e consumo de café tem demonstrado associação com a redução da susceptibilidade à DP (HERNÁN et al., 2002). Vale ressaltar, no entanto, a associação

epidemiológica não implica necessariamente na casualidade, e o papel dos gânglios da base em mecanismos de controle e recompensa por impulso pode predispor indivíduos com DP a serem menos susceptíveis aos comportamentos (SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

O diagnóstico clínico característico para a DP está relacionado com a função motora. As principais características são tremor em repouso, bradicinesia, rigidez, instabilidade postural, hipocinesia, “congelamento” durante os movimentos. A princípio os sintomas são assimétricos e passam a ser bilaterais com a progressão da doença. Outras características motoras incluem alterações na percepção visual, hipomimia (diminuição ou ausência de expressão), comprometimento da fala como hipofonia (voz cada vez mais suave) ou palilalia (repetição de palavra ou frase) e mudança de marcha com festinação (o passo é acelerado progressivamente para evitar queda para frente) (THOMAS; BEAL, 2011; DEXTER; JENNER, 2013; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011). Adiante serão detalhadas as causas para os distúrbios motores e sua relação com a perda nas células dopaminérgicas na região dos núcleos da base. Além da farmacoterapia de reposição de dopamina (L-dopa) que tem apresentado eficácia no tratamento de sintomas motores.

Apesar das características motoras serem um dos critérios essenciais no diagnóstico clínico da DP e representarem uma importante fonte de incapacidade provocada por essa patologia, esta doença tem um impacto mais amplo sobre o sistema nervoso afetando o sistema não motor. Alguns dos sintomas não motores incluem olfato prejudicado, distúrbios do sono, prisão de ventre, disfunção autônoma (incontinência urinária) e manifestações neuropsiquiátricas (depressão, alucinações e demência) (BEITZ, 2014; DEXTER; JENNER, 2013; LUNDY-EKMAN, 2008). De acordo com a progressão da doença os sintomas tornam-se proeminentes, provavelmente devido à propagação da patologia para além dos núcleos da base comprometendo outros sistemas cerebrais. Alguns autores consideram que os sintomas não motores antecedem as alterações motoras ou ocorrem em paralelo com a deficiência motora e, dessa forma buscam a partir do progresso futuro neste âmbito utilizar estratégias neuroprotetoras além do provável diagnóstico precoce (SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

2.2 Patologia

A etiopatogenia da DP é caracterizada principalmente pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nas fibras nigroestriatais na região da substância negra, *pars compacta*, (SNc) provocando depleção de neuromelanina e inclusões citoplasmáticas denominadas Corpos de Lewy constituídas por agregados proteicos, formados principalmente de α -sinucleína. As causas da DP ainda não são completamente compreendidas, havendo controvérsias em algumas discussões, a saber: o papel dos Corpos de Lewy no processo patológico (LANDGRAVE-GÓMEZ et al., 2015; EXNER et al., 2012; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Na DP, a disfunção na SNc resulta na diminuição de dopamina, esta projeta-se principalmente para o estriado, composto pelo caudado e putâmen. Dessa forma o circuito motor diminui a atividade moduladora que as fibras nigroestriatais exercem sobre as vias direta e indireta, resultando em aumento da inibição dos núcleos talâmicos. Em resumo, o circuito motor origina-se nas áreas motoras do córtex e na área somestésica e projeta-se para o putâmen de maneira somatotópica. A partir do putâmen, o circuito pode seguir por duas vias: direta e indireta. Na DP há perda de aferência dopaminérgica para o estriado levando à diminuição de atividade da via direta, onde a dopamina tem ação excitatória, e o aumento na via indireta, onde a dopamina tem ação inibitória. A diferença das ações da dopamina nos dois circuitos deve-se ao fato de que no circuito direto o receptor D1 é ativador e no circuito indireto D2 é inibidor. Essas alterações levam ao aumento na atividade do pálido medial e consequente aumento da inibição dos neurônios talamocorticais, ocasionando os sintomas hipocinéticos característicos da doença (DEXTER; JENNER, 2013; SHULMAN, JAGER; FEANY, 2011; MACHADO; HAERTEL, 2013). A descoberta da interferência da dopamina no circuito motor inspirou a terapêutica para a DP a guisa de exemplo aumentando o teor de dopamina nas fibras nigroestriatais e reduzindo a excitação excessiva do pálido medial que serão descritos com mais detalhes adiante.

Em paralelo aos sintomas motores, tem sido reconhecido que a proteína α -sinucleína desempenha um papel relevante nas manifestações não motoras. Inclusões citoplasmáticas e eosinofílicas, de forma arredondada e alongada, são encontradas em grande parte do neuroeixo. Além de ser tipicamente encontrada na substância negra, a α -sinucleína tem sido descrita nos nervos periféricos cutâneos, sistema nervoso

autonômico, no sistema nervoso entérico, na medula espinhal, no tronco cerebral inferior (núcleo motor dorsal do nervo vago), estruturas límbicas (amígdala e hipocampo) e neocórtex (SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011). As células vulneráveis às inclusões não se limitam aos neurônios dopaminérgicos, estes estão presentes também nos neurônios noradrenérgicos (lócus cerúleo), projeções serotoninérgicos (núcleos de rafe) e células acetilcolinérgicas (no núcleo basal de Meynery) (FERRER, 2011; MELO; BARBOSA; CARAMELLI, 2007).

Braak e colaboradores (2003) sugerem uma ordem ascendente nas modificações patológicas da DP. Através de marcadores patológicos da DP como os Corpos de Lewy e placas neuríticas de Lewy imunopositivas a α -sinucleína, além da degeneração neural propondo a ascensão da patologia em 6 estágios (FILHO, 2009). Nesse estudo, os autores demonstraram que as lesões inicialmente ocorrem em áreas do tronco encefálico e no núcleo olfatório anterior e, com a progressão da patologia as áreas do mesencéfalo, diencéfalo e neocórtex são afetados (FERRER, 2010). O padrão anatômico proposto por Braak propõe a deposição de α -sinucleína inicial no núcleo motor dorsal do vago e/ou zona intermediária reticular e o núcleo olfativo anterior (estágio 1), seguido pelas lesões no núcleo caudal da rafe, na formação reticular e no locus coeruleus (estágio 2). Na fase 3 são encontrados os primeiros corpos de Lewy na porção compacta da substância negra e nos núcleos magnocelulares basais do prosencéfalo. A progressão da doença segue acometendo as regiões do mesocórtex temporal e allocórtex, a princípio, preservando o neocórtex (estágio 4). A partir do estágio 5 as alterações neuropatológicas progridem do mesocórtex temporal para o neocórtex pré-frontal. Na etapa mais avançada (estágio 6), estão difusamente acometidas as áreas corticais primárias, destacando-se as pré-motoras, motoras e sensitivas (ROSSO; NICARETTA; MATTOS, 2008; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011; BRAAK et al., 2003). Embora seja reconhecido que haja divergências nesse padrão para alguns casos de DP, atualmente ele é amplamente aceito ao que se refere à disseminação da DP (DEXTER; JENNER, 2013).

A DP é a principal, mas não a única causa de Parkinsonismo. Os transtornos parkinsonianos incluem distúrbios de etiologia tóxica, doenças neurodegenerativas primárias, infecciosa ou traumática (LUNDY-EKMAN, 2008). As semelhanças patológicas dessas enfermidades podem contribuir para uma maior compreensão da DP. Algumas doenças associadas a α -sinucleinopatias incluem a demência com corpos de Lewy (DCL) e atrofia de múltiplos sistemas (AMS). A DCL é caracterizada por

parkinsonismo e desenvolvimento precoce de demência com alucinações visuais. Em síntese os Corpos de Lewy são acumulações anormais de α -sinucleína nos neurônios (MCKEITH, 2005; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011). Patologicamente, a AMS é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta os sistemas dos núcleos da base, cerebelar e autônomo e o córtex cerebral. Dentre as características do parkinsonismo na AMS incluem os movimentos lentos e a rigidez (LUNDY-EKMAN, 2008).

Além das α -sinucleínopatias, outros distúrbios frequentemente relacionados com parkinsonismo são coletivamente referidos como Taupatias, tais enfermidades são provocadas devido às inclusões intracitoplasmáticas da proteína Tau associadas a α -sinucleína. A degeneração corticobasal (DCB) e a paralisia supranuclear progressiva (PSP) são exemplos de taupatias clinicamente difíceis de distinguir da DP nos primeiros estágios da doença (BALLATORE; LEE; TROJANOWSKI, 2007; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

Em alguns casos o Parkinsonismo apresenta apenas perda de células da substância negra e gliose, com ausência de inclusões proteicas. Esse padrão é típico para os distúrbios mendelianos que serão detalhados adiante. Outro fator que causa sintomas parkinsonianos está relacionado com a doença vascular cerebral, apesar de não haver condições degenerativas ocorre perda de células relacionadas com a esquizofrenia e gliose envolvendo os gânglios basais. Entender patologias que não possuem ação de α -sinucleína nas síndromes parkinsonianas podem fornecer importantes informações sobre os mecanismos de vulnerabilidade das células do sistema nervoso e por consequência obter uma maior compreensão da DP que refletirão em metodologias de tratamento mais eficazes (SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

2.3 Tratamentos

A DP apresenta caráter neurológico, evolutivo e crônico. Atualmente, uma série de procedimentos é utilizada na terapêutica, estes incluem o incremento de drogas, procedimentos invasivos, fisioterapia e terapia ocupacional (LUNDY-EKMAN, 2008). Os métodos utilizados no tratamento apenas minimizam os sintomas a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essa enfermidade, portando atualmente não há cura para DP (BEAL, 2010). Apesar do grande número de pesquisas, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à patogênese da DP permanecem obscuros (JANKOVIC, 2008). Isto é, em parte, devido ao fato de que a maioria dos

casos serem idiopáticos e provavelmente refletirem uma profunda interação entre idade, predisposição genética e fatores ambientais conforme foi detalhado anteriormente (SINGLETON; FARRER; BONIFATI, 2013).

2.3.1 Tratamento farmacológico

De acordo com o mencionado previamente, a disfunção de dopamina nas fibras nigroestriatais provocada pela DP cessa a atividade moduladora que essas fibras exercem sobre as vias direta e indireta, resultando no aumento da inibição dos núcleos talâmico. A partir dessa descoberta foi proposta uma terapêutica que vise aumentar o teor de dopamina nas fibras nigroestriatais (MACHADO; HAERTEL, 2013).

A maioria dos mecanismos farmacológicos age de forma complexa no estriado. As vias aferentes dopaminérgicas da substância negra, as vias aferentes glutamatérgicas do córtex cerebral e tálamo além dos interneurônios colinérgicos do corpo estriado convergem-se para influenciar a atividade dos principais neurônios eferentes do estriado, sensíveis a GABA nos neurônios espinhosos médios. No estriado, os antagonistas dopaminérgicos e os Inibidores de Monoamina Oxidase tipo B (MAOBIs) tem efeitos dopaminérgicos no controle da DP. Além destes, drogas acessórias como os anticolinérgicos e Amantadina auxiliam no tratamento junto à Levodopa (CONNOLLY; LANG, 2014).

A princípio, a inserção de dopamina no tratamento para DP não obteve sucesso devido à necessidade de grandes quantidades desta amina para atravessar a barreira hematocefálica e, nestas concentrações muito altas esta apresenta efeito tóxico para o restante do organismo. Entretanto, o isômero levógiro da diidroxifenilalanina (L-Dopa também conhecido como Levodopa) atravessa com maior facilidade a barreira, é captado pelos neurônios e fibras dopaminérgicas. Atualmente, é uma farmacoterapia largamente utilizada na reposição de dopamina, sendo eficaz no tratamento inicial ao que se refere a diminuição dos sinais motores da doença (MACHADO; HAERTEL, 2013).

O processo inicia-se com a Levodopa transportada pela corrente periférica, esta atravessa a barreira hematocefálica, sofre descarboxilação e converte-se em dopamina, substituindo o neurotransmissor deficiente na DP. Fora desta barreira, na circulação periférica, inibidores da dopamina descarboxilase (DDCIs) bloqueiam a conversão de

Levodopa em dopamina e inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMTIs) bloqueiam sua degradação a 3-O-metildopa (3-OMD) (CONNOLLY; LANG, 2014; CARDOSO et al., 2006).

Apesar de a Levodopa ser o agente mais importante para o tratamento de Parkinson há controvérsias sobre quando introduzir esta droga, isso se deve aos seus efeitos colaterais. Após uso prolongado, o uso desse fármaco pode provocar discinesias e complicações psiquiátricas. As flutuações motoras podem assumir formas *wearing-off* ou redução do efeito da levodopa, e *on-off*, alterações motoras não ligadas ao fármaco (CARTA; BEZARD, 2011).

Por outro lado, há um grande interesse em tratamentos não dopaminérgicos para a melhora das funções motoras sem o risco das complicações associadas com a Levodopa, vários grupos de drogas estão em estudo e podem ser classificadas como promissoras neuroprotetoras (SCHAPIRA et al., 2006).

2.3.2 Tratamentos cirúrgicos

A neurodegeneração parkinsoniana produz alterações funcionais nas vias direta e indireta do cérebro, desta forma, certas regiões tornam-se hiperativas em detrimento de outras que são excessivamente inibidas. Quando a terapêutica medicamentosa é insatisfatória são adotados procedimentos invasivos, estes incluem estimulação encefálica profunda, transplante neural e cirurgia destrutiva (ESSELINK et al.; 2009; LUNDY-EKMAN, 2008).

2.3.3 Fisioterapia e terapia ocupacional

A inserção de exercícios físicos como um terapêutico coadjuvante na DP melhoram as capacidades funcionais, de movimento e inclusive o estado emocional dos pacientes (KOLK; KING, 2013).

Estudos sugerem que o exercício físico modifica o funcionamento do encéfalo ao disponibilizar cerca de 7-18% de íons cálcio a mais, o que estimula a síntese de dopamina. Além de poder ampliar os níveis do neuroprotetor BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no estriado. O treinamento com sobrecarga parece estimular a neurogênese e plasticidade neuronal e a atividade sensorio-motora intensa tem papel importante na neurodegeneração. Pacientes com DP que se mantêm ativos

asseguram níveis mais prolongados de independência (KAVIRAJA; CHEN, 2013; BELCHIOR, 2014).

2.4 Modelos experimentais

As desordens neurológicas em humanos podem ser reproduzidas experimentalmente em modelos animais através de procedimentos que mimetizam seus eventos patológicos e comportamentais (BORTOLANZA, 2010). Além de fornecer uma ferramenta indispensável para a pesquisa básica, modelos baseados em mecanismos patogênicos específicos podem conduzir ao desenvolvimento de agentes neuroprotetores para a DP a fim de parar a progressão da doença ou torná-la mais lenta (DUTY; JENNER, 2011).

Uma gama de modelos experimentais em roedores são disponíveis, estes, podem variar de modelos farmacológicos agudos, tais como com Reserpine, um dos primeiros modelos utilizados na DP, ou modelo como o Haloperidol, que exibe um ou mais sinais parkinsonianos (DUTY; JENNER, 2011). Dentre os modelos que exibem destruição da via dopaminérgica nigroestriatal, destacam-se o clássico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (BETARBET et al., 2002). Além destes, a tabela 1 exemplifica outras toxinas atualmente utilizadas como modelos experimentais de DP, muitas delas com base na capacidade de destruir neurônios dopaminérgicos através de vários mecanismos patogênicos relevantes (MCDOWELL, et al., 2012; DEXTER; JENNER, 2013).

Tabela 1: Toxinas usadas em modelos de DP e o processo patológico envolvido

MODELO PATOLÓGICO	TOXINA
Estresse oxidativo	6-OHDA e paraquat
Estresse nitrativo	LSP
Disfunção mitocondrial	Rotenona, MPTP e MPP ⁺
Excitotoxicidade	Ácido ibotênico, ácido quinolínico
Disfunção proteassomal	PSI,
Ativação das células da glia	LPS

6-OHDA, 6-hidroxidopamina; LSP, lipopolissacarídeo; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; MPP⁺, 1-metil-4-fenilpirimidina; PSI, inibidor de proteassoma.

Fonte: DEXTER; JENNER, 2013

Apesar do surgimento de novos modelos experimentais, um dos maiores problemas atualmente é a dificuldade de refletir a perda progressiva das células como ocorre naturalmente na DP, além da dificuldade em reproduzir sua complexidade em termos de extensão e das alterações bioquímicas (DUTY; JENNER, 2011).

Em culturas de células a exposição destas as toxinas pode ser controlada em alguns aspectos a título de exemplo: a concentração e o tempo de exposição. Contudo, o decurso do tempo de tais estudos é raramente mais do que alguns dias. Desta forma, é possível estudar o papel de vias patogênicas na indução e progressão da morte celular, apesar do ambiente ser inteiramente artificial e, que as células possam não ser representativas na susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos no cérebro humano envelhecido afetado por DP (CLEMENT, et al., 2002).

No modelo *in vivo*, as toxinas apresentam maiores limitações no processo de investigação da morte de células dopaminérgicas e no controle de certas metodologias experimentais. A maioria das toxinas requerem injeção intracerebelar na região da SNc ou *Striatum* (BLESÁ, et al.,2012).

2.4.1 O modelo de 6-OHDA

Descrito pela primeira vez em 1959, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), também conhecida como 2,4,5-trihidroxifeniletilamina, é atualmente a neurotoxina mais utilizada no modelo de DP. A 6-OHDA é um análogo estrutural das catecolaminas, dopamina e noradrenalina, e exerce efeitos tóxicos sobre os neurônios catecolaminérgicos. Tem ação tóxica, tanto a nível periférico quanto central. Contudo, devido não atravessar a barreira hematocefálica esta é injetada diretamente no cérebro por meio de cirurgia estereotáxica unilateral no estriado ou na SNc no mesencéfalo de ratos a fim de produzir um efeito neurotóxico através da destruição completa ou parcial dos neurônios dopaminérgicos (BLANDIMINI et al.,2008).

Os efeitos neurotóxicos de 6-OHDA ocorrem por meio de um mecanismo que envolve duas etapas, a saber: a acumulação da toxina nos neurônios catecolaminérgicos seguido pela alteração da homeostase celular e danos neuronais. O armazenamento da 6-OHDA ocorre por meio de transportadores de membrana de dopamina ou noradrenalina (DAT e NAT, respectivamente) devido à sua semelhança estrutural com as catecolaminas endógenas. Os efeitos endocelulares subjacentes do 6-OHDA remete ao estresse oxidativo. Por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que são amplificados por oligoelementos endocelulares, tais como: o manganês e o ferro. A oxidação do 6-OHDA pela monoamina oxidase gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, além de ser citotóxico, induz a produção de outros radicais de oxigênio. Além disso, a 6-OHDA passa por um processo de auto-oxidação, gerando espécies reativas do

oxigênio (H_2O_2) e quinonas que atacam os grupos nucleófilos endocelulares (SIMOLA et al., 2007). Os aumentos nos níveis de espécies reativas do oxigênio e outras espécies reativas resultam em uma rápida depleção das enzimas antioxidantes endocelulares, levando a uma neurotoxicidade amplificada na estrutura e metabolismo celular, resultando em dano neuronal (BLUM et al., 2001). A neurotoxicidade exercida pela 6-OHDA pode também induzir alterações de função mitocondrial por meio do complexo I da cadeia respiratória e alterações inflamatórias (DEXTER; JENNER, 2013).

A administração de 6-OHDA em áreas específicas resultam em *déficits* fisiológicos e comportamentais. A injeção de desta toxina é comumente associada à administração de bloqueadores do transportador de noradrenalina, como a Desipramina, a fim de reduzir a captação desta neurotoxina pelos neurônios noradrenérgicos e aumentar a seletividade para neurônios dopaminérgicos (SIMOLA et al., 2007).

Outra característica desse modelo é a degeneração retrógrada nos neurônios dopaminérgicos provocado por bombas de infusão. Esse processo proporciona períodos mais longos de exposição à toxina refletindo em parte, a natureza progressiva da DP (DEXTER; JENNER, 2013).

Desde suas primeiras descrições, diferentes modelos de 6-OHDA em roedores têm sido desenvolvidos a fim de obter um grau de degeneração variando de moderada a grande, proporcionando paradigmas apropriados para a modelagem dos parâmetros, a partir de marcadores moleculares para os melhores sintomas motores da DP (SIMOLA et al., 2007).

Apesar de décadas de estudos intensivos, mecanismos fisiopatológicos e moleculares da Doença de Parkinson ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente nos modelos animais. Apesar de certos modelos se destacarem como o clássico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (BETARBET et al., 2002) uma das dificuldades destes métodos é promover a morte neural progressiva conforme ocorre no processo natural de desenvolvimento da DP.

2.5 Pesquisa genética

Estudos moleculares identificaram que a mutação de um único gene dá origem a formas mendelianas da DP que pode ser herdada como autossômica dominante,

autossômica recessiva ou de forma mais rara ligada ao cromossomo X. Embora as formas familiares de PD e as mutações genéticas associadas representem atualmente apenas cerca de 10% dos casos, estes genes também desempenham um papel na forma esporádica da PD (LESAGE; BRICEA, 2012; DEXTER; JENNER, 2013). Tal relação, pode ser atribuída, devido à três processos celulares diferentes, mas parecem estar interligados, percebidos no processo de neurodegeneração mendeliano e esporádico a saber: implicações na transmissão sináptica (endocitose e exocitose), controle da qualidade mitocondrial em resposta ao estresse e autofagia mediada por lisossomo (TRINH; FARRER, 2013).

Foram estabelecidos até agora, pelo menos, 17 loci responsáveis pela variação da DP. Estes incluem as mutações autossômicas dominantes dos genes SNCA (gene que codifica a proteína pré-sináptica α -sinucleína), LRRK2 (Leucina rica em repetições cinase 2) e VPS35 (recentemente atribuído ao locus PARK), e das mutações recessivas dos genes *Parkin*, PINK1, DJ-1 (THOMAS, BEAL, 2011; LILL, et al., 2012; DEXTER; JENNER, 2013; FARLOW, et al. 2014; KLEIN; WESTENBERGER, 2012). Na tabela 2 estão sumarizados alguns dos genes mais estudados relacionados à Doença de Parkinson. Além destes, a mutação no gene EIF4G1 (fator de iniciação da tradução eucariótica 4G1) é classificado como fator dominante em famílias com DP tardia e aguarda confirmação para ser atribuído ao locus PARK (LESAGE; BRICEA, 2012; KLEIN; WESTENBERGER, 2012).

Os genes anteriormente citados são comumente propícios à descoberta da DP com base em mapeamentos de árvores genealógicas, seguido por definição do locus e dos genes através de técnicas como estudos de ligação e sequenciamento de próxima geração. Portanto, acessibilidade destas técnicas proporcionou maior compreensão das causas de DP monogênicas que permitiram estudos funcionais significativos nos processos patológicos subjacentes. Ao que se refere ao modo de herança poligênica, a penetrância é bastante variável e há necessidade de estabelecer um padrão de herança mendeliana clara. Esta é dificultada dentre outros aspectos devido a maioria dos estudos fornecidos resultarem de dados inconclusivos ou mesmo conflitantes tais como, em estudos com gêmeos homozigóticos. No entanto, o histórico familiar parece ser um fator de risco importante, com herdabilidade estimada em cerca de 27% (MULLIN; SCHAPIRA, 2015).

TABELA 2: Genética Molecular dos principais genes associados à Doença de Parkinson

LOCUS	GENE	CROMOSSOMO	MODO DE HERANÇA	PRODUTO e/ou FUNÇÃO
PARK1	<i>SNCA</i>	4q21-22	AD	α -sinucleína; Corpos de Lewy
PARK2	<i>Parkin</i>	6q25.2–q27	AR	Parkin; Ubiquitina Ligase E3, mitofagia
PARK3	Desconhecido	2p13	AD	Desconhecido
PARK4	<i>SNCA</i>	4q21–q23	AD	α -sinucleína; Corpos de Lewy
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p13	AD	Ubiquitina Hidrolase C-terminal
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35–p36	AR	Serina/Treonina-proteína cinase PINK1; Cinase Mitocondrial
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	AR	DJ-1; Estresse oxidativo
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	AD	Leucina rica em repetições cinase 2; Sinalização cinase, dinâmica do citoesqueleto
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	AR	Provável ATPase 13A2- transporte de cátions
PARK10	Desconhecido	1p32	AD	Desconhecido
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q36-27	AD	Sinalização IGF-1
PARK12	Desconhecido	Xq21–q25	Ligado a X	Fator de iniciação da transcrição TFIID subunidade 1
PARK13	<i>HTRA2</i>	2p12	AD	Serina Protease Mitocondrial
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	AR	Enzima Fosfolipase
PARK15	<i>FBX07</i>	22q12–q13	AR	Ubiquitina Ligase E3
PARK16	Desconhecido	1q32	FR	Desconhecido
PARK17	<i>VPS35</i>	16q11.2	AD	Proteína Vacuolar associada à triagem de proteínas
SLC6A3	<i>SLC6A3</i>	--	AR	Transportador de Dopamina dependente de Sódio

AD- Autossômico Dominante; AR- Autossômico Recessivo; FR- Fator de Risco.

Adaptada de: THOMAS, BEAL, 2011; FARLOW, et al. 2014; KLEIN, WESTENBERGER, 2012

2.5.1 Epigenética

Modificações epigenéticas proporcionam plasticidade fenotípica que permite adaptação a uma alteração no ambiente, sem alterar o genótipo (AMMAL KAIDERY et al., 2013). Contudo, essa mudança no perfil de expressão gênica pode ser herdada durante a divisão celular (OLIVEIRA, 2007). Os processos moleculares envolvidos na regulação da expressão de proteínas em estudos epigenéticos referem-se à metilação do DNA, modificações pós-transcricionais nas histonas (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação) e geração de micro-RNA (miRNA) (BOLLATI; BACCARELLI, 2010). Tais mecanismos são flexíveis, havendo a possibilidade de serem alterados em decorrência de diversos estímulos (OLIVEIRA, 2007).

Variações no estabelecimento ou manutenção do padrão epigenético resultam na ativação ou inibição de genes que influenciam a fisiologia celular, podendo desencadear patologias (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Recentemente, estudos epigenéticos

relacionados à DP têm demonstrado que tais variações representam um potencial mediador no desenvolvimento dessa patogênese, possibilitando a mensuração de uma alternativa que poderá esclarecer lacunas de hereditariedade, (MULLIN; SCHAPIRA, 2015) conforme mencionado anteriormente.

Apesar do estudo do epigenoma ser relativamente recente, nos últimos anos houve um progresso considerável no desenvolvimento de medicamentos à base de estudos epigenéticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas tais como a DP. Várias drogas que têm como alvo alterações epigenéticas são conhecidas e bem estudadas (AMMAL et al., 2013). A tabela 3 sumariza algumas modulações epigenéticas provocadas por toxinas e por drogas terapêuticas. Destes, os inibidores como histonas desacetilases (HDAC) e DNA metiltransferase (DNMTs) são atualmente aprovadas e disponíveis para investigação clínica (XU et al., 2012).

Dentre os principais mecanismos envolvidos no processo epigenético, daremos ênfase nos pequenos transcritos de ncRNA (microRNA) e sua relação no desenvolvimento de patologias, mais precisamente na Doença de Parkinson.

TABELA 3: Modulação epigenética provocado por toxinas ambientais e drogas terapêuticas em Doença de Parkinson

Substâncias químicas	Modificações epigenéticas
Toxinas	
MPTP	Desmetilação
Paraquat	Hiperacetilação H3
Rotenona	Mecanismos desconhecidos / o inibidor HDAC protege toxicidade
Dieldrin	Hiperacetilação H3, H4
Uso crônico de drogas	
Levodopa	Acetilação H4K5, K8, K12, K16
Inibidor acetiltransferase de histonas	
Ácido anacárdico	Acetilação
Inibidores HDAC (histona desacetilases)	
Ácido Valpróico	Hiperacetilação H3/ Ativação do promotor/ Di, trimetilação
Tricostantina A	Hiperacetilação/ Ativação do promotor/ Di, trimetilação
Ácido hidroxâmico suberoilnilida	Hiperacetilação/ Ativação do promotor/ Di, trimetilação
Butirato de Sódio	Hiperacetilação/ Ativação do promotor
AGK2	Hiperacetilação
MS-275	Ativação do promotor/ Di, trimetilação
Apicidina	Ativação do promotor/ Di, trimetilação
Fenil butirato	Ativação do promotor
Urocotina	Hiperacetilação

MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; HDAC, histonas desacetilase; AGK2 um inibidor de SIRT2; MS-275, classe I de HDAC.

Fonte: KAIDERY et al., 2013

2.5.1.1 Pequenos transcritos de ncRNA (microRNA) e fatores associados à DP

Micro-RNAs são pequenas moléculas endógenas, representam um grupo de 21-24 nucleotídeos de RNA não codificante (ncRNA), estes ligam-se à região 3'UTR do RNAm-alvo e, desta forma desempenham funções importantes em vários processos biológicos, particularmente na regulação pós-transcricional por meio de processos de degradação e repressão da tradução (MA et al., 2013; BARTEL, 2009; FENG; JANKOVIC; WU, 2015).

Os miRNAs são evolutivamente conservados e podem estar localizados em íntrons, éxons ou regiões intergênicas (RODRIGUES; GRIFFITHS-JONES et al., 2004). Os precursores dos miRNAs são sintetizados pela RNA-polimerase II e são submetidos à adição do quepe 5' e a poliadenilação. A complementaridade de partes do mesmo RNA possibilita o pareamento e formação de fita dupla. O transcrito primário do miRNA (pré-miRNA) é um RNA maior, de comprimento variável. O processamento desses miRNAs é mediado por duas endorribonucleases da família RNase III, Drosha e Dicer. O processo é iniciado no núcleo, o pré-miRNA é reduzido a um precursor com cerca de 70 pares de base (pb) por meio de um complexo proteico que inclui a Drosha e o seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene 8*) (MA et al., 2013; OLENA; PATTON, 2010; HARRAZ; DAWSON; DAWSON, 2010).

Em seguida, o pré-miRNA é exportado para o citoplasma por meio de um receptor nuclear dependente de RanGTP exportina-5. No citoplasma, os pré-RNAs são liberados por hidrólise de GTP e clivados pela Dicer para produzir um RNA quase maduro, pareado com um curto complemento de RNA. O complemento é removido por uma RNA-helicase, e o miRNA maduro é incorporado a um conjunto de proteínas para formar um Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*) (MA et al., 2013; OLENA; PATTON, 2010; EACKER; DAWSON; DAWSON, 2010).

Após a formação do complexo RISC, a procura dos RNAs-alvos é feita por meio de sequências complementares ao miRNA. A procura é facilitada por proteínas da família Argonala (AGO1 e AGO2), compõe o complexo RISC, em um processo dependente de ATP e chaperonas Hsc70 e Hsp90 que se encaixa na região *upstream* do miRNA e a região 3'UTR do RNAm-alvo (KWAK; IWASAKI et al., 2010). Se a complementaridade entre o miRNA e o seu alvo for quase perfeita o RNAm-alvo ocorre

a degradação rápida do RNAm. Contudo, se o pareamento for parcial ocorre o encurtamento da cauda poli-A e o direcionamento do RNAm para estruturas citosólicas denominadas corpos de processamento (corpos P) promovendo o bloqueio da tradução e consequente degradação dos RNAm-alvo (KAWAMATA; TOMARI, 2010). Um único miRNA pode regular a expressão de vários genes e, um único gene pode ser regulado por miRNAs diferentes (AMMAL et al., 2013).

A complexidade adicional que os miRNAs desempenham nos processos pós-transcricionais tem sido alvo de pesquisas. Vários miRNAs são citados como importantes mediadores no desenvolvimento de enfermidades a saber: câncer, processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, imunológicas e neurodegenerativas (SOREQ et al., 2013). Contudo, também tem sido base para o desenvolvimento de drogas, controle de doenças e provável prevenção (HAO et al., 2015).

Tan, Yu e Tan (2015) apontam três segmentos principais investigados nos miRNAs: perturbação da biogênese; identificação de miRNAs que regulam genes alvo envolvidos na patologia e alterações epigenéticas.

Particularmente, na DP estudos da abundância relativa de miRNAs em regiões do cérebro de pacientes acometidos pela enfermidade comparados ao grupo controle tem sido utilizada como forma de compreender miRNAs específicos na doença. Kim e colaboradores (2007) analisaram cerca de 224 miRNAs. Destes, o miRNA-133b apresentou uma deficiência significativa no mesencéfalo de amostras acometidas pela enfermidade. Além disso, há indícios que o miRNA-133b funciona como um regulador negativo do desenvolvimento de neurónios dopaminérgicos, sugerindo uma ligação direta para a homeostase da dopamina (KANAGARAJ et al., 2014; KIM et al., 2007). Essa regulação ocorre pela interação de miRNA-133b com o fator de transcrição da hipófise *pituitary homeobox 3* (Pitx3) através de um ciclo de feedback negativo. Em resumo, esse ciclo ocorre com a Pitx3 induzindo a transcrição de miRNA-133b durante a diferenciação neural, que por sua vez reprime *Pitx3*. Desta forma, a perda de Pitx3 resulta na perda de miRNA-133b no modelo de Parkinson (MA et al., 2013).

Diversos outros miRNAs foram identificados em ensaios de microarranjo e qRT-PCR para o modelo de Parkinson. Destes, houve um aumento significativo de miRNAs-132 em modelos de ratos com DP na região do mesencéfalo. Enquanto o miRNA-124 que desempenha funções importantes como diferenciação neural do

sistema nervoso central e neurogênese em adultos teve níveis diminuídos em modelos com MPTP (MA et al., 2013).

Ruiz e colaboradores (2013) relatam que alterações desencadeadas por miRNAs na repressão da tradução de certos RNAm pode ser regulada por BDNF. Estudos preliminares com o miRNA134 mensuram o envolvimento deste miRNA na regulação negativa do tamanho da espinha dentrítica por inibição da tradução de um RNAm que codifica Limk1. Este RNAm, aumenta os níveis de tradução em resposta a BDNF e, a perda de Limk1 produz *déficit* na aprendizagem e memória. Apesar de ainda não ser completamente elucidado, foi percebido que o BDNF é capaz de controlar a perda de Limk1 mediado pelo miRNA134 e desta forma regular a expressão do gene através da alteração da função de miRNA específicos para aliviar a supressão exercida por eles. Estudos adicionais, tem relatado que o BDNF está envolvido na transcrição de precursores de miRNA. A saber: em estudos com culturas de células de neurônios corticais, foi percebido um aumento do pré-miRNA132 mediado por BDNF (KAWASHIMA et al., 2010).

Deste a descoberta dos miRNAs a vinte três anos (LEE et al., 1993) vários mecanismos que envolvem esses pequenos transcritos foram elucidados. Contudo, estudos complementares relacionados ao mapeamento, funcionalidade, mecanismos que envolvem a biogênese dos miRNAs continuam a ser revelados. Algumas das ferramentas que permitem a análise desses ncRNAs com precisão e de forma rápida são os sequenciamentos de nova geração alinhado a ferramentas de bioinformática. Promovendo a obtenção de genomas e transcriptômas inteiros e, desta forma, auxiliando no esclarecimento de mecanismos envolvidos em patologias e ação de bioativos de interesse farmacológico (WANG et al., 2010).

2.5.2 Processo de *splincing* alternativo

O *splincing* alternativo desempenha um papel chave na regulação pós-transcricional da expressão gênica, permitindo que um único gene possa codificar várias isoformas (MURPHY et al., 2015). Portanto, o *splincing* alternativo amplifica a capacidade de codificação do genoma, gera diversidade de proteínas, podendo alterar a função destas. Estima-se que mais de 90% dos genes humanos passam por *splincing* alternativo, esse tipo de processamento ocorre de forma predominante especialmente nos tecidos nervoso e imunológico (SHOKOLA et al., 2015). Soreq e colaboradores

(2013) analisaram a interação entre a expressão de miRNA e *splicing* alternativo. Foi percebido alterações nos perfis de miRNA e seus alvos de *splicing* em leucócitos e regiões do cérebro (incluindo SNc e lóbulo frontal) acometidos por DP.

Em síntese, o mecanismo de *splicing* consiste na remoção dos íntrons do pré-mRNA, tornando as sequências codificadoras contínuas. Processos adicionais, que podem ocorrer simultaneamente, de capeamento de 5'e poliadenilação 3' completam o processamento do RNAm no núcleo seguido pela exportação para o citoplasma. O *splicing* de RNAm é catalizado pelo spliceossomo, este é constituído de snRNPs (pequena ribonucleoproteína nuclear) formadas por snRNAs (pequenos RNAs nucleares) associados à proteínas. São conhecidos cinco snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6) envolvidos na principal forma de *splicing* do pré-RNAm (VILLAGRA et al., 2009).

O spliceossomo é complexo e dinâmico, responsável pelo processo de reconhecimento das sequências nucleotídicas, pareamento dos sítios de *splicing* com diferentes snRNP aumentando a exatidão da seleção do sítio de clivagem, além do posicionamento desses sítios favorecendo a transesterificação. Três regiões da molécula de RNA precursora são reconhecidas em dois processos de transesterificação, a saber: região de *splicing* 5', região de *splicing* 3' e o ponto de forquilha na sequência do íntron que forma a base do fragmento em laço a ser excisado (COGNATA et al., 2015).

A literatura têm atribuído alterações no padrão de *splicing* alternativo a progressão de certas doenças, a título de exemplo a patologia de Parkinson. Estudos de padrões de expressão dos *splicings* alternativos referentes aos genes diretamente ligados a DP mendeliana e esporádica tem aumentado a fim de estabelecer um biomarcador para a identificação precoce dessa enfermidade (SHAKOLA et al., 2015). Além desses genes, uma gama de outros tem sido investigado nesse aspecto, a título de exemplo: os receptores de AMPA (KOBYLECKI; CROSSMAN; RAVENSCROFT, 2013), BDNF (KARPOVA, 2010), Óxido nítrico sintetase (KAVYA et al., 2006), transportador de creatina (NDIKA et al., 2014).

Outro fator importante no processo de *splicing* refere-se as diferentes extremidades 5'UTR e 3'UTR obtidas durante a regulação transcricional. Essas variantes, são ferramentas celulares complexas que podem ser reconhecidas por diferentes moléculas, a saber: moléculas de sinal inibitório 5', moléculas de sinal

permissivo 5' e miRNAs. Tais moléculas influenciam diretamente no controle traducional dos diferentes transcritos, conforme estudo revisado por Karpova (2014) sobre a plasticidade neural e a rápida regulamentação local do gene neuroprotetor BDNF mediado por diferentes promotores e variantes de processamento (5'UTR e 3'UTR) e suas respectivas moléculas de reconhecimento que possibilitam a indução ou repressão da tradução, bem como a degradação do transcrito em resposta a estímulos temporal, neural e espacial.

2.5.3 Análises Transcriptômicas como ferramenta na investigação de patologias

O conjunto completo de transcritos em uma célula e suas quantidades em um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica é chamado de transcriptoma (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Atualmente, avanços tecnológicos tem promovido o sequenciamento dos transcritos de forma rápida e precisa. O estudo do transcriptoma por RNA-Seq permite a análise da expressão de milhares de genes, mesmo que eles sejam pouco expressos em determinada condição fisiológica. Além de possibilitar estudos envolvendo processamento de mRNA, ncRNA (como os miRNAs), entre outros. Desta forma, técnica de RNA-Seq é mais versátil que estudos envolvendo microarranjos e PCR em tempo real (FILHO, 2013).

Os avanços nas técnicas de sequenciamento tem permitido um crescente aumento no número de dados. Este contingente de dados exigiu o desenvolvimento de técnicas adequadas de processamento para a análise das informações obtidas. Por conseguinte, a Bioinformática está em contínuo aperfeiçoamento, promovendo a análise das sequencias biológicas através da geração de algoritmos e programas.

Dentre as análises feitas no estudo transcriptômico, é feita a expressão relativa dos transcritos. Este valor de expressão pode ser realizado com base em duas estratégias, a saber: mapeamento de uma sequência previamente conhecida ou análise *de novo*. Como resultado, é obtido um grande número de *reads*. A partir destes, é calculado a expressão relativa de um determinado gene por FPKM (*reads per kilobase of transcript per milion mapped reads/ reads por kilobase de transcritos por milhões de reads mapeados*). Esta abordagem permite uma análise comparativa baseada em uma série de análises estatísticas para comparação de transcritos com diferentes RPKMs de diferentes amostras biológicas ou diferentes tempos de tratamento, por exemplo (VERLI et al., 2014).

A capacidade de mapeamento e análise de transcritos tem contribuído com um número maior de informações sobre mecanismos de ação envolvidos em diversas desordens entre elas as neurológicas, como a depressão, ansiedade e a doença de Parkinson (WANG et al., 2010; PARCHMAN et al., 2010 *apud* SOUZA, 2015). Desse modo, tem instigado vários grupos de pesquisas a utilizarem tais ferramentas para obtenção de dados complementares que auxiliem no esclarecimento de determinados processos moleculares.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

O presente estudo objetivou identificar alterações transcricionais relacionadas a pequenos RNAs não codificadores (miRNAs) e *Splicing* alternativo em *striatum* de *Rattus norvegicus albinus* submetidos ao modelo parkinsoniano induzido por injeção unilateral de 6-OHDA.

3.2 Específicos

Obter perfil transcriptômico de miRNAs e *Splicing* alternativos em *striatum* de ratos parkinsonianos submetidos a 6-OHDA;

Determinar o FPKM relativo de miRNAs e *Splicing* alternativos;

Identificar miRNAs e *Splicing* alternativos envolvidos em potenciais mecanismos regulatórios associados ao processo neurodegenerativo induzido por 6-OHDA em *Striatum* de ratos.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso variando entre 250-350 g, todos provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo 6 animais, em condições de biotério com temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade.

Os protocolos experimentais foram elaborados de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), o qual foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Fortaleza, especificado no protocolo 45/2013. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

4.2 Indução do Modelo de Doença de Parkinson através de injeção unilateral de 6-OHDA em ratos

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, com $n = 10$ animais por grupo, totalizando 20 animais. Posteriormente, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg; i.p.) e xilasina (10 mg/Kg; i.p.), após anestesiado, foi verificado se o animal apresentava qualquer reflexo doloroso. A cabeça do animal foi fixada no aparelho estereotáxico (INSIGHT), através de duas barras de fixação inseridas nos meatos auditivos externos do animal e os dentes incisivos fixados em uma barra de sustentação

Logo após a fixação do animal, foi feita uma tricotomia e assepsia da região superior da cabeça (álcool 70%). Após a incisão da pele, foi feita a remoção do periósteo e exposto o bregma. Após, foram determinadas as coordenadas estereotáxicas (em milímetros), segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986), para a realização de 3 orifícios: 1º: L: -2,5; AP: +0,5; V: +5,0; 2º: L: -3,0; AP: -0,5; V: +6,0; e 3º: L: -3,7; AP: -0,9; V: +6,5; todos em relação ao bregma, como descrito por Araújo e colaboradores (2013). Em seguida, com uma seringa de Hamilton de 5 μL , os animais receberam três injeções intraestriatais (intracraniana, em corpo estriado).

4.3 Confirmação do parkinsonismo e dissecação do *striatum* (corpo estriado)

O parkinsonismo foi confirmado pela identificação de distúrbios locomotores e alterações neuroquímicas, características do presente modelo, através de testes comportamentais (teste do Campo Aberto, teste do RotaRod e teste Rotacional induzido por apomorfina) e neuroquímicos (níveis de nitrito, peroxidação lipídica - TBARS, glutathiona reduzida e monoaminas), de acordo com estudo anterior realizado por Souza (2015). O corpo estriado ipsilateral, principal área acometida pela referida neurotoxina, foi obtido por microdissecação, após eutanásia por decapitação. Posteriormente, a referida área cerebral foi utilizado para obtenção do RNA total.

4.4 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de corpo estriado (ipsilateral) dos ratos utilizando TRIzol® (Life Technologies/Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante baseado no método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Para isso, a referida área cerebral foi colocada em homogeneizador manual na presença de 1 mL do reagente TRIzol®. Posteriormente o RNA total foi purificado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio e, após posterior precipitação com uso de iso-propanol (isopropanol ou 2-propanol) e etanol 75 % (diluído com água mili-Q tratada com DEPC), o RNA total foi mantido (- 80 °C) em água ultra pura tratada com DEPC.

4.4.1 Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total

Para testar a eficácia da extração e pureza do RNA total, foi determinada a concentração de RNA total nas amostras por diluição do RNA (fator de diluição conhecido), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A260) e 260/280 nm (A260/A280). A qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em um equipamento de luz ultravioleta [DADOS NÃO MOSTRADOS- Obtidos de Souza, (2015)] .

4.5 Análises Transcriptômicas

Os dados referentes ao transcriptoma foram obtidos através da tecnologia de próxima geração de sequenciamento de DNA, do tipo Illumina, garantindo uma grande

quantidade de sequências em curto tempo. Todas as análises por bioinformática foram realizadas utilizando programas gratuitos e amplamente utilizados pela comunidade científica.

4.5.1 Sequenciamento do RNA utilizando a plataforma Illumina Hi-Seq2000

Para as análises transcriptômicas, utilizou-se um pool, contendo aproximadamente 40 µg do RNA total isolado de corpo estriado dos animais de cada grupo (Sham e 6-OHDA), com relação de absorbância 260/280 igual ou superior a 1,7. Posteriormente, as amostras de RNA foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ-USP) para a construção das bibliotecas de cDNA (tipo Paired End). A construção de bibliotecas de cDNA e ligação de adaptadores foram realizadas utilizando o kit TruSeq(tm) RNA and DNA Sample Preparation kit (Illumina), utilizando de 1-10 µg do RNA total, de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores foram amplificados por Bridge PCR utilizando o equipamento cBOT. Em seguida, as amostras de cDNA foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq2000.

4.6 Análises *in silico*

4.6.1 Mapeamento, contagem das leituras e classificação

O processamento dos dados foram realizados em um computador *HP Proliant* com 24 núcleos de processamento e 16,7 Gb de memória RAM. Os dados brutos filtrados (arquivos no formato *fastq*) contendo dados de sequência e qualidade de base em *Phred* foram avaliados pelo programa *FastQC* (ANDREWS, 2013). As leituras de baixa qualidade foram removidos utilizando a ferramenta *FastX Toolkit* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). O genoma de *Rattus norvegicus* foi baixado do NCBI e indexado usando o *Bowtie* 1.1.1 (LANGMEAD; TRAPNEEL; SAÇZBERG, 2009) e o mapeamento com *TopHat* 2.0.13 – foram descartados da análise as leituras com bases de *Phred* ≤ 20 (ERWING e GREEN, 1998; TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). O software *Cufflinks* 2.2.1 foi utilizado para a montagem do transcriptoma de referencia (TRAPNELL et al, 2012). Os dados de saída do *Cuffdiff* foram filtrados para retirada de dados referentes as mudanças gênicas qualitativas, micro RNAs e *splicing* variantes (<http://www.r-project.org>).

A análise dos miRNA foi feita apenas dos genes que apresentaram variantes de expressão qualitativas (ausência e presença) nos grupos Sham e 6-OHDA. Para a análise dos transcritos variantes foram considerados os transcritos com valores de expressão (FPKM relativo) inferiores a 0,25 e superiores a 4,0.

4.6.2 Alinhamento múltiplo de sequências

As isoformas consideradas com diferença de expressão por FPKM relativo foram analisadas a nível proteico e transcricional. As sequências foram obtidas pelo GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em seguida, foram analisadas as similaridades entre as isoformas através do alinhamento de múltiplas de sequências usando a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.6.3 Predição do peptídeo sinal

As sequências de aminoácidos das isoformas obtidas pelo GenBank foram submetidas a verificação da presença de possíveis peptídeos sinal através do programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN et al., 2011). Para a análise, foram utilizados os parâmetros originalmente empregados pelo SignalP 4.1.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação do parkinsonismo e verificação da qualidade e quantidade dos RNAs extraídos do Corpo Estriado de Ratos

Os testes comportamentais pelos quais os animais foram submetidos apresentaram um padrão aceitável para a confirmação da indução do parkinsonismo [DADOS NÃO MOSTRADOS-Obtidos de Souza, (2015)], possibilitando a análise do transcriptoma pelo método de indução por 6-OHDA.

Os dados obtidos por espectrofotometria e eletroforese dos RNAs extraídos revelaram qualidade nas amostras. A relação $A_{260/280}$ (absorbância Ác. nucleico/proteína) apresentou $AB > 1,7$, indicando qualidade na obtenção das amostras de acordo com Sambrook; Russel (1989). Todos os RNAs analisados não apresentaram sinais de degradação (pela presença das bandas ribossomais 28 e 18 S) e ausência de DNA genômico [DADOS NÃO MOSTRADOS-Obtidos de Souza, (2015)].

5.2 Confirmação do Sequenciamento dos RNA pela Próxima Geração de Sequenciamento (NGS)

Todos os *reads*, utilizados para as análises transcriptômicas no presente estudo, apresentaram tamanho de 101 pb e qualidade *Fhred* igual ou superior a 33 [DADOS NÃO MOSTRADOS-Obtidos de Souza, (2015)].

5.3 Perfil de miRNA em animais parkinsonianos

Foram identificados 62 miRNAs com contagens de leituras variadas entre o grupo SHAM (controle negativo) e 6-OHDA (animal parkinsoniano), dando indícios de variações de expressão. Destes, foram considerados para análise de FPKM relativo apenas os miRNAs que apresentaram diferenças qualitativas, a saber: Mir1249 (LOC020667), Mir3074 (LOC036530), Mir6314 (LOC006448) e Mir6326 (LOC025848) foram expressos apenas no grupo Sham. Adicionalmente, Mir6333 (LOC014955) apresentou contagem de leituras exclusivamente no grupo 6-OHDA (TABELA 4).

TABELA 4: miRNA diferencialmente expressos nos grupos Sham e 6-OHDA

GENE	LOCUS	Sham (FPKM)	6-OHDA (FPKM)
Mir1249	NC_005106.4:125853583-125893205	39.0975	0
Mir3074	NC_005116.4:507358-825930	122249	0
Mir6314	NC_005101.4:211650549-211690799	3.68028	0
Mir6326	NC_005109.4:62297473-62302280	81.9331	0
Mir6333	NC_005104.4:153808180-153844011	0	80.5462

Fonte: Autor

5.4 Análise de *splicing* variantes e expressão relativa nos grupos Sham e 6-OHDA

Foram encontradas 96.970 isoformas com leituras mapeadas nos grupos Sham e 6-OHDA. Destes transcritos variantes, foram analisados os genes envolvidos no processo neurodegenerativo, neuroprotetor, neuroinflamatório e envolvidos no processo oxidativo (dados não mostrados). Para as análises, foram considerados os transcritos com valores de expressão (FPKM relativo) inferiores a 0,25 e superiores a 4,0.

Dentre os genes analisados, foram obtidos 12 isoformas para o gene BDNF. Destes, três isoformas apresentaram diferença de expressão por FPKM relativo. A isoforma 1 (NM_001270630.1) e a isoforma 7 (NM_001270635.1) aumentaram os níveis de expressão. Contudo, a isoforma 4 (NM_001270632.1) teve níveis de expressão reduzidos (TABELA 5).

Tabela 5: Análise dos *splicing* variantes do gene BDNF, expressão relativa e suas distribuições nos grupos Sham e 6-OHDA

GENE	TRANSCRITOS ALTERNATIVOS	PROTEINAS CODIFICADORAS	FPKM relativo
BDNF	NM_012513.4	NP_036645.2	0.627255688
	NM_001270631.1	NP_001257560.1	0.549578998
	NM_001270632.1	NP_001257561.1	0
	NM_001270637.1	NP_001257566.1	-
	NM_001270635.1	NP_001257564.1	15856.86458
	NM_001270633.1	NP_001257562.1	0.817727753
	NM_001270638.1	NP_001257567.1	1.306124099
	NM_001270630.1	NP_001257559.1	4.426712466
	XM_006234684.2	XP_006234746.1	-
	NM_001270636.1	NP_001257565.1	-
	NM_001270634.1	NP_001257563.1	-
	XM_008762078.1	NP_008760300.1	-

Fonte: Valores de FPKM dados do Autor; Identificação dos transcritos dados do NCBI.

Legenda: Os transcritos com diferença de expressão: Vermelho- menor valor de expressão por FPKM relativo; Azul- aumento de expressão por FPKM relativo.

5.5 Alinhamento das sequências de aminoácidos e predição do peptídeo sinal

Dos três transcritos com diferença de FPKM relativo para o gene BDNF, dois

codificam a mesma proteína. A isoforma 4 (NM_001270632.1) e 7 (NM_001270635.1), apesar de transcricionalmente serem expressos a níveis diferentes no modelo parkinsoniano induzidos por 6-OHDA, possuem a mesma sequência de aminoácidos, portanto, codificam a mesma proteína. Adicionalmente, a isoforma 1 (NM_001270630.1) codifica uma proteína maior que os demais transcritos analisados, diferindo especificamente na região N-terminal (Figura1).

Por conseguinte, as sequências de aminoácidos foram analisadas quanto à presença de peptídeo sinal. As isoformas 4 e 7 possuem predição positiva de peptídeo sinal, assinalando que tais proteínas são translocadas dos seu lugar de síntese no citoplasma. Em detrimento, a isoforma 1 possuem predição negativa de peptídeo sinal, indicando a permanência desta proteína no citoplasma. A figura 2 detalha os valores referentes ao peptídeo sinal.

Figura 1- Alinhamento dos aminoácidos referente às isoformas de BDNF

```

isoforma1  MSDPSAWRWLSSGCPPLPPRRGAPAGWLSHGPHCARDSPAWRRKPPGAARHLRLAGFDET
isoforma4  -----
isoforma7  -----

isoforma1  GFPQLATAALGQTRKRTGPRAGRRDQERDNNVTPLPGIRELCVDPEFHQVRRVMTILFLT
isoforma4  -----MTILFLT
isoforma7  -----MTILFLT
*****

isoforma1  MVISYFGCMKAAPMKEANVHGQGNLAYPAVRTHGTLESVNGPRAGSRGLTTTSLADTFEH
isoforma4  MVISYFGCMKAAPMKEANVHGQGNLAYPAVRTHGTLESVNGPRAGSRGLTTTSLADTFEH
isoforma7  MVISYFGCMKAAPMKEANVHGQGNLAYPAVRTHGTLESVNGPRAGSRGLTTTSLADTFEH
*****

isoforma1  VIEELLDEDQKVRPNEENHKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMR
isoforma4  VIEELLDEDQKVRPNEENHKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMR
isoforma7  VIEELLDEDQKVRPNEENHKDADLYTSRVMLSSQVPLEPPLLFLLEEYKNYLDAANMSMR
*****

isoforma1  VRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETK
isoforma4  VRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETK
isoforma7  VRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETK
*****

isoforma1  CNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKR
isoforma4  CNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKR
isoforma7  CNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKR
*****

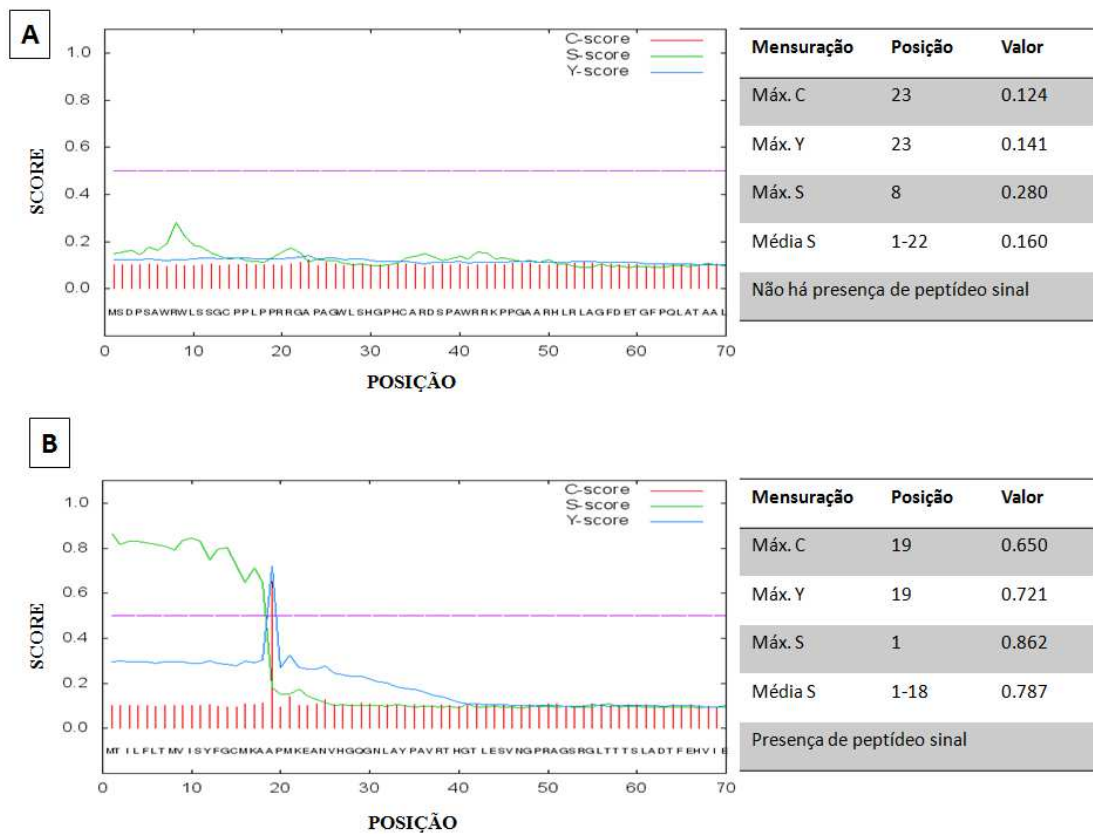
isoforma1  GR
isoforma4  GR
isoforma7  GR
**

```

Fonte: Autor. Sequências dos aminoácidos- NCBI.

Legenda: As sequências dos aminoácidos foram alinhadas usando o Alinhamento de múltiplas sequências da Clustal Omega (1.2.1). Os transcritos de BDNF: isoforma 4 (NM_001270632.1) e 7 (NM_001270635.1) codificam a mesma proteína, em contrapartida a isoforma 1 (NM_001270630.1) possui sequência N-terminal diferente (destacado em vermelho), portanto, codifica uma proteína diferente das demais isoformas analisadas.

Figura 2- Predição do peptídeo sinal de isoformas do gene BDNF



Fonte: Autor

Legenda: As sequências dos aminoácidos de três isoformas do gene BDNF foram analisadas quanto a presença de peptídeo sinal pela ferramenta SignalP 4.1. Os dados são representados em forma de gráfico e tabela, ambos referem-se ao aminoácido com predição a peptídeo sinal. Os valores de C atribuem a provável existência de sítio de clivagem de peptídeo sinal; em S são os valores para indicar se este aa estaria dentro do peptídeo sinal e, os valores de Y referem-se a compilação dos valores de C e S. Quanto mais próximos forem os valores de 1 para C e S, maior a probabilidade do aa ser o peptídeo sinal. (A) isoforma 1 (NM_001270630.1). (B) isoforma 4 (NM_001270632.1) e 7 (NM_001270635.1).

5.6 Alinhamento das sequências de nucleotídeos e análise das regiões não codificadoras (5'e 3'UTR)

A diferença de FPKM relativo nos transcritos de BDNF não foram esclarecidos analisando as sequências de aminoácidos. Contudo, na análise da sequência de nucleotídeos, percebeu-se diferenças nas regiões 5'UTR das isoformas 1 (NM_001270630.1), 4 (NM_001270632.1) e 7 (NM_001270635.1). Foi percebido que quanto maior for a região 5'UTR menor será o nível de expressão por FPKM relativo desta isoforma nos transcritos de BDNF analisados (Figura 3). Tais dados sugerem que essas regiões podem regular a expressão dos genes através da interação com outras moléculas, a título de exemplo os miRNAs.

Figura 3- Alinhamento dos nucleotídeos referente às isoformas de BDNF

```

isoforma4      GCTTTGGCAAAGCCATCCGCACGTGACAAAACGT AAGGAAGTGGAAGAA
isoforma7      -----
isoforma1      -----

isoforma4      ACCGTCTAGAGCAATA TCAAGTACCACTTAATTAGAGAAATATTTT TTTAACCTTTTCCTC
isoforma7      -----
isoforma1      -----CCAAATCGAAGCTCAACCGAAGAGCTAAATAATGTCTGACCC

isoforma4      CTGCTGCGCCGGGTGTGTGATCCGGGCGAGCAGAGTCCATT CAGCACCTTGACAGAGCC
isoforma7      -----
isoforma1      CAGTGCTGCGCTGGCTGAGCTCTGGGTGCCCCGCGCTGCCGCCGCGCCGGGCGCACC

isoforma4      AGCGGATTTGTCCGAGGTGGTAGTACTTCATCCAGGTATCTTTT CCTCGCTGTCAAGCC
isoforma7      -----ACCTCTCCATCGCCCTCACGATTCTCGCTGGATAGTTCT
isoforma1      CGCTGGCTGGCTGTGCGCACGGTCCCCAT TGCGCCCGGGACTCCCCGGCTTGAGAAGGAA

isoforma4      AACCCGGTGTGCCCCCT TAAAAAGCGTCTTTTCCGAGGTT CGGCTCACACTGAGATCGGGG
isoforma7      TTATGTTTTGGGTGATTTTTGT TTTTGTGTTTGTTTGTT TTTTTT TTTTTT AATTTT TAC
isoforma1      ACCGCCTGGGGCGGCGGCCACCTCCGCCTGGCAGGCTTTGATGAGACCGGGTTCCCTCA

isoforma4      CTGGAGAGAGAGTCAGATTTTGAGCGGAGCGTTTGGAGAGCCAGCCCCAGTTTGGTCCC
isoforma7      CCCTTTCTATT TCCCC TCCCCGAGAGTTCCGGGCTCTGGCTTGAGGGGCTCCTGCTTTCT
isoforma1      GCTCGCCACCGCTGCTTTGGGGCAGACGAGAAAGCGCACGGGGCCAGGGCAGGGCGCAG

isoforma4      CTCATTGAGCTCGCTGAAGTTGGCTTCTTAGCGGTGTAGGCTGGAATAGACTCTTGCAA
isoforma7      CAAGGGAAGGGGAGCCGCTGAGACTGCGCTCCACTCCCTGCCGGGCTGGATGCTTCATTG
isoforma1      GGACCAGGAGCGTGACAACAATGTGACTCCACTGCCGGGATCCGAGAGCTTTGTGTGGA

isoforma4      GCTCCGGTTCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTC
isoforma7      AGCCCAGTTCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTC
isoforma1      CCCTGAGTTCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTC
*****

```

Fonte: Autor. Sequências dos nucleotídeos- NCBI

Legenda: Fragmento da sequência de nucleotídeos do gene BDNF. Isoformas 1 (NM_001270630.1), 4 (NM_001270632.1) e 7 (NM_001270635.1). Os nucleotídeos (ATG) marcados em vermelho indicam o início da região codificadora para o seu respectivo RNAm (AUG) e consequentemente, as diferenças da região 5'UTR para os três transcritos.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou mecanismos moleculares envolvidos na etiopatologia do parkinsonismo em modelo animal induzido pela neurotoxina, 6-OHDA. Dentre os principais achados obtidos, sugere-se, pela primeira vez na literatura, o envolvimento de miRNAs no mecanismo de neurodegeneração dopaminérgica no referido modelo de estudo. Além de propor padrões de expressão diferenciada em variantes transcricionais de genes envolvidos com o processo degenerativo.

Estudos com miRNAs têm demonstrado que estes controlam os vários processos biológicos e estão envolvidos em várias doenças neurológicas, tais como: isquemia (LUSARDI et al., 2010), doença de Alzheimer (NELSON et al., 2010) e a doença de Parkinson (PACKER et al., 2008), bem como na resposta a terapia de electrochoque (EACKER et al., 2011). Contudo, ainda são escassas informações na literatura sobre determinados miRNAs, principalmente ao que se refere a doenças neurológicas e suas funções biológicas. Por este motivo, no presente trabalho, buscou-se investigar alterações transcricionais em miRNAs.

Dentre os miRNAs com expressão alterada, foi identificado o miRNA conhecido por Mir3074. Chiang e colaboradores (2010), em estudos com mapeamento de miRNAs em mamíferos, agrupou o MirA3074 como um dos cinco novos miRNA mapeados para a cadeia antisense de miRNAs. Apesar do mapeamento relativamente recente, este miRNA já foi observado em situações diversas, a saber: na modulação da termogênese (THIBONNIER, 2015), dor neuropática provocada por *Diabetes mellitos* (GONG et al, 2015), carcinoma hepatocelular (NEGRINI et al., 2011). Recentemente, Cordero e colaboradores (2015) sugeriram que a expressão ectópica de Mir3074 pode estar implicada na progressão do câncer. Os resultados propostos por Cordero e colaboradores, associados aos observados no presente estudo, sugerem que a expressão de miRNA3074 pode estar relacionado com a inibição via apoptótica. Estes resultados podem, portanto, justificar a ausência de expressão do miRNA3074 no grupo usando 6-OHDA como precursor do processo neurodegenerativo.

Outro miRNA identificado com expressão apenas no grupo controle foi o Mir1249. A análise transcriptômica de Mir1249 revelou a ausência de expressão no grupo com 6-OHDA. Contudo, a literatura aponta este miRNA envolvido no processo de regulamentação da DP (LI et al., 2013) e relacionado também no processo

inflamatório, em modelo de estudo de doença hepática (MURAKAMI et al., 2012). De acordo com Li e colaboradores (2013), o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (*GDNF*) modula a expressão diferencial de 143 miRNA entre eles os miRNA1249. As análises por qRT-PCR e ensaios de microarranjos de cDNA em células MN9D submetidas a 6-OHDA e ao tratamento com *GDNF*. De acordo com o autor, a mudança de expressão permitiu a regulamentação de diversos processos biológicos, tais como transdução de sinal a nível transcricional. Estes achados estão em desacordo com os obtidos no presente estudo, entretanto, alguns fatores podem ter ocasionado estas diferenças, dentre eles a metodologia aplicada no modelo de DP, como concentração da toxina aplicada, o período de análise do estudo.

Alguns dos genes referentes aos miRNAs encontrados nesse estudo são citados pela primeira vez na literatura (Mir6314, Mir6333), além destes, foi percebido níveis de expressão diferenciados nos grupos estudados (Sham e 6-OHDA) ambos relacionados ao processo degenerativo mediado por vias apoptóticas e vias inflamatórias (dados não mostrados).

Além dos miRNAs, outro âmbito de análise de expressão gênica envolvendo desordens neurodegenerativas que tem ganhado respaldo é a análise de isoformas transcricionais ou *splicings* alternativos (BEYER et al., 2012). As diferenças entre os domínios de isoformas não só dão origem a variações funcionais, mas também alteraram as sequências de aminoácidos primários (LUO et al., 2004). Adicionalmente, muitos dos mecanismos de regulação da tradução dessas proteínas são providos de variantes transcricionais reguladas por miRNAs (KARPOVA et al., 2014). Uma área importante do uso da investigação de *splicings* alternativos é em estudos envolvendo patologias (LUO et al., 2004).

Dentre os genes envolvidos diretamente no processo de desenvolvimeto dos sintomas parkinsonianos, destacam-se os genes envolvidos na neuroinflamação, oxidação e neuroproteção. Neste, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) que é um dos genes melhor caracterizado, está envolvido na função de sobrevivência, diferenciação celular e com capacidade de reverter lesão neuronal associada a diversas doenças neurodegenerativas e desordens psiquiátricas (BUCKLEY et al., 2011).

Além do controle de transcrição exercido pelos promotores distintos que compõe as variantes transcricionais, a expressão do BDNF pode sofrer um processamento

externo e gerar regiões 3' e 5'UTR de tamanhos variados. Allen e colaboradores (2013) demonstraram que RNAs com regiões distintas de 3'UTR regulam de forma diferenciada a síntese proteica de BDNF no cérebro. Nesse estudo, foi relatado que uma proteína de ligação a RNA neural, HuD, interage com regiões 3'UTR do gene BDNF. Essa interação é necessária e suficiente para a estabilização seletiva do RNAm de BDNF mais precisamente em regiões 3'UTR longas. Tais fatos foram verificados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Resultados complementares desenvolvidos pelos autores em estudo com cultura de células identificam que HuD regula a expressão de BDNF, aumentando sua expressão através da interação com regiões 3'UTR longas.

Estudos adicionais revisados por Karpova e colaboradores (2014) propõem que as variantes transcricionais 5' e 3'UTR são ferramentas celulares complexas em resposta temporal e espacial de transcritos de BDNF. Na literatura, uns dos reguladores de transcrição mensurados como capazes de interagir com regiões não codificadoras são os miRNAs, particularmente no gene BDNF a interação desses pequenos RNAs não codificadores é comumente atribuída às regiões 3'UTR (MELLIOS et al., 2008; GAO et al., 2015; VARENDI et al., 2015). Contudo, estudos adicionais têm sugerido que apesar da região 3'UTR ter alta prevalência de sítios regulatórios, a interação de miRNAs a regiões 5'UTR (MORETTI et al., 2010; ZHOU et al., 2014), regiões codificadoras (CDS) (ZHOU et al., 2014) e a *open reading frames* (ORFs) (MORETTI et al., 2010) podem assemelhar-se ao processo de regulação gênica exercido pela 3'UTR. Desta forma, é plausível a atribuição de que a diferença de expressão das isoformas de BDNF analisadas no presente estudo possam ser reguladas por suas diferentes regiões 5'UTR.

Neste trabalho, foram obtidos achados inovadores na área de neurotranscriptômica em modelo parkinsoniano *in vivo* induzido por 6-OHDA. Dentre eles, a identificação de miRNAs citados pela primeira vez na literatura, miRNA6333 e miRNA6314, ambos alterados no grupo 6-OHDA; a mensuração de funcionalidade do miRNA3074 com a inibição via apoptótica a partir de dados complementares obtidos da literatura e a atribuição da diferença de expressão das isoformas do gene BDNF relacionadas com suas respectivas regiões 5'UTR.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi identificado alterações nos níveis de miRNA e nos perfis de *splicing* alternativo de genes com relevância neuronal provocadas pelo 6-OHDA. Dentre os principais achados, sugere-se, pela primeira vez na literatura, o envolvimento dos miRNAs, Mir6314 e Mir6333, no mecanismo de neurodegeneração. Adicionalmente, foi verificado variantes transcricionais do gene BDNF e o nível de expressão destas. Percebeu-se que independente do produto proteico resultante, o nível de expressão transcricional pode variar e um dos fatores que contribuem para a essa diferença de nível transcricional são as regiões não codificadoras, mais precisamente, nesse estudo, é atribuído a região 5'UTR, e as interações que miRNAs podem influenciar nessa região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M.; BIRD, C.; FENG, W.; LIU, G.; LI, W.; PERRONE-BIZZOZERO, N. I.; FENG, Y. HuD Promotes BDNF Expression in Brain Neurons via Selective Stabilization of the BDNF Long 3'UTR mRNA. **Plos one**, 2013
- AMMAL, K. N.; TARANNUM, S.; THOMAS, B. Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities. **Neurotherapeutics** 10, 698–708, 2013
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 15 de dezembro de 2014
- ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A.; VANDERLEI, E. DE S.; DE PAULA, G. A.; LIMA, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Iota-carrageenans from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. **Acta Scientiarum Technology**, v. 34, p. 127-135, 2012
- BALLATORE, C.; LEE, V.; TROJANOWSKI, J. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nat. Rev. Neurosci.** 8:663–72, 2007
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215-33. 2009
- BAUMANN, C. R. Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. **Parkinsonism and Related Disorders**, v.18, Supl. 1, p. S90-S92, 2012
- BEAL, M. F. Parkinson's disease: a model dilemma. **Nature**, v. 466, p. S8–S10, 2010
- BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in Bioscience**. v. 6, p. 65-74, Jan, 2014
- BELCHIOR, L. D. **Caminhada controlada na esteira em pacientes com Doença de Parkinson: influência sobre a marcha, equilíbrio e em medidas plasmáticas de parâmetros oxidativos e neurotrofina**. 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**. 24(4), p.308-318, 2002
- BEYER, K.; MUNOZ-MARMOL, A. M.; SANZ, C.; MARGINET-FLINCH, R.; FERRER, I.; ARIZA, A. New brain-specific beta-synuclein isoforms show expression ratio changes in Lewy body diseases. **Neurogenetics**. V.13, p.61–72, 2012
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from de past. **Parkinsonism Relat. Disord**, v.2, p. 124-29, 2008
- BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J. Biomed. Biotechnol.** 2012

BLUM, D; TORCH, S; LAMBENG, N; NISSOU, M; BENABID, A.L; SADOUL, R; VERN, J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.** v.65, p.135-172, 2001

BOLLATI, V.; BACCARELLI, A. Environmental epigenetics. **Chronobiology international**, v. 27, n. 5, p. 1093-1104, 2010

BORTOLANZA, M. **Estudo da Interação Entre o Núcleo Tegmentar Pedunculopontino e a Substância Negra Pars Compacta Nos Processos de Aprendizagem e Memória**. 2010. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010

BOVÉ, J.; PERIER, C. Review: Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 21, p. 51-76, 2012

BRAAK, H.; TREDICI, K. D.; RÜB, U.; DE VOS, R. A. I.; STEUR, E. N. H. J.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**. v.24, p.197–211, 2003

BUCKLEY, P.F.; PILLAI, A.; HOWELL, K.R. Brain-derived neurotrophic factor: findings in schizophrenia. **Curr Opin Psychiatry**. v. 24, p.122–127, 2011

CARDOSO, F.; TEXEIRA, A. L.; CAMARGOS, S.; MAIA, D. P. Importância dos Agonistas Dopaminérgicos nas Fases Inicial e Avançada da Doença de Parkinson. **Neurociências**. v. 14(3), p. 161-165, 2006

CARTA, M.; Bezard, E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. **Neuroscience**, n. 198, p. 245–251, 2011

CHIANG, H. C. et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. **Genes & Development**. 24:992–1009, 2010

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol- chloroform extraction. **Anal Biochem**. 162:156-9. 1987

CLEMENT, M. V.; LONG, L. H.; RAMALINGAM, J.; HALLIWELL, B. The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture. **J. Neurochem**. 81:414–421, 2002

COGNATA, V. L.; D'AGATA, V.; CAVALCANTI, F.; CAVALLARO, S. Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? **Neurogenetics**. v.16, p. 245–263, 2015

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease A Review. **Clinical Review & Education JAMA**, n. 311, v. 16, p. 1670-1683, 2014

CORDERO, F. et al. Differentially methylated microRNAs in prediagnostic samples of subjects who developed breast cancer in the European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer (EPIC-Italy) cohort. **Carcinogenesis**. 2015

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, 889–909, set. 2003

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**. v.62, p. 132–144, fev.2013

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, p. 1357–1391, 2011

EACKER, S. M.; KEUSS, M. J.; BEREZIKOV, E.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Neuronal activity regulates hippocampal miRNA expression. **PLoS One**. v.6(10), 2011

ESSELINK, R. A.; DE BIE, R. M.; DE HAAN, R. J.; LENDERS, M. W.; NIJSSEN, P. C.; VAN LAAR, T. Long-term superiority of subthalamic nucleus stimulation over pallidotomy in Parkinson disease. **Neurology**, n.73, p. 151–153, 2009

EXNER, N.; LUTZA, K.; HAASS, C.; WINKLHOFER, K. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. **EMBO Journal**. 31, 3038–3062, 2012

FARLOW, J.; PANKRATZ, N. D.; WOJCIESZEK, J.; FOROUD, T. Parkinson Disease Overview. **GeneReviews Advanced Search**. 2014 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1223/>> Acesso em: 30 Julho 2015

FENG, Y.; JANKOVIC, J.; WU, Y. C. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. 349, 2015

FERRER, I. Neuropathology and Neurochemistry of Non motor Symptoms in Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**. 2011

FILHO, J. G. A. ANÁLISES TRANSCRIPTOMICA E PROTEÔMICA DE SEMENTES DE CAJUEIRO *Anacardium occidentale* L) VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. 2013. 198f. Tese (Doutor em Bioquímica) – Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013

FILHO, V. P. P. Análise Da Qualidade De Vida Na Doença De Parkinson: Correlação Entre As Escalas De Estadiamento De Hoehn E Yahr Modificada E O Questionário De Qualidade De Vida Pdq-39. 2009. 58f. Monografia (Curso de Fisioterapia) –Universidade da Amazônia, Belém, Pará, 2009

GAO, H. M.; ZHANG, F.; ZHOU, H.; KAM, W.; WILSON, B.; HONG, J. S. Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. **Environ. Health Perspect.** v. 6, p. 807–814, 2011

GAO, Y.; SU, J.; GUO, W.; POLICH, E. D.; MAGYAR, D.P.; XING, Y.; LI, H.; SMRT, R. D.; CHANG, Q.; ZHAO, X. Inhibition of miR-15a Promotes BDNF Expression and Rescues Dendritic Maturation Deficits in MeCP2-Deficient Neurons. **STEM CELLS**. v.33, p. 1618–1629, 2015

GONG, Q.; LU, Z.; HUANG, Q.; RUAN, L.; CHEN, J.; LIANG, Y.; WANG, H.; YUE, Y.; FENG, S. Altered microRNAs expression profiling in mice with diabetic neuropathic pain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.456, p. 615-620, 2015

HAO, B.; CHEN, X.; DONGWEI DAI; ZOU, C.; WU, X.; CHEN, J. Bioinformatic analysis of microRNA expression in Parkinson's disease. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, p.1079-1084, 2015

HARRAZ, M. M.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. MicroRNAs in Parkinson's disease. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. v. 42, p.127–130, 2011

HERNÁN, M. A.; TAKKOUCHE, B.; CAAMÃNO-ISORNA, F.; GESTAL-OTERO, J.J. Ameta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. **Ann. Neurol.** 52:276–84, 2002

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. n. 79, v. 4, p. 368–376, 2008

KARPOVA, N. N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. **Neuropharmacology**. v.76, p. 709–718, 2014

KAVIRAJA, U.; CHEN, R. Motor cortical plasticity in Parkinson disease. **Front Neurol.**, n. 4, v. 128, p. 1-69, 2013

KAWAMATA, T., TOMARI, Y. Marking RISC. **Trends Biochem Sci**. v.35, p. 368-76, 2010

KAWASHIMA, H.; NUMAKAWA, T.; KUMAMARU, E.; ADACHI, N.; MIZUNO, H.; NINOMIYA, M.; KUNUGI, H.; HASHIDO, K. Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression. **Neuroscience**, v.165, pp. 1301–1311, 2010

KIM, J.; INOUE, K.; ISHII, J.; VANTI, W. B.; VORONOV, S. V.; MURCHISON, E. et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. **Science**. 317:1220–4, 2007

KLEIN, C.; WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.2, 2012

KOBYLECKI, C.; CROSSMAN, A. R.; RAVENSCROFT, P. Alternative splicing of AMPA receptor subunits in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. **Experimental Neurology**. v.247, p. 476–484, 2013

KOLK, N. M. VAN DER; KING, L. A. Effects of exercise on mobility in people with Parkinson's disease. **Mov Disord.**, n. 15, v. 28, p. 1587-1596, 2013

KWAK, P. B.; IWASAKI, S. et al. The microRNA pathway and cancer. **Cancer Sci**. v.101, p.2309-15, 2010

- LANDGRAVE-GÓMEZ, J.; MERCADO-GÓMEZ, O.; GUEVARA-GUZMÁN, R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v.6, fev. 2015
- LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, v. 10, p., 2009
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v.75, pp. 843–854, 1993
- LESAGEA, S.; BRICEA, A. Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. 18S1 S66–S70, 2012
- LI, L.; CHEN, H.; CHEN, F.; et al. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on microRNA expression in a 6-hydroxydopamine-injured dopaminergic cell line. **Journal of Neural Transmission**. v.120, p.1511-1523, 2013
- LILL, C. M. et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. **PLoS Genet**. v.8(3), mar 2012
- LUNDY-EKMAN, L. Neurociência: fundamentos para a reabilitação. Tradução de Fernando Diniz Mundim et. al. 3ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 202-210, 2008
- LUO, M.H.; LESKI, M.L.; ANDREADIS, A. Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. **J Cell Biochem**. v. 91, p.880-895
- LUSARDI, T.A.; FARR, C.D.; FAULKNER, C.L.; PIGNATARO, G.; YANG T, L.A.N. J.; et al. Ischemic preconditioning regulates expression of microRNAs and a predicted target, MeCP2, in mouse cortex. **J Cereb Blood Flow Metab**. V.30, p. 744-756, 2010
- MA, L. et al. Advances with microRNAs in Parkinson’s disease research. **Drug Design, Development and Therapy**. v.7, p. 1103–1113, 2013
- MACHADO, A.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia Funcional**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 2013
- MCDOWELL, K.; CHESSELET, M. F. Animal models of the non-motor features of Parkinson’s disease. **Neurobiol. Dis**. 46:597–606, 2012
- MCKEITH, I. G.; DICKSON, D. W.; LOWE, J.; EMRE, M.; O’BRIEN, J. T. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. **Neurology**, v. 65, p. 1863–72, 2005
- MELLIOS, N.; HUANG1, H.; GRIGORENKO, A.; ROGAEV1, E.; AKBARIAN, S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. **Hum. Mol. Genet**. v.17, p. 3030-3042, 2008

MELO, L. M.; BARBOSA, E. R.; CARAMELLI, P. Declínio cognitivo e demência associados à doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 34(4), p.176-183, 2007

Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF, 2014

MORETTI, F.; THERMANN, R.; HENTZEM, W. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. **RNA**. v. 16, p. 2493–2502, 2010

MULLIN, S.; SCHAPIRA, A. The genetics of Parkinson's disease. **British Medical Bulletin**. 114:39–52, 2015

MURAKAMI, Y.; TOYODA, H.; TANAHASHI, T.; TANAKA, J.; KUMADA, T.; YOSHIOKA, Y.; KOSAKA, N.; OCHIYA, T.; TAGUCHI, Y. Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease. **journal.pone**. 2012

MURPHY, K. E. et al. Lysosomal-associated membrane protein 2 Isoforms Are Differentially Affected in Early Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 2015

NDIKA, J. D. T.; MUNOZ, C. M.; ANAND, N.; DOOREN, S. J. M.; KANHAI, W.; SMITH, D. E. C.; JAKOBS, C.; SALOMONS, G. S. Post-transcriptional regulation of the creatine transporter gene: Functional relevance of alternative splicing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1840, p. 2070–2079, 2014

NELSON, P.T.; WANG, W.X. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. **J Alzheimers Dis**. v.21, p.75-79, 2010

NUYTEMANS, K., THEUNS, J., CRUTS, M.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7 and LRRK2 genes: a mutation update. **Hum.Mutat**. v.31, p.763–780, 2010

OLENA, A. F., PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **J Cell Physiol**, v. 222, p. 540-5, 2010

OLIVEIRA, J. C. Epigenética e doenças humanas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.33, p. 21-34, 2012

PACKER, A.N.; XING, Y.; HARPER, S.Q.; JONES, L.; DAVIDSON, B.L. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. **J Neurosci**. v.28, 2008

RODRIGUES, A., GRIFFITHS-JONES, S., et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Res**. n.10A, p.1902-10, 2004

ROSSO, A. L. Z.; NICARETTA, D. H.; MATTOS, J. P. Anatomoclinical Correlation in Parkinson's Disease. **Revista Brasileira de Neurologia**. v. 44, 2008

RUIZ, C. R.; SHI, J.; MEFFERT, M. K. Transcript specificity in BDNF-regulated protein synthesis. **Neuropharmacology**, v.76, p.657-663, 2013

- SCHAPIRA A. H. V., BEZARD, E.; BROTHIE, J.; et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p.845-854, 2006
- SHAKOLA, F.; SURI, P.; RUGGIU, M. Splicing Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines: At the Interface of the Neuroendocrine and Immune Systems. **Biomolecules**. v. 5, p. 073-2100, 2015
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in Cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010
- SHULMAN, J. M.; JAGER, P. L. DE; FEANY, M. B. Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** v.6, p.193–222, out. 2011
- SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11(3,4), p. 151-167, 2007
- SINGLETON, A. B.; FARRER, M. J.; BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. **Mov Disord.**, n. 28, p. 14–23, 2013
- SOREQ, L.; SALOMONIS, N.; BRONSTEIN, M.; GREENBERG, D. S.; ISRAEL, Z.; BERGMAN, H.; SOREQ, H. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 6, 2013
- SOUZA, R. B. **ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria cornea*: NOVAS PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS E IMPLICAÇÕES NEUROFARMACOLÓGICAS**. 2015. 258f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2015
- TAN, L.; YU, J.; TAN, L. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**. v.51, p.1249–1262, 2015
- THOMAS, B.; BEAL, M. F. Molecular insights into Parkinson's disease. **Medicine Reports**. 3:7, 2011
- TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S.; FERREIRA, A. F. B.; SANTOS, T. O.; GABRIELA P. CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H. Y.; FERRO, E. S.; SCAVONE, C.; BRITTO, L. R. G. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Rev Bras Psiquiatr**. v. 34, p.194-218, out. 2012
- TRAPNELL, C.; et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocol*, v. 7, p. 562-578, 2012
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, v. 25, p. 1105-1111, 2009
- TRINH, J.; FARRER, M. Advances in the genetics of Parkinson disease. **Nat. Rev. Neurol**. v. 9, p. 445–454, jul 2013

VALADAS, J. S, VOS, M.; VERSTREKEN, P. Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models. **Ann N Y Acad Sci**, 2014

VARENDI, K.; MÄTLIK, K.; ANDRESSOO, J. From microRNA target validation to therapy: lessons learned from studies on BDNF. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 1779-1794, 2015

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, 2014

VILLAGRA, U. M. M. **Análise de *splicing* alternativo utilizando dados de sequências expressas**. 2009. Tese (Doutor em Ciências, Genética) – Pós-graduação em Ciências, Genética pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

WANG, Z.; FANG, B.; CHEN, J.; ZHANG, X.; LUO, Z.; HUANG, L.; CHEN, X.; LI, Y. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **BMC genomics**, v. 11, n. 726, 2010

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature**. 2009. v.10, p.57-63

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**. 26:p. 1–58, abr. 2011

ZHOU, H.; RIGOUTSOS, I. MiR-103a-3p targets the 5'UTR of GPRC5A in pancreatic cells. **RNA**. v. 20, p. 1-9, 2014