Beatriz Raposo Corradini

Análise de redes de interação transcricional na substância nigra, locus cerúleo e núcleo dorsal do nervo vago na Doença de Parkinson

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho

SÃO PAULO
2013

Beatriz Raposo Corradini

Análise de redes de interação transcricional na substância nigra, locus cerúleo e núcleo dorsal do nervo vago na Doença de Parkinson

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho

SÃO PAULO
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corradini, Beatriz Raposo

Análise de redes de interação transcricional na substância nigra, locus cerúleo e núcleo dorsal do nervo vago na doença de Parkinson / Beatriz Raposo Corradini. -- São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria

Orientador: Carlos Alberto Moreira Filho.

Descritores: 1.Doença de Parkinson 2.Genômica 3.Redes de interação transcricional 4.Substância nigra 5.Nervo vago

USP/FM/DBD-043/13

A meus pais e meus irmãos, pelo incentivo, apoio e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos A. Moreira-Filho, por ter me recebido em seu laboratório, primeiramente como bolsista de iniciação científica e depois como pós-graduanda.

À equipe do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos do Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da FMUSP e, especialmente, à Dra. Lea T. Grinberg, pela valiosa colaboração na seleção dos casos incluídos neste estudo, e à Edilaine Tampellini pela colaboração na obtenção das amostras biológicas utilizadas nos experimentos de genômica funcional.

À equipe do Laboratório de Genômica Pediátrica do Departamento de Pediatria da FMUSP, onde este trabalho foi realizado. Destaco particularmente o auxílio recebido da Dra. Patrícia Locosque Ramos (atualmente no Depto. de Biofísica da Unifesp) para a realização dos experimentos utilizando DNA microarrays, bem como a revisão das análises de bioinformática conduzida pela Dra. Silvia Yumi Bando e por Priscila Iamashita.

À equipe do Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica (LIM-36) pelo apoio técnico e administrativo durante a realização deste trabalho e, sobretudo, à Thais Scudelletti, secretária do Laboratório.

Ao Departamento de Pediatria da FMUSP, por ter me concedido bolsa durante o início de minhas atividades como pós-graduanda e à CPG-Pediatria pela concessão de bolsa de mestrado da CAPES.

Este trabalho foi financiado pelos auxílios FAPESP 06/61.333-3 e CNPq 305635/2009-3, concedidos ao Prof. Dr. Carlos A. Moreira-Filho, e pelo auxílio ABADHS-FAPESP concedido ao Prof. Dr. Luiz Augusto Franco de Andrade.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

I) Introdução **09**

II) Objetivos **23**

III) Material e Métodos **24**

IV) Resultados **27**

V) Discussão **63**

VI) Conclusões **72**

VI) Referências Bibliográficas **73**

RESUMO

Corradini BR. *Análise de redes de interação transcricional na substância nigra, locus cerúleo e núcleo dorsal do nervo vago na doença de Parkinson* [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUÇÃO: A doença de Parkinson é causada pela perda significativa de neurônios dopaminérgicos na substância nigra e perda celular no locus cerúleo, com perda do neurotransmissor dopamina e continuada deposição de inclusões proteicas nos tecidos cerebrais. A doença tem progressão caudo-rostral, iniciando-se no núcleo dorsal do nervo vago e, em grau menor, nos sistema olfativo, com evolução para o mesencéfalo e posteriormente para o prosencéfalo e neocórtex. Cerca de 90% dos casos são idiopáticos e o principal fator de risco é o envelhecimento. Para se compreender a interação genoma-ambiente e o mecanismo molecular nessa doença têm sido conduzidas investigações dos perfis de expressão gênica global em diversos tecidos-alvo. Essa abordagem de genômica funcional utiliza a tecnologia de DNA *microarrays* para estudo da expressão gênica e ferramentas de bioinformática para análise dos dados gerados. Neste trabalho foi feita uma análise das redes de interação transcricional em tecidos-alvo da doença de Parkinson utilizando-se amostras post mortem de tecidos cerebrais obtidas de pacientes e controles livres da doença. MÉTODOS: Estudo comparativo das redes de interação transcricional no núcleo dorsal do nervo vago, locus cerúleo e substância nigra entre pacientes com doença de Parkinson idiopática nos estágios Braak 4-5 e controles livres da doença utilizando material de necropsia. Foram utilizados DNA *microarrays* Agilent de 44 K e a análise estatística comparativa de dos transcritos válidos (TMEV) foi feita no vetor paciente X controle para cada região anatômica sob estudo. Para a análise das redes de interação transcricional dos grupos de pacientes e controles em cada região anatômica utilizou-se o software FunNet e as anotações genômicas do Gene Ontology Consortium. RESULTADOS: Os genes com maior número de ligações gene-gene em cada rede transcricional, ou hubs, foram identificados e correlacionados com sua função biológica e possível papel na doença de Parkinson. A análise comparativa entre o perfil de hubs (número de ligações, posição na rede) em cada região anatômica para pacientes e controles revelou que: i) no núcleo dorsal do nervo vago os hubs principais nas redes de controles e pacientes estão relacionados a funções de manutenção da homeostase cerebral e organização neuronal, ii) no locus cerúleo os hubs principais dos controles são genes ligados à manutenção das funções cerebrais, mobilização de células progenitoras (pericitos) e controle de vias inflamatórias, enquanto que na rede de pacientes esses hubs estão ligados aos processos de endo e exocitose, desenvolvimento neuronal e controle do estresse oxidativo e degradação de proteínas; iii) finalmente, na substância nigra os principais hubs da rede de controles estão envolvidos na proteção contra estresse oxidativo e proteínas não dobradas e na manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico, enquanto que na rede de pacientes predominam hubs ligados a processos epigenéticos de envelhecimento mitocondrial, transporte vesicular, neurogênese, inflamação e morte neuronal. CONCLUSÕES: Os resultados da análise de redes de interação transcricional de pacientes e controles em diferentes regiões anatômicas são compatíveis com o modelo de progressão caudo-rostral da doença de Parkinson e apontam para mecanismos compensatórios no núcleo dorsal do nervo vago e locus cerúleo.

Descritores: Doença de Parkinson; genômica; redes de interação transcricional; substância nigra; locus cerúleo; nervo vago

ABSTRACT

Corradini BR. *Transcriptional interaction network analyses in substantia nigra, locus coeruleus and dorsal nucleus of vagus nerve in Parkinson's disease* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013

INTRODUCTION: Parkinson's disease is caused by a substantial loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and cell loss in locus coeruleus, concomitant loss of dopamine neurotransmitter and continuing deposition of protein within the brain as intracellular inclusions. The disease has a caudal-rostral progression, beginning in the dorsal nucleus of vagus nerve and, in a less extent, in the olfactory system, progressing to the midbrain and finally to the basal forebrain and the neocortex. About 90% of the cases are idiopathic and the main risk factor is ageing. In order to have a better understanding of the genome-environment interactions and of the molecular mechanisms involved in this disease, the investigation of global gene expression in different target tissues has been conducted. This functional genomic approach is based on DNA microarray technology and on the use of bioinformatics for analyzing the data. In the present work an analysis of transcriptional interaction networks in Parkinson's disease target tissues was conducted in post mortem cerebral tissue samples obtained from patients and disease-free controls. METHODS: Comparative study of transcriptional interaction networks in the dorsal nucleus of vagus nerve, locus coeruleus, and substantia nigra of idiopathic Parkinson's disease patients in Braak stages 4-5 and disease-free controls using post mortem tissue samples. Agilent 44 K DNA microarrays were used and the statistical comparative analysis of valid transcripts was accomplished (TMEV) in the vector patient X control for each anatomic region under study. In order to analyze the transcriptional interaction networks for patient and control groups in each anatomic region the FunNet software and the Gene Ontology genomic annotations were used. RESULTS: The genes with high number of gene-gene connections in each transcriptional network, or hubs, were identified and related to their biological function and putative role in Parkinson's disease. The comparative analysis between hub profiles (number of connections, position in the network) in each anatomic region for patients and controls revealed that: i) in the dorsal nucleus of vagus nerve the main hubs in patient and control networks are related to the maintenance of brain homeostasis and to neuronal organization; ii) in the locus coeruleus the main hubs of control network are related to the maintenance of brain functions, mobilization of progenitor cells (pericytes) and control of inflammatory pathways, whereas in the patient network the main hubs are linked to exo and endocytosis processes, neuronal development and control of oxidative stress and protein degradation; iii) finally, in the substantia nigra the main hubs in the control network are related to protection against oxidative stress and unfolded/misfolded proteins and in the maintenance of the midbrain dopaminergic system, whereas in the patient network the main hubs are related to epigenetic processes of mitochondrial ageing, vesicular transport, neurogenesis and inflammation and neuronal death. DISCUSSION: The results of transcriptional interaction networks analyses performed for patient and control groups in different anatomic regions are compatible with the caudal-rostral model of Parkinson's disease progression and point out to compensatory mechanisms acting in vagus nerve and locus coeruleus.

Descriptors: Parkinson disease; genomics; transcriptional networks; substantia nigra; locus coeruleus; vagus nerve

I) INTRODUÇÃO

I-1) A Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, superada apenas pela Doença de Alzheimer, com prevalência estimada de 0,5 a 1% na faixa etária de 65-69 anos e de 1 a 3% entre pessoas com mais de 80 anos (Nussbaum e Ellis, 2003). Uma incidência maior em homens foi verificada em populações ocidentais, mas não em asiáticas (Taylor et al., 2007). Cerca de 90% dos casos de DP são idiopáticos (não hereditários) e o principal fator de risco para a doença é o envelhecimento, sendo que lesões cerebrais traumáticas e exposição a compostos neurotóxicos, como Paraquat (herbicida), Rotenona (pesticida) e MPTP (heroína sintética), também podem contribuir para esse risco (Hansen e Li, 2012). Os casos hereditários são, em sua maioria, determinados por mutações em alguns genes mendelianos (Scholz et al., 2012). Mutações dominantes em SNCA, que codifica a alfa-sinucleína (ver adiante), e LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase*), juntamente com mutações recessivas em Parkin (E-3 ubiquitina quinase), DJ-1 (chaperona antioxidativa) e PINK1 (*PTEN induced–kinase 1*) contribuem para cerca de 3% de todos os casos de DP (Klein e Lohmann-Hedrich, 2007). A DP merece atenção especial por estar associada à redução da expectativa de vida comparativamente à população geral (Ishiara et al., 2007; Forsaa et al., 2010), além do impacto da morbidade, com importante redução da qualidade de vida (Forsaa et al., 2010).

A DP é uma doença de instalação lenta e progressiva, caracterizada clinicamente pela presença de sintomas cardinais componentes de uma tríade: bradicinesia ou acinesia, rigidez muscular e tremores de repouso (Jankovic, 2012). Neuropatologicamente, a doença é caracterizada por uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos na camada ventrolateral da substantia nigra (SN) *pars compacta* e perda celular no locus cerúleo (LC) (Kingsbury et al., 2010). Além disso, neurônios sobreviventes nessas regiões apresentam inclusões proteicas circulares e eosinofílicas denominadas corpúsculos de Lewy (CL). Por vezes esses neurônios com inclusões proteicas podem apresentar prolongamentos neuronais dilatados, sendo denominados neuritos de Lewy (NL). No entanto, a morte celular e a presença de inclusões não ocorrem exclusivamente na SN e LC, sendo detectadas em múltiplas regiões no sistema nervoso periférico de pacientes com a DP. Incidentalmente, corpúsculos de Lewy também podem ser encontrados em indivíduos neurologicamente normais (Kingsbury et al., 2010).

Os corpúsculos de inclusão intraneuronais são compostos em grande parte por

acúmulo da proteína alfa-sinucleína estrutruralmente alterada (Hansen e Li, 2012; Marques e Outeiro, 2012). A alfa-sinucleína (α-syn) é uma proteína de 140 aminoácidos codificada pelo gene SCNA e expressa em neurônios. A α-syn está envolvida no trafego vesicular interagindo com o complexo de proteínas SNARE (acrônimo de *SNA*P - Soluble NSF Attachment Protein - *R*eceptor) nos terminais pré-sinápticos (Burré et al., 2010). Em determinadas condições, ainda não completamente esclarecidas, esta proteína, sofre uma mudança conformacional em neurônios susceptíveis, geralmente longos e pouco mielinizados ou amielinizados (Braak et al., 2004; Chung et al.,. 2005). Esta mudança de conformação aumenta a afinidade da alfa-sinucleína pela agregação entre si (formação de oligômeros) e com outras proteínas, o que resulta em depósito de formas insolúveis e, consequente interferência na função celular, comprometendo-a e levando à morte da célula (Hansen e Li, 2012). Apenas alguns dos muitos tipos celulares presentes no sistema nervoso central, principalmente neurônios dopaminérgicos, são suscetíveis a desenvolver os acúmulos de proteína e os corpúsculos de inclusão característicos da DP. Outros tipos de neurônios, mesmo que muito próximos dos acometidos, preservam sua morfologia e função habituais. Isto significa que a lesão cerebral que ocorre na DP não é randômica, obedecendo a um padrão característico de distribuição ao longo de sua evolução (Braak et al., 1998 e 2003). É interessante notar que o processo patológico que desencadeia a doença parece iniciar-se anos antes do surgimento das manifestações motoras, que ocorrem quando grande parte das regiões cerebrais suscetíveis à doença já foram afetadas (Savica et al., 2010; Obeso et al., 2010). Uma descrição mais detalhada desse processo está na seção I-2, adiante.

Na grande maioria dos casos de DP idiopáticos, foco deste estudo, as lesões intraneuronais ocorrem sequencialmente de acordo com um padrão de distribuição característico, começando em áreas bem definidas e evoluindo de maneira regular através das regiões suscetíveis da substância cinzenta. No sistema nervoso central, as primeiras lesões normalmente se iniciam em duas regiões principais: o núcleo dorsal motor do nervo vago (localizado no bulbo) e, no bulbo olfatório e porções anteriores do núcleo olfatório. (Del Tradici et al., 2002, Braak et al., 2003a). Em 2004 Braak et al. propuseram, a partir de estudos de imunoistoquímica, um modelo de estadiamento para a Doença de Parkinson (DP). Nesse trabalho, foram estudadas as lesões e as inclusões proteicas típicas desta doença – CL e NL- de acordo com a sua distribuição e quantidade, tentando-se fazer um paralelo entre a quantidade de inclusão e a severidade do acometimento da região, com a finalidade de facilitar a compreensão da progressão desta doença. Estas características podem ser agrupadas em seis estágios distintos que caracterizam progressivamente a evolução

da DP no sistema nervoso central conforme descrito a seguir e esquematizado nas **Figuras 1** e **2**.

Estágio 1 - O núcleo dorsal motor do vago, a formação reticular bulbar e o núcleo olfativo anterior são as estruturas comprometidas nesse estágio (Braak et al., 2003a). No estágio 1 o paciente ainda não apresenta manifestações clínicas características da DP, embora alterações neuropatológicas, como NLs no núcleo dorsal motor do vago e na zona reticular intermediaria situada a seu lado (Saha et al. 2004), já estejam presentes. O envolvimento da formação reticular bulbar leva a distúrbios do sono e as alterações no núcleo olfativo causam hiposmia e anosmia, distúrbios que podem preceder em muitos anos a tríade de sintomas clássicos da DP (Ferrer et al. 2011).

Estágio 2 - Neste estágio, as alterações neuropatológicas no núcleo dorsal motor do vago se adensam. Inclusões proteícas são encontradas no núcleo da rafe inferior e parte da formação reticular. Além disso, NLs podem ser vistos no lócus cerúleo (Saper et al. 1991, Braak et al. 2003a). Nos primeiros dois estágios da doença, a patologia se confina a áreas inferiores do tronco cerebral, bulbo e ponte, não atingindo o mesencéfalo. O comprometimento do locus cerúleo está associado ao fato de que muitos pacientes com DP apresentam dor primária de origem central como um das manifestações não-motoras da doença (O'Sullivan et al., 2008; Obeso et al., 2010).

Estágio 3 - Neste estágio, o processo patológico rompe os limites do tegumento pontino e avança para porções definidas do mesencéfalo. Nesta fase os primeiros NL e CLs podem ser vistos na parte compacta da substância nigra mesencefálica. No entanto, os neurônios melanocíticos (melanoneurônios) só são acometidos em fases posteriores, portanto macroscópicamente, não são visualizadas alterações morfológicas. As alterações neuropatológicas na substância nigra se iniciam no subnúcleo póstero-lateral e avançam para os subnúcleos postero-superior e postero-medial (Braak e Braak, 1986). Neste estágio também é possível constatar o envolvimento de regiões da amígdala no processo patológico (Braak et al. 1995; Bohus et al. 1996). O comprometimento da substância nigra (onde os melanoneurônios produzem dopamina) leva aos sintomas motores clássicos da DP. No entanto, isso só ocorre quando a perda celular nessa região se torna muito acentuada (60% ou mais). No estágio 3 já é possível o diagnóstico clínico da DP (Parkkinen et al., 2008).

Estágio 4 – Nesse estágio ocorre uma pronunciada perda de melanoneurônios na substância nigra *pars compacta* (Braak et al., 2003a). Esta fase é caracterizada pelo acometimento de uma região específica do córtex cerebral, a

porção de transição entre regiões do alocórtex e neocórtex. (Braak et al. 2003a). O mesocórtex anteromedial temporal é afetado assim como no segundo setor do corno de Ammon do hipocampo (Braak et al., 2004). Os sinais e sintomas clínicos da doença se iniciam em algum ponto da transição entre as fases 3 e 4, quando estruturas límbicas são afetadas (Thal et al., 2004).

Estágios 5 e 6 - No estágio 5 o comprometimento das áreas olfatórias torna-se muito acentuado (Braak et al. 2003a). São comprometidos o primeiro e o terceiro setores do corno de Ammon. Nesses estágios finais de evolução da DP o processo neurodegenerativo atinge sua extensão topográfica máxima. No estágio 5 as alterações neuropatológicas avançam do mesocórtex para o neocórtex (Braak et al., 2003) As porções vulneráveis da substância nigra mesencefálica apresentam-se pálidas macroscopicamente pela destruição de melanoneurônios. A partir do mesocórtex temporal, as inclusões atingem quase todo neocórtex, aparecendo inicialmente no córtex pré-frontal e nas áreas associativas sensoriais multimodais, depois no córtex pré-motor e áreas associativas sensoriais primárias e finalmente, nas áreas corticais primárias (Braak et al. 2003a; Braak et al., 2004). A caraterística marcante do estágio 6 é o envolvimento quase total do neocórtex. Nesta fase o portador da doença manifesta todos os sintomas da doença e grave incapacidade funcional devido ao acometimento cortical (Azuma et al. 2003; Rosso et al., 2008).

Com base na distribuição das inclusões de α-syn numa coorte de casos de DP e controles neurologicamente normais, Braak et al., (2003b) propuseram um modelo para a progressão da DP baseado numa progressão caudo-rostral, com início no núcleo dorsal do nervo vago e, em menor grau, no sistema olfativo (estágios 1 e 2), com evolução para o mesencéfalo (estágios 3 e 4) e, finalmente, para o prosencéfalo e neocórtex (estágios 5 e 6). Estudos recentes sobre o mecanismo molecular das sinucleinopatias (revistos em Hansen e Li, 2012, e em Marques e Outeiro, 2012) têm dado um crescente suporte a esse modelo, como será adiante comentado.

Kingsbury et al., (2010) conduziram um estudo imunoistoquímico para detecção de α-syn em tecidos do tronco cerebral de 25 casos patologicamente confirmados de DP que deu respaldo ao modelo de progressão da DP proposto por Braak et al.,. (2003), embora mostrando que a extensão da doença no córtex e a gravidade da patologia na medula eram independentes. Nesse mesmo trabalho os autores revisaram outros estudos imunoistoquímicos em sinucleinopatias (Kalaitzakis et al., 2008; Jellinger, 2009) que apresentaram dados com aderência variável ao modelo de progressão de Braak et al. (2003a e b): Conforme o estudo, de 6,3 até 47% dos casos não seguia esse modelo (Kingsbury et al., 2010). Em um dos estudos citados por Kingsbury et al., 18% dos casos estudados apresentavam um acometimento severo da

substancia nigra, locus cerúleo e apenas alteração leve do núcleo dorsal do nervo vago. Verificou-se que essas discrepâncias eram maiores nos casos de PD com demência e de demência associada a corpúsculos de Lewy. Esta variação histopatológica observada por Kingsbury et al. (2010) nos estudos prospectivo e retrospectivo de casos de sinucleinopatias pode estar relacionada às diferenças no tipo de resposta às diversas alternativas terapêuticas para essas doenças .

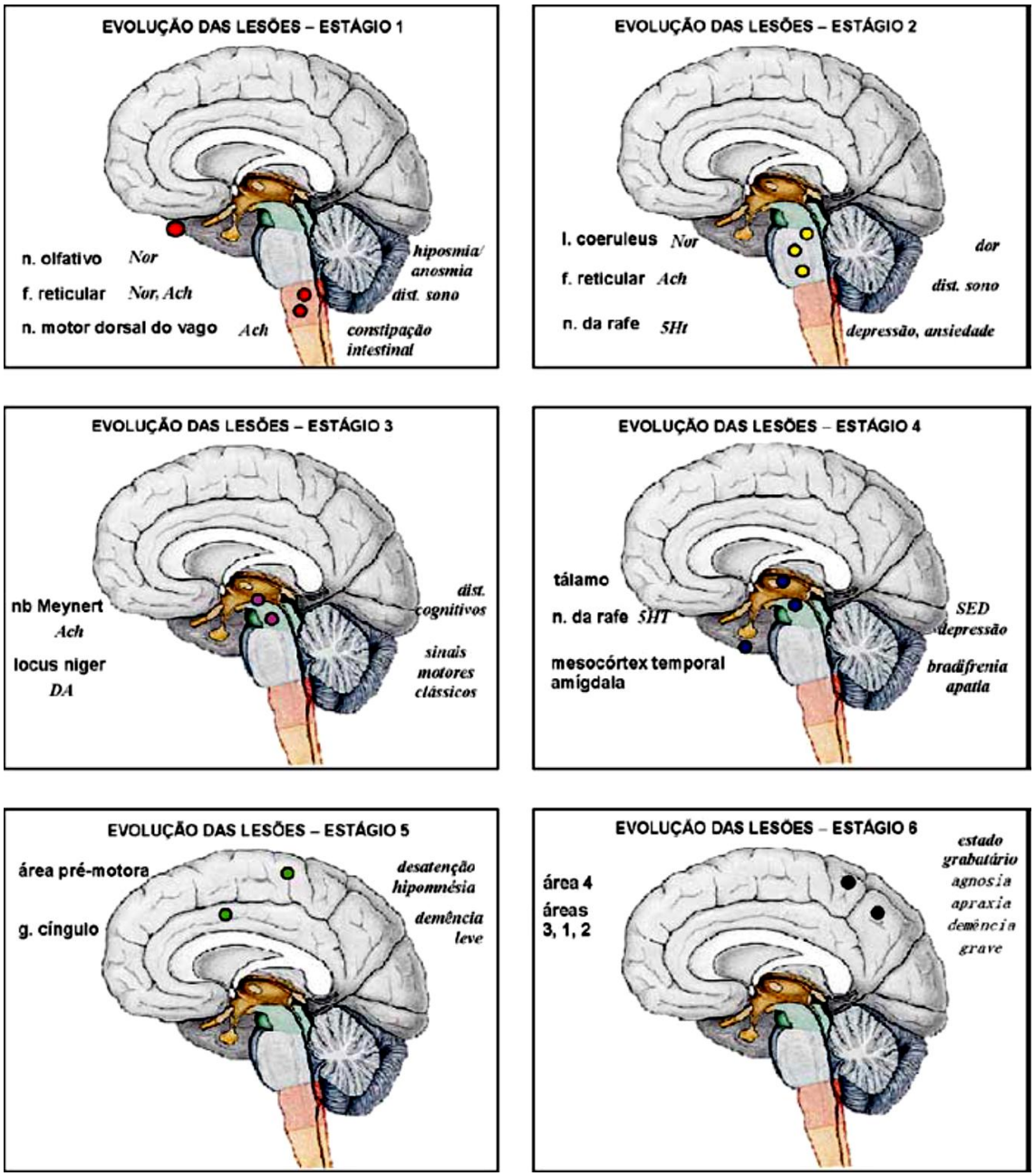

Figura 1: Evolução neuropatológica da doença de Parkinson segundo os estágios de Braak (Braak et al., 2003a) evidenciando as correlações clínicas. Adaptado de F.H. Netter, conforme Rosso et al. 2008.

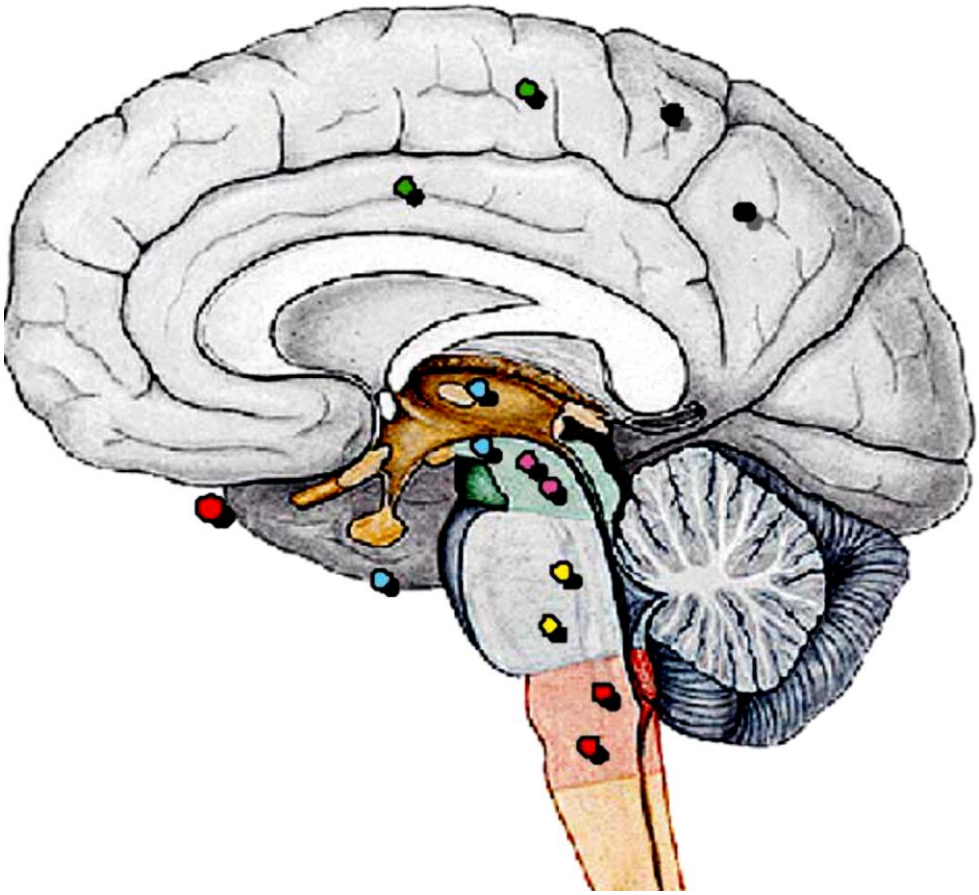

Figura 2. Esquema do encéfalo evidenciando as regiões anatômicas comprometidas nos diferentes estágios neuropatológicos da doença de Parkinson (Braak et al., 2003a). Os estágios são indicados pelas cores: 1 – vermelha; 2 – amarela; 3 – rosa; 4 – azul; 5 – verde; 6 – preta. Adaptado de F.H. Netter, conforme Rosso et al., 2008.

I-2) Mecanismos moleculares e celulares na Doença de Parkinson

A elucidação dos mecanismos moleculares e celulares causadores da DP teve um grande avanço nos últimos 25 anos, principalmente graças à convergência entre neurociência, biologia celular e genômica, o que permitiu uma melhor compreensão dos fatores ambientais e genéticos subjacentes ao fenômeno de perda dos neurônios dopaminérgicos nigrais (Schapira e Jenner, 2011; Scholz et al., 2012). O modelo de progressão caudo-rostral da doença, proposto por Braak et al.,aboradores (Braak et al. 2003b, 2004), baseado inicialmente em evidências imunoistoquímicas, foi respaldado nos últimos anos por diversos trabalhos que mostram que a α-sinucleína, o principal componente dos corpúsculos de Lewy, pode ser transmitido de neurônios afetados para neurônios sadios, disseminando a formação de agregados tóxicos nestes últimos, num mecanismo semelhante ao dos príons, embora sem a transmissão entre

indivíduos ou interespécies (Angot et al.,. 2010; Hansen e Li, 2012; Dunning et al.,. 2012). Por outro lado, com base em estudos sobre o papel de neurotoxinas, investigações post-mortem e pesquisa de defeitos genéticos em casos familiais de DP, tornou-se possível elucidar os mecanismos de morte celular na DP, revelando o papel fundamental das disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, alterações no manejo intracelular de proteínas/organelas e inflamação, que levam à disfunção neuronal e apoptose (Schapira e Jenner, 2011). Assim, nesta seção serão revistos os principais mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia e patogênese da DP.

Estresse oxidativo – O principal fator de risco para o desenvolvimento da DP idiopática é a idade e, no entanto, ainda não há uma compreensão clara de como o processo de envelhecimento está envolvido na etiologia dessa doença (Schapira e Jenner, 2011). A vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos a insultos ambientais com o avançar da idade deve, presumivelmente, refletir falhas crescentes na fisiologia e bioquímica celulares. Uma dessas falhas, muito relevante para a vulnerabilidade neuronal na DP, deriva do processo de regulação do influxo de cálcio em neurônios do núcleo motor dorsal do nervo vago (VA) e da SN *pars compacta* (SNc). Nesses neurônios a entrada de cálcio via canais do tipo L voltagem-dependentes, de elevada permeabilidade e inativação lenta, cria um estresse oxidativo basal que, com o tempo, pode levar à disfunção mitocondrial (Surmeier et al.,. 2011; Goldberg et al.,. 2012). O estresse oxidativo foi inicialmente associado à morte de neurônios dopaminérgicos devido à geração de espécies reativas de oxigênio derivadas da auto-oxidação de L-dopa e das vias de formação da neuromelanina (Spina e Cohen, 1989). A vulnerabilidade desses neurônios ao estresse oxidativo foi confirmada com os estudos sobre a neurotoxicidade da 6-OHDA (6-hidroxidopamina), uma substância que gera espécies reativas de oxigênio e leva à morte dos neurônios nigrais (Ungerstedt et al., 1974; Blesa et al., 2012). Mais ainda, mutações no gene *DJ-1* (1p36), que codifica uma proteína com função antioxidante, causam uma forma autossômica recessiva da DP, com início precoce (Cookson, 2012), fenotipicamente similar à causada por mutações no gene *Parkin* (6q25.2-q27), cuja atividade também está alterada em casos idiopáticos de DP (Klein e Lohmann-Hedrich, 2007; Corti et al., 2011). Presentemente, antagonistas dos canais de cálcio do tipo L tem sido propostos como uma nova estratégia para neuroproteção na DP idiopática (Surmeier et al. 2011; Surmeier and Schumacker, 2013).

Deficiências nos principais sistemas antioxidantes no cérebro – superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase - além de redução nos níveis de glutationa, e acúmulo de ferro na SNc, indicam que o estresse oxidativo que ocorre com o envelhecimento é efetivamente um mecanismo que contribui com a patogênese

na DP (Schapira e Jenner, 2011). Também foram descritos na DP danos oxidativos a lipídios, proteínas, e DNA confirmando que o estresse oxidativo atinge de forma ampla a funcionalidade das células. Além disso, o estresse oxidativo na DP não está confinado ao cérebro, uma vez que alterações em marcadores de estresse oxidativo foram detectadas em outros tecidos, sugerindo um processo de doença mais generalizado (Kikuchi et al., 2002; Surmeier et al., 2011). O que ainda não está esclarecido são a fonte e a natureza das espécies reativas de oxigênio envolvidas nesse processo.

Disfunção mitoncondrial – A mitocôndria é um dos produtores primários de espécies reativas de oxigênio intracelulares, que são os principais indutores de danos oxidativos. Os neurônios, como células metabolicamente ativas com grande demanda de energia, são dependentes da função mitocondrial para a geração desta energia. Alterações metabólicas neste sistema geram mais espécies reativas de oxigênio aumentando o estresse oxidativo (Correia et al., 2012).

A primeira evidência de que disfunções mitocondriais poderiam estar envolvidas na etiologia e patogênese da DP veio da descrição de deficiência do complexo I (NADH ubiquinona oxidoredutase) na substância nigra de pacientes que morreram com DP (Schapira et al., 1989). Posteriormente, defeitos mitocondriais foram descritos em outros tecidos de pacientes com DP (músculo, plaquetas, linfoblastos) (Schapira, 2008). A identificação dessas disfunções em casos esporádicos, num contexto de estresse oxidativo e níveis elevados de deposição de ferro em tecidos cerebrais, revelou a conexão entre estresse oxidativo e disfunção mitocondrial na DP (Shapira, 2008; Schapira e Jenner 2011). Um conjunto extenso de estudos de casos idiopáticos e genéticos de DP, além de modelos animais com neurotoxinas, sugere que a disfunção mitocondrial é uma característica inicial da patogênese (McCoy e Cookson, 2012; Perier e Vila, 2012). Evidências decisivas nesse sentido vieram com a descoberta de que genes causadores de formas recessivas de DP – PINK1, DJ-1 e Parkin – estão relacionados à regulação da resposta celular a estresses, incluindo estresse oxidativo e despolarização da membrana mitocondrial. PINK1 e Parkin promovem a remoção autofágica de mitocôndrias despolarizadas. Mais ainda, mutações em todos os genes causadores de DP levam a uma sensibilidade aumentada a toxinas mitocondriais e estresse oxidativo (McCoy e Cookson, 2012). Fatores como a disfunção mitocondrial por deficiência do complexo I, influxo de cálcio, estresse oxidativo e defeitos na remoção de mitocôndrias disfuncionais, levam ao acúmulo de organelas não funcionais, contribuindo para a disfunção neuronal na DP.

Autofagia - A autofagia é um processo catabólico que media a degradação de componentes celulares – proteínas, organelas - que tenham se tornado desnecessários/não funcionais utilizando para isso a maquinaria lisossomal. Existem três vias principais de autrofagia: i) a macroautofagia, onde porções do citoplasma são envolvidas por um compartimento de membrana dupla, o fagóforo, e conduzidas para degradação no lisossoma; ii) a microautofagia, onde materiais citoplasmáticos são internalizados no lisossoma através de invaginações de sua membrana; iii) a autofagia mediada por chaperonas, onde proteínas citosólicas são desdobradas por chaperonas e translocadas diretamente para o lisossoma. A remoção de proteínas e organelas disfuncionais é muito importante na manutenção da homeostase neuronal e no controle do balanço entre proteínas funcionais e não funcionais (Wong e Cuervo, 2010). Os mecanismos de vigilância neuronal têm como função principal identificar as estruturas não funcionais e assegurar sua degradação autofágica antes que o acúmulo intracelular dessas estruturas dê origem a neurotoxicidade (Wong e Cuervo, 2010).

A relação entre autofagia e degeneração neuronal na DP foi estabelecida a partir da constatação de que há um aumento do número de vacúolos autofágicos (autofagossomos) na substância nigra nessa doença e de que corpúsculos de Lewy contêm proteínas relacionadas aos processos de autofagia (Alvarez-Erviti et al., 2010; Schapira e Jenner, 2011). Essas alterações já haviam sido observadas in vitro em culturas celulares de neurônios dopaminérgicos expostos a rotenona (composto que interfere na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria) (Gao et al., 2003) e foram posteriormente confirmadas em modelos transgênicos de DP (Gegg et al. 2011).

A desregulação das vias de autofagia na DP está ligada tanto a alterações na molécula da α-sinucleina (que serão vistas em detalhe adiante) como ao funcionamento alterado dos genes Parkin, PINK1, DJ-1 (nos quais mutações causam formas autossômicas recessivas de DP) e LRRK2 (forma dominante de DP). Todos esses genes têm funções ligadas à degradação autofágica de mitocôndrias (Lynch-Day et al., 2012). Quanto à α-sinucleina, está bem demonstrado que sua forma monomérica não dobrada é degradada por autofagia mediada por chaperonas (AMC). No entanto formas alteradas por modificações pós-translacionais, ou mutadas, dessa proteína inibem a AMC o que redunda em sua agregração tóxica no citoplasma e morte celular, como observado em cultura de neurônios murinos e em estudos post-mortem na DP (Martinez-Vicente et al., 2008, Lynch-Day et al., 2012).

Inflamação- Juntamente com os corpúsculos de Lewy, a hiperatividade microglial generalizada, ou microgliose reativa, é uma das características marcantes da DP, Estudos post-mortem têm mostrado um aumento de citocinas pró-inflamatórias αforam observados o que leva a uma alteração da atividade de NKκβ e morte celular

por apoptose (Hunnot e Hirsh, 2003). Igualmente aumentada está a expressão de oxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que leva a um dano das proteínas celulares via ataque por peroxinitrito. Assim, a hiperativação de células gliais na DP leva a microglia de um papel protetor a um papel de agressor das células neuronais. Embora ainda não esteja claro se na DP a ativação glial é uma causa primária da morte de células dopaminérgicas ou uma resposta à morte de neurônios, evidencias obtidas de modelos animais (macacos tratados com MTPT) mostram que uma vez iniciado o processe de microgliose pode perdurar por longos períodos (Schapira e Jenner, 2011).

α-sinucleína e propagação da DP – A α-sinucleína (α-syn) é a proteína mais abundante encontrada nos corpúsculos de Lewy (é também abundante no cérebro e encontrada em outros tecidos, inclusive em hemácias), sendo uma marca característica da DP. Essa proteína de 140 aminoácidos é codificada pelo gene SCNA e foi originalmente identificada em associação com vesículas sinápticas nos terminais pré-sinápticos, onde interage diretamente com SNARE (Burré et al., 2010), modulando a montagem desse complexo cuja função é mediar a ancoragem de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica. A α-syn está envolvida na biossíntese de dopamina (DA), na plasticidade sináptica e na regulação da neurotransmissão via SNARE (Yasuda et al., 2012). Com efeito, estudos de neuroimagem em pacientes com DP mostram disfunção sináptica e deficiência de neurotransmissores (Nikolaus et al., 2009). Essas alterações estão ligadas a presença de diferentes espécies de α-syn (monômeros, oligômeros e fibrilas) que podem estar envolvidas tanto em funções fisiológicas normais quanto em alterações patológicas (Marques e Outeiro, 2012), como se verá a seguir.

A percepção de um papel chave da α-syn na patogênese da DP emergiu com a descoberta de que mutações de ponto (*missense*) no gene SCNA, bem como duplicações e triplicações nesse locus, causavam DP (Polymeropoulus et al., 1997; Klein e Lohmann-Hedrich, 2007). A α-syn nascente não é dobrada, mas forma estruturas α-hélice N terminais ao ligar-se a membranas lipídicas. Ela pode agregar-se formando oligômeros e, em determinadas condições, pode formar agregados fibrilares e, finalmente, fibrilas amilóides (Witt, 2012; Hansen e Li, 2012). Descobriu-se que duas mutações missense (Glu46Lys e Ala53Thr) em SCNA, que causam uma forma dominante de DP, aumentavam significativamente a agregação de moléculas de α-syn, indicando que a agregação estava ligada a efeitos neurotóxicos. Existem diversas hipóteses de como oligômeros de α-syn são tóxicos para neurônios: disrupção da homeostase de cálcio por formação de poros na membrana celular, inibição do proteosoma e repressão da expressão de fatores pró-sobrevivência de neurônios, como MEF2D (Hansen e Li, 2012).

A α-syn pode ser secretada apesar da ausência de uma sequência peptídeo sinal secretora e é detectável no líquido cefalorraquidiano e no plasma sanguíneo de indivíduos normais e de pacientes com DP (Lee, 2008),nas formas monomérica e agregada (Danzer et al, 2011). A secreção de α-syn ocorre de forma não clássica, pelas vias exocítica ou endocítica (Marques e Outeiro, 2012). É ainda possível que a α-syn possa ser transferida célula-célula por nanotubos de tunelamento (TNTs) (Hansen e Li, 2012).

Em 2008 Li et al. mostraram, através de análise post-mortem, que pacientes com PD que haviam recebido transplante de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos fetais (11 a 22 anos antes do óbito) apresentavam corpúsculos de Lewy (CL) nos neurônios transplantados. Essa descoberta foi de extrema importância para o esclarecimento da patogênese da DP porque CL só haviam sido antes encontrados em neurônios muito mais velhos. Esse aparecimento não estava ligado ao transplante em si e provavelmente era DP específico, uma vez que CL nunca foram detectados em transplantes similares feitos em pacientes com doença de Huntington (Cicchetti et al., 2009). Essas observações permitiram levantar a hipótese de que formas agregadas e/ou incorretamente dobradas de α-syn poderiam ser secretadas de neurônios do hospedeiro para os neurônios transplantados e, assim, propagar a doença (Angot et al., 2010). Na verdade, essa teoria já havia sido proposta por Braak e seus colaboradores (Braak et al. 2003b) que postularam que a DP poderia ser iniciada pela “ação de um patógeno”, admitindo inclusive que a α-syn incorretamente dobrada era um dos candidatos a esse papel. A hipótese de Braak foi apoiada num vasto trabalho empreendido por ele e seus colaboradores em tecidos cerebrais post-mortem de pacientes com DP e controles. Esse trabalho mostrou que na DP idiopática a patologia dos CL se propaga de forma sistemática do sistema nervoso entérico ou do bulbo olfatório para regiões específicas do cérebro durante a progressão da doença.

Em 2009 Desplats et al. mostraram que a α-syn pode ser transferida de célula para célula in vivo e in vitro. Em 2011 Hansen et al. mostraram que a α-syn transferida pode disseminar a agregação de α-syn nos neurônios recipientes em cultura. Esses foram passos decisivos para estabelecer a teoria de que a DP pode ser propagada de um neurônio a outro pela transferência de moléculas de α-syn incorretamente dobradas, as quais induzem a conversão de α-syn monomérica em formas agregadas nas células receptoras, num mecanismo semelhante aos príons, mas sem a transmissão entre indivíduos ou interespécies (Dunning et al., 2012).

Cabe ainda mencionar o papel da α-syn extracelular na neuroinflamação e na neurotoxicidade. A α-syn pode ser ativamente secretada, ou liberada por neurônios que estejam morrendo, para o espaço extracelular. A α-syn extracelular pode ativar

astrócitos circundantes na microglia dando início a uma atividade glial pró-inflamatória. A ativação da microglia leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para os neurônios. Diversos estudos têm mostrado que o processo inflamatório na substância nigra, caracterizado pela ativação da microglia e secreção de fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, contribui para o início e/ou agravamento da degeneração neuronal na DP (Hirsch et al., 2005; Marques e Outeiro, 2012).

I-3) Genômica funcional da Doença de Parkinson

A identificação da primeira forma monogênica da DP ocorreu em 1997, quando Polymeropoulus et al. descobriram uma mutação *missense* no gene SNCA causadora de uma forma familial rara de DP. Em 2011 Corti et al. num extenso artigo de revisão sobre genética da DP apresentaram dados sobre 16 loci e 11 genes associados. No entanto, é preciso lembrar que as formas mendelianas da DP representam apenas 10% dos casos da doença (Klein e Lohmann-Hedrich, 2007; Corti et al, 2011). A DP é uma doença neurodegenerativa complexa, cuja forma idiopática é causada por interações ainda não esclarecidas entre o genoma e fatores ambientais (Schloz et al., 2012). A genética de doenças complexas utiliza comumente estudos de associação do tipo pangenômico, ou GWAS (do inglês *genome-wide association study*), testando milhares de variações genéticas comuns dispersas no genoma humano coortes caso-controle com um número muito grande de indivíduos. Na DP esses estudos têm sido conduzidos por consórcios internacionais, imperativo para se conseguir a inclusão do número necessário de casos e controles e estudar diferenças populacionais (ver IPDG, 2011). Mesmo assim, estima-se que apenas 60% da herdabilidade da DP tenha sido identificada até o momento, o que mostra que os estudos de GWAS não têm poder suficiente para detectar variantes comuns de baixo risco, variantes raras, interações gene-gene, interações gene-ambiente e variações estruturais no genoma (Manolio et al., 2009; Schloz et al., 2012).

Outra abordagem para se compreender o mecanismo molecular de doenças complexas é investigar os perfis de expressão gênica global em tecidos alvo da doença. Essa abordagem, conhecida como genômica funcional, ou transcriptômica, se tornou factível na última década graças ao desenvolvimento da tecnologia de DNA microrrays e de avanços na área de bioinformática que permitiram analisar a grande quantidade de dados gerados por esses experimentos (Kim et al., 2011). A abordagem de genômica funcional é essencial no estudo das doenças complexas, onde os distintos perfis de interação entre um grande número de genes no genoma, que são

específicos para diferentes células e tecidos, e as perturbações desses perfis por agentes ambientais está no cerne dos mecanismos causais dessas doenças (Barabási et al., 2011).

Diversos estudos de genômica funcional têm sido feitos na DP (revisões em Greene, 2012; Lewis e Cookson, 2012). Até o presente, todos esses estudos (excetuando-se os de detecção de biomarcadores para DP em sangue periférico, que serão considerados na seção de Discussão) foram feitos em amostras post mortem de tecido cerebral de pacientes com DP e de controles obtidas de bancos de encéfalos humanos (Greene, 2012). Isso significa que esses estudos comparativos (DP X controles), em sua maioria, retratam perfis de expressão gênica característicos de fases avançadas da doença e essas alterações podem não refletir o que ocorre nos estágios iniciais da doença (Greene, 2012; Lewis e Cookson, 2012). Boa parte desses estudos foi feita na substância nigra (Greene, 2012) e, considerando o modelo de progressão caudo-rostral da DP (Braak et al.,. 2003b), é importante analisar a expressão gênica diferencial em outras áreas, como o núcleo dorsal do nervo vago e o locus cerúleo. Inicialmente esses estudos foram conduzidos com RNA extraído de fragmentos de tecido contendo diversos tipos celulares. Como a composição celular do cérebro que sofre um processo neurodegenerativo difere daquela presente no cérebro de controles livres de doença, alguns estudos tem empregado microdissecção a laser para isolar tipos específicos de células (Lewis e Cookson, 2012). De qualquer modo, a grande vantagem da abordagem de genômica funcional é a capacidade de estudar globalmente a expressão gênica, de forma relativamente sem viés e utilizando quantidades mínimas de material biológico.

Muitos dos estudos de genômica funcional na DP concentraram-se na identificação de genes diferencialmente expressos no vetor de comparação DP X controles e de grupos de genes relacionados a determinadas vias metabólicas (Greene, 2012, Scholz et al., 2012). A análise de bioinformática por vezes restringe-se à identificação dos perfis de expressão diferencial e ao emprego de ferramentas de busca para categorização dos genes diferencialmente expressos (Scholz et al., 2012) Uma análise comparativa de nove dos 22 estudos de genômica funcional na DP conduzidos entre 2004 e 2009 (Lewis e Cookson, 2012) feita por Greene (2012) mostra que não houve concordância entre as listas de genes diferencialmente expressos (hiper ou hipoexpressos na DP), embora em seis dentre nove estudos tenham encontrado desregulação na DP das vias metabólicas ligadas a função mitocondrial/transporte de elétrons, degradação de proteínas e transmissão sináptica/tráfego vesicular (apenas três identificaram alterações na via de sinalização por dopamina) (Greene, 2012).

Esse panorama começou a mudar com o emprego de ferramentas de bioinformática que permitem o estudo das interações gene-gene e a análise comparativa de dados de expressão gênica em tela com dados de GWAS e de interação proteína-proteína (interatoma) (Ideker e Krogan, 2012). Um estudo recente nessa linha é o de Edwards et al. (2011) que identificou vias metabólicas de consenso na DP utilizando dados de GWAS e de expressão gênica nas seis regiões anatômicas adjacentes utilizadas no estadiamento de Braak (Braak et al., 2003a). Esse estudo, que é uma típica abordagem de biologia de sistemas (Chuang et al., 2010), revelou que as principais vias metabólicas de consenso na DP eram: direcionamento axonal, adesão focal e sinalização por cálcio.

Nas doenças complexas, determinadas pela interação genoma-ambiente, nem sempre os genes com maior diferencial de expressão são os relacionados aos mecanismos causadores da doença, embora possam servir, em determinados casos, como biomarcadores (Schloz et al., 2012). Mais importante é construir, através de ferramentas de bioinformática, as redes de interação gene-gene, identificando nessas redes os genes com maior número de ligações gene-gene - denominados *hubs* - uma vez que esses genes, nas doenças complexas, são aqueles de maior relevância biológica (Chavali et al., 2010). As propriedades das interações gene-gene e gene-proteína podem ser reduzidas a duas métricas independentes, segundo Cai et al. (2010): o grau ou número de conexões e o coeficiente de clusterização (número de conexões entre vizinhos de um gene ou proteína na rede). Genes relevantes na etiologia de doenças complexas têm um alto grau de conexões e um baixo coeficiente de clusterização. Esses genes, chamados *brokers*, conectam grande número de proteínas na célula que não se comunicariam sem sua intermediação. Genes de doenças mendelianas, ao contrário, têm alto coeficiente de clusterização e baixo grau de conexão (Cai et al., 2010). É interessante notar que genes identificados por estudos de GWAS como de risco para doenças complexas têm propriedades de rede similares aos genes mendelianos, o que mostra a importância de se identificaram os *broker genes* para doenças complexas (Cai et al., 2010, Ideker e Krogan, 2012).

No presente trabalho, considerando o acima exposto sobre o mecanismo celular e molecular da DP e sobre os estudos de genômica funcional nessa doença, foi feita uma análise de redes de interação transcricional na substância nigra, locus cerúleo e núcleo dorsal do nervo vago na DP (amostras post mortem de pacientes e de controles livres da doença) utilizando a metodologia de estudo de redes de interação transcricional já desenvolvida em nosso laboratório (Bando et al. 2011; Correa-Costa et al., 2012).

II) OBJETIVO

Estudo comparativo das redes de interação transcricional no Núcleo Dorsal do Nervo Vago, Locus Cerúleo e Substância Nigra entre pacientes com Doença de Parkinson idiopática nos estágios Braak 4-5 e controles livres da doença utilizando material de necropsia.

III) MATERIAL E MÉTODOS

III-1) Casuística

Amostras post-mortem de tecidos da Substância Nigra (SN), Locus Cerúleo (LC) e Núcleo Dorsal do Nervo Vago (VA) provenientes de indivíduos com Doença de Parkinson (DP) nos estadiamentos 4 ou 5 de Braak (Braak et al., 2003) e de controles livres de doença (CT) foram obtidas através do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos do Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da Faculdade de Medicina da USP (Grinberg et al., 2007). Todos esses casos vieram de autópsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Os procedimentos do BEHGEEC, sumarizados a seguir, foram aprovados pela Comissão de Ética da FMUSP, sob o número 04/285.

Após a pré-seleção no SVOC dos casos elegíveis (idade superior a 50 anos) para doação ao Banco de Encéfalos, a equipe do BEHGEEC obtém o consentimento livre e esclarecido e realiza uma avaliação clínica e funcional de cada caso, com base na história clínica e registros médicos disponíveis. Nessa fase são critérios de exclusão: i) hemorragias e infartos cerebrais macroscopicamente detectáveis; ii) condições crônicas graves (p. ex. metástases cerebrais, insuficiência renal crônica) que causam dano às funções cognitivas por interferirem na homeostase cerebral; iii) insuficiência de informações providenciadas por fonte com contato próximo ao indivíduo falecido; iv) acidose cerebral (pH do líquido cefalorraquidiano < 6,5) devido a estado agonal severo. A avaliação neuropatológica do caso é feita: i) durante e imediatamente após a autópsia; ii) após a fixação do material (histopatologia). Após a separação do tronco cerebral e cerebelo o cérebro é seccionado coronalmente (fatias de 1cm). Parte do material, representando um mínimo de 13 áreas anatômicas - entre elas mesencéfalo (incluindo a substância nigra), ponte (incluindo locus cerúleo) e bulbo (incluindo núcleo dorsal do vago) - é emblocada para histologia, e parte do material é preservada por congelação para outros estudos, como os de genômica funcional. A rotina de avaliação histopatológica inclui imunoistoquímica para as seguintes proteínas: α-sinucleína, β-amiloide, tau e ubiquitina. Para uma descrição detalhada de todos esses procedimentos ver Grinberg et al., (2007).

Para inclusão no presente estudo, todos os casos passaram por reavaliação da história clínica e do estadiamento histopatológico conduzidos pela Dra. Lea Grinberg (Departamento de Neurologia, University of Califórnia San Francisco, CA, EUA, e Departamento de Patologia da FMUSP). Os casos considerados livres de doença (neurológicas, cerebrovasculares, tumores) e sem histórico de déficit cognitivo foram selecionados para integrar o grupo controle. Os dados clínicos e patológicos de todos

os casos estão na **Tabela 1**. Nessa Tabela também se indicam as regiões anatômicas estudadas por genômica funcional de cada indivíduo incluído no presente estudo.

Tabela 1. Dados clínicos e patológicos e regiões anatômicas estudadas

ID Pacientes (DP) e Controles (CT)	Estadiamento (Braak)	Gênero	Idade (anos)	Região anatômica estudada*		
				SN	LC	VA
DP1	4	F	85	X		X
DP2	4	M	64	X	X	X
DP3	4	M	66	X	X	X
DP4	4	F	80	X	X	X
DP5	4	F	84	X	X	X
DP6	5	M	68	X	X	X
DP7	5	M	82	X	X	X
DP8	5	M	90	X	X	X
CT1	Controle	M	69		X	
CT2	Controle	F	90		X	X
CT3	Controle	M	64	X	X	X
CT4	Controle	M	70	X	X	X
CT5	Controle	M	85	X	X	X
CT6	Controle	M	58	X	X	X
CT7	Controle	F	70	X	X	X

F**,** feminino; M, masculino; SN, substância nigra; LC, locus cerúleo; VA, núcleo dorsal do nervo vago; * estudo de genômica funcional.

Extração de RNA – Amostras de tecido cerebral (3-4 mm^3) das três regiões anatômicas sob estudo provenientes dos casos de doença de Parkinson e dos controles, conforme indicado na **Tabela 1**, foram homogeneizadas com o emprego do TissueRupter (Qiagen, cat. no. 9001272 Valencia, CA). O RNA total foi extraído dos homogenatos utilizando-se o RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen cat. no. 74804, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se a plataforma Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA). Todas as amostras foram estocadas -80 °C até serem utilizadas nos experimentos de hibridização em DNA *microarrays*.

Hibridização em DNA *microarrays* e análise da expressão gênica – Com objetivo de se determinar os perfis de expressão gênica, 44 K DNA *microarrrays* (Agilent Technologies, cat no. G4845A Santa Clara, CA) foram usados. Os procedimentos para iybridização seguiram os protocolos incluídos nas instruções do fabricante (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - Quick Amp Labeling). As imagens foram capturadas na plataforma de leitura Agilent Bundle de acordo com os parâmetros recomendados para *bioarrays* e os dados foram extraídos através do Agilent Feature Extraction software versão 9.5.3. Entre os 45,015 *spots*

presentes in cada *array* somente aqueles com nenhum, ou apenas com um único *flag* (isto é, baixa intensidade, saturação, controles etc.) foram selecionados para análise utilizando-se o software R versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010) e o teste Lowess para normalização. Foram assim identificados: i) 17.313 transcritos válidos para as amostras da SN (8 casos de DP e 5 casos CT); ii) 26.851 transcritos válidos para as amostras de LC (7 casos de DP e 7 casos CT) ; iii) 22.227 transcritos válidos para as amostras de VA (8 casos de DP e 7 casos CT). Utilizando-se o software TMEV versão 4.6.1 (Saeed et al., 2003) foram selecionados os transcritos diferencialmente expressos no vetor de comparação DP X CT. Para as amostras de SN e LC essa comparação foi feita utilizando-se o teste SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, Tusher et al., 2001) e valor de fold >2.0. Para a comparação das amostras de VA, no vetor de comparação DP versus CT, foi usado o teste Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0.01$). Todos os dados brutos de microarrays foram depositados na base pública de dados GEO (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), sob o número GSE43490, em conformidade com as normas MIAME (*Minimun Information About a Microarray Experiment*).

Analises de Interação Transcrional (GO e Análise de Redes) – Foi utilizado o software FunNet (http://www.funnet.info) - baseado nas anotações genômicas constantes do Gene Ontology Consortium (GO, http://www.geneontology.org) – para se obter os perfis funcionais dos dados de expressão gênica. Os genes foram categorizados por processos biológicos (FunNet Biological Processes). Redes de interação transcricional foram construídas com base na correlação de Pearson utilizando-se o software R. A análise de dados e a visualização foram feitas com a utilização do software (Cytoscape, versão 2.8.0, www.cytoscape.org).

IV) RESULTADOS

A comparação dos dados de expressão gênica global para cada uma das três regiões anatômicas sob estudo entre os casos com Doença de Parkinson (DP) e controles livres da doença (CT) foi feita com a utilização do software TMEV. Com a utilização do teste SAM (para SN e LC) ou Mann-Whitney (para VA) verificou-se que todos os genes estavam hiperexpressos nas amostras DP. O número de transcritos válidos, transcritos diferencialmente expressos e os anotados no Gene Ontology (GO), serão descritos especificamente para cada região anatômica nas seções seguintes, precedendo cada análise de rede. A categorização e as redes de interação gene-gene foram construídas através do software FunNet, como descrito na seção anterior.

A seguir são descritos os resultados de análise de redes de interação transcricional (redes de interação gene–gene) para as amostras de controles e de pacientes de cada uma das regiões do cérebro estudadas neste trabalho. Essas redes forma denominadas: SN-CT para amostras da Substância Nigra (SN) de controles (CT) e SN-PD para as amostras de SN de pacientes (PD) e, da mesma forma, LC-CT e LC-PD para as amostras do Locus Cerúleo (LC) e VA-CT e VA-PD para amostras do Núcleo Dorsal do Nervo Vago (VA). Em cada uma dessas redes os genes com maior número de ligações gene-gene foram considerados como hubs principais desde que apresentassem pelo menos 10 ligações com outros genes. Para a análise detalhada do papel dos hubs em cada rede, foram considerados os hubs com maior número de ligações, sendo escolhidos entre 7 (rede VA-CT) a 12 hubs principais (rede SN-DP), conforme será justificado a seguir. Os genes considerados como hubs principais nos controles têm seus ícones identificados graficamente nessas redes, onde são representados em cor verde, e também nas redes PD, cujos hubs específicos têm identificação gráfica distinta, sendo representados em cor vermelha, assim como os genes que, eventualmente, foram hubs tanto em CT como em PD, e que aparecem em cor amarela .

A análise dos hubs principais permite identificar quais são os genes que possuem um papel mais significativo na rede de interação gênica e, portanto, desempenhariam um papel mais relevante no mecanismo molecular da DP. É também importante, nesse contexto, verificar como os hubs principais em redes CT perdem (ou não) esse papel nas redes DP.

IV.1) Substância Nigra

Após a análise de qualidade das lâminas, foram selecionados 17.313 transcritos válidos. Para identificar aqueles que são diferencialmente expressos foi

realizado o teste SAM (Significance Analysis of Microarrays) adotando-se um *fold* maior que 2. Foram obtidos 291 transcritos diferencialmente expressos e 274 destes estão anotados no banco de dados GO (Gene Onthology). Como descrito anteriormente, todos os genes estavam hiperexpressos (vetor de comparação DP x CT). A categorização desses genes segundo sua participação em processos biológicos e conforme anotados no banco de dados GO aparece na **Figura 3**.

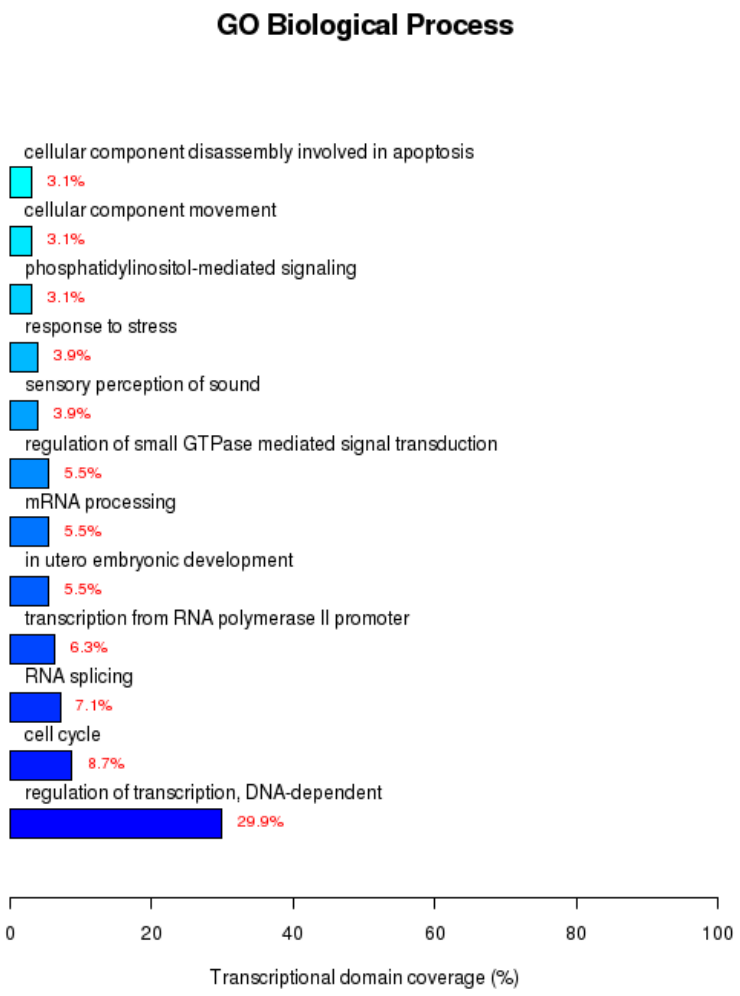

Figura 3. Categorização dos genes diferencialmente expressos na Substancia Nigra.

A rede SN-CT (**Figura 4**) possui 9 hubs principais (número de ligações maior que 10) (**Tabela 2**) cujos ícones estão identificados com a cor verde, enquanto que a rede SN-DP (**Figura 5**), possui 45 genes considerados hubs, dos quais foram selecionados os 10 primeiros como principais, em negrito na **Tabela 3** e cujos ícones aparecem em vermelho na rede SN-DP.

Tabela 2 . Genes que possuem o maior número de ligações em amostras de *substantia nigra* na rede de interação do controle (SN-CT). Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links SN-CT	Nº Links SN-DP
ANGEL2	**74**	2
ABTB2	**63**	12
AGPAT5	**52**	17
APOD	**51**	4
AK2	**37**	0
ANTXR1	**33**	0
ARAP2	**30**	2
ADD3	**17**	7
ARHGAP21	**16**	7
ARHGAP19	9	12
AASDH	6	1
ANKRD12	5	5
C3orf63	5	5
GLDN	5	14
UACA	5	0
ATAD2B	4	7
CBFB	4	3
FGFR2	4	8
HLF	4	1
HNRPDL	4	3

SN - CT

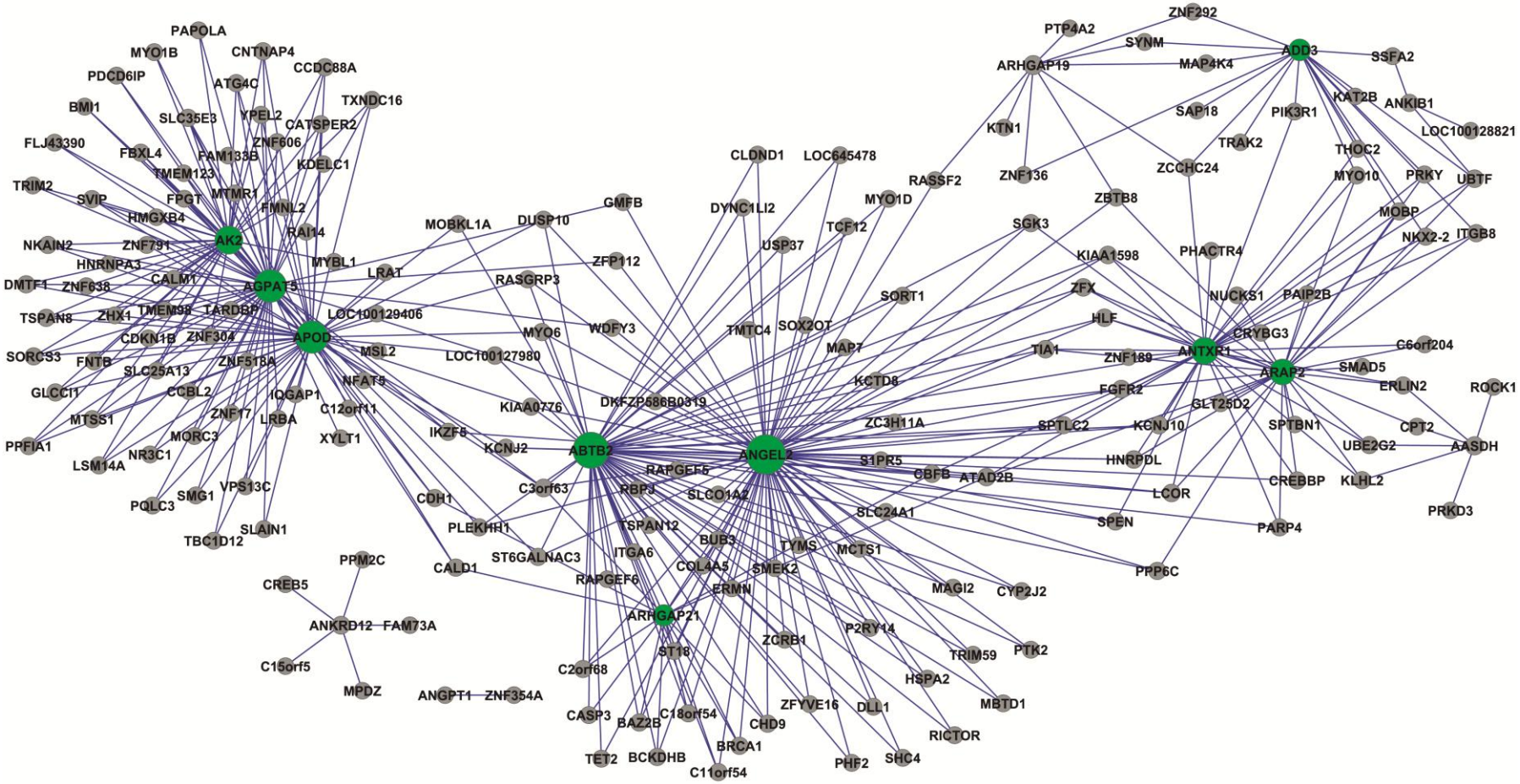

Figura 4 . Rede de interação transcricional para amostras da Substância Nigra de indivíduos controle (SN-CT).

IV-1.1) Análise dos hubs na rede SN-CT

A partir dos genes diferencialmente expressos foi feita uma análise de rede utilizando o software FunNet. Para esta análise foram consideradas 37.401 ligações gene-gene iniciais e, adotando-se um *threshold* de 0.9, selecionaram-se as 10% melhores ligações (384 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 127 genes dentro da rede SN-CT (**Figura 4**) e destes identificaram-se 9 hubs (genes com 10 ou mais ligações com outros genes) conforme a **Tabela 2.** A seguir descreve-se sucintamente o papel de cada um dos genes correspondentes a esses hubs, com ênfase, quando for o caso, no seu papel específico na região do cérebro sob estudo e na DP.

ANGEL2 – Este gene aparece com o maior número de ligações na rede SN-CT (Figura XX) e é homólogo ao gene Angel de *Drosophila melanogaster,* o qual codifica uma proteína que se situa no núcleo da célula e que possui homologia significante com a porção C-terminal da proteína codificada CCR4 de leveduras (Kurzik-Dumke e Zengerle, 1996). O gene CCR4 atua como regulador global da transcrição em leveduras, afetando outros genes positivamente ou negativamente através da atividade do fator de transcrição TFIID e da via de Ras/cAMP (Lenssen et al., 2002). Assim, infere-se que o gene humano ANGEL2, ainda pouco caracterizado funcionalmente, seja um fator de regulação da transcrição, como seu homólogo em *Drosophila*.

ABTB2 – Este gene codifica uma proteína que serve de adaptador para um tipo específico de ligase, a E3. Esta ligase faz parte do sistema da ubiquitina–proteasomo que direciona proteínas alvo para a degradação através da poliubiquitinação. A degradação, pelo proteassomo, de proteínas danificadas está envolvida na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas incluindo as doenças de Alzheimer e de Parkinson, corea de Huntington, e esclerose lateral amiotrófica. Um mau funcionamento da atividade deste sistema pode ter como resultado a agregação de proteínas, que é um processo importante para a maioria das doenças neurodegenerativas (Catalgol e Grune, 2012). A presença deste gene como hub na rede controle demonstra que ele está muito ativo neste cenário, como seria esperado no funcionamento normal do cérebro. Além disso, é interessante notar que o gene Parkin, conhecidamente relacionado com a Doença de Parkinson hereditária, também é uma E3 ligase que possui sua atividade alterada nessa doença (Walden e Martinez-Torres, 2012).

AGPAT5 – este gene codifica uma proteína de membrana que converte o ácido lisofosfatídico em ácido fosfatídico, segundo passo na biossíntese de fosfolipídeos. Evidências sugerem que os genes AGPAT desempenhem um papel chave na síntese

de fosfolípidos / triglicéridos, necessária para a manutenção da homeostase na barreira de permeabilidade celular (Prasad et al., 2011). A proteína codificada por este gene está envolvida com a fuidez e remodelação da membrana. A proteína codificada por AGPAT5 foi localizada na mitocôndria e evidências mostram que este gene poderia estar envolvido na síntese de glicofosfolipídeos por esta organela (Prasad et al., 2011). Além disso, esta proteína teve sua hiperexpressão descrita em pacientes com a doença de Alzheimer (Williams, 2009) e validada como biomarcador para essa doença (Arisi et al., 2011)

APOD - A lipoproteína codificada por este gene, lipocalina, é expressa nas células da glia e tem sido relacionada com a resposta ao envelhecimento, danos teciduais e neurodegeneração (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b). Ela também parece estar intimamente associada à lecitina, enzima envolvida com o metabolismo de lipoproteínas. Bhatia, et al., (2012) descreveram a hiperexpressão deste gene em situações que apresentam maiores taxas de peroxidação de lipídios no cérebro, como acontece na doença de Alzheimer e no envelhecimento. A explicação para este fato seria que o gene APOD possui uma função antioxidante, inibindo a peroxidação de lipídios e assim, ajudando a controlar o estresse oxidativo (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b). O estresse oxidativo tem papel importante no envelhecimento cerebral e em doenças neurodegenerativas, espécies reativas de oxigênio são importantes moléculas sinalizadoras, mas o acúmulo delas leva as disfunções de proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (Wang, et al., 2009), portanto é muito importante que o sistema de oxido-redução esteja funcionando adequadamente. Além disso, este gene parece ser imprescindível para um desempenho motor adequado, uma vez que ele contribui para a manutenção do perfil funcional do sistema nigroestriatal (Bajo-Grañeras et al., 2011a).

AK2 - Codifica a isoenzima 2 da adenilato quinase. Inouye et al., (1998) descreveram que este gene está expresso no cérebro de ratos durante o desenvolvimento, mas que essa expressão não é detectável após esta fase. Por outro lado, Burkart et al., 2011, descobriram que este gene é acentuadamente induzido durante a diferenciação de células B e adipócitos e que a depleção de AK2, por RNAi (RNA de interferência) induz a *unfolded protein response (UPR)* durante a diferenciação destes tipos de celulares. Esta resposta é um mecanismo de sinalização homeostático que equilibra a capacidade de dobramento da proteína pelo retículo endoplasmático. Quando a homeostase não é mantida, isto leva ao acúmulo de proteínas, o que desencadearia esta resposta ao estresse *(UPR)*, que protege a célula contra o acúmulo tóxico de proteínas desenoveladas (Hoozemans et al., 2012). O gene AK2, localizado na mitocôndria, está envolvido com o sistema de dobramento

proteico através de um novo mecanismo, descrito por Burkart et al., (2011), no qual a mitocôndria auxilia a função do retículo endoplasmático. A presença deste gene como hub na rede de interação SN-CT indicaria uma ativação deste tipo de resposta - proteção do cérebro contra o acúmulo de proteínas defeituosas - provavelmente induzido pelo envelhecimento.

ANTXR1 – Este gene foi descrito como marcador de tumor endotelial, pois ele aparece hiperexpresso em neoplasias deste tipo. In vitro, a proteína codificada por este gene tem a capacidade de ligar componentes da matriz extracelular com o citoesqueleto de actina para promover a adesão e proliferação das células (Herrmann et al., 2010). A proteína ANTXR1 também pode se ligar com a toxina antrax e interagir com receptores de lipoproteína que funcionam como co-receptores na via de sinalização Wnt. Os fatores da via de Wnt estão envolvidos na indução e manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico (Alves dos Santos e Smidt., 2011). As proteínas envolvidas na via do Wnt regulam o cofator de transcrição β-catenina e a expressão de genes chave de controle do desenvolvimento embrionário.

ARAP2 - Os genes ARAP são um tipo de ArfGAP (moléculas que controlam a atividade de proteínas que se ligam a GTP), descritos como reguladores do tráfego intracelular (Spang et al., 2010) e implicados na regulação da motilidade celular e da formação de filamentos de actina (Miura et al., 2002; Krugmann et al., 2002). A proteína codificada por ARAP2 possuí domínios homólogos à IRA-GAP, RHO-GAP, anquirina de repetição e RAS (Yoo et al., 2006). A proteína associa-se às aderências focais regulando-as. Movimentos celulares envolvem remodelações estruturais como adesões focais, lamelopodia e formação de fibras de actina por estresse (Schwartz e Ginsberg, 2002; ; Nobes e Hall, 1995; Shattil and Newman, 2004). A regulação de movimentos celulares é crucial para o desenvolvimento e fisiologia células e a função alterada da proteína codificada por ARAP2 tem sido associada com invasão celular por patógenos através da remodelação do citoesqueleto (Gavicherla et al., 2010). Boutahar et al., (2011) descreveram que este gene estava hiperexpresso em culturas de neurônios corticais tratados com água oxigenada.

ADD3 – Este gene faz parte da família das aducinas, proteínas encontradas no citoesqueleto que se ligam a filamentos de actina e regulam sua polimerização. Essas proteínas são expressas em níveis elevados nas sinapses de diferentes áreas do cérebro, incluindo o hipocampo e o hipotálamo (Yang et al., 2002). Parecem estar envolvidas em processos de plasticidade sináptica associada à aprendizagem e memória, mas os mecanismos ainda são desconhecidos (Babic et al., 2011). O gene ADD3 codifica a aducina do tipo gama (γ), envolvida na reorganização da rede de actina que envolve o complexo de Golgi, ajudando a saída de vesículas deste. Outra

função proposta para essas moléculas é a regulação do desenvolvimento de neuritos (Lou et al., 2013).

ARHGAP21 – Este gene também é conhecido como ARHGAP10. A proteína codificada por este gene atua na ativação do mecanismo de Rho-GTPase (Rho-GAPs), que é uma via de sinalização relacionada à dinâmica do citoesqueleto, proliferação celular e diferenciação celular (Bassères DS et al., 2002). Esta proteína atua, preferencialmente, como uma proteína de ativação da GTPase-(GAP) para o gene Cdc42, regulando assim o complexo ARP2/3 e a dinâmica dos filamentos de actina no complexo de Golgi (Ménétrey J et al., 2007; Barcelos et al. 2012)

Tabela 3. Genes que possuem o maior número de ligações em amostras de Substância Nigra na rede de interação da Doença de Parkinson (SN-DP). Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links SN-CT	Nº Links SN-DP	Gene	Nº Links SN-CT	Nº SN-DP
TET2	2	**41**	MAGI2	2	13
BVES	2	**37**	MBTD1	2	13
CRYBG3	1	**34**	ABTB2	63	12
TBC1D12	2	**33**	ARHGAP19	9	12
MAP4K4	2	**31**	DLL1	2	12
CLDND1	2	**30**	FAM171B	1	12
ZNF518A	1	**25**	FNTB	2	12
HNRNPA3	1	**22**	LCOR	4	12
FAM133B	1	**21**	PHACTR4	1	12
RSF1	0	**21**	SHC4	2	12
USP37	2	**21**	WDFY3	2	12
ZZZ3	1	20	ZNF638	2	12
AGPAT5	52	17	BCKDHB	3	11
CCDC88A	3	17	CPT2	2	11
MPDZ	1	16	SOX2OT	1	11
SORT1	2	16	TARDBP	1	11
CCDC75	1	15	ZC3H11A	1	11
LLPH	0	15	DUSP10	3	10
NFE2L2	0	15	PARP4	3	10
RBPJ	1	15	SEPP1	0	10
GLDN	5	14	SMG1	2	10
TCF12	2	14	SUV420H1	3	10
GLT25D2	1	13	C11orf54	3	9

IV-1.2) Análise dos hubs na rede SN-DP

A partir dos genes diferencialmente expressos foi feita uma análise de rede utilizando o software FunNet. Para esta análise foram consideradas 37.401 ligações gene-gene iniciais e, adotando-se de um threshold de 0.9, selecionaram-se as 10% melhores ligações (675 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 127 genes dentro da rede SN-DP (**Figura 5**) e destes identificaram-se 45 hubs conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3. Genes que possuem o maior número de ligações em amostras de Substância Nigra na rede de interação da Doença de Parkinson (SN-DP). Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links SN-CT	Nº Links SN-DP	Gene	Nº Links SN-CT	Nº SN-DP
TET2	2	**41**	MAGI2	2	13
BVES	2	**37**	MBTD1	2	13
CRYBG3	1	**34**	ABTB2	63	12
TBC1D12	2	**33**	ARHGAP19	9	12
MAP4K4	2	**31**	DLL1	2	12
CLDND1	2	**30**	FAM171B	1	12
ZNF518A	1	**25**	FNTB	2	12
HNRNPA3	1	**22**	LCOR	4	12
FAM133B	1	**21**	PHACTR4	1	12
RSF1	0	**21**	SHC4	2	12
USP37	2	**21**	WDFY3	2	12
ZZZ3	1	20	ZNF638	2	12
AGPAT5	52	17	BCKDHB	3	11
CCDC88A	3	17	CPT2	2	11
MPDZ	1	16	SOX2OT	1	11
SORT1	2	16	TARDBP	1	11
CCDC75	1	15	ZC3H11A	1	11
LLPH	0	15	DUSP10	3	10
NFE2L2	0	15	PARP4	3	10
RBPJ	1	15	SEPP1	0	10
GLDN	5	14	SMG1	2	10
TCF12	2	14	SUV420H1	3	10
GLT25D2	1	13	C11orf54	3	9

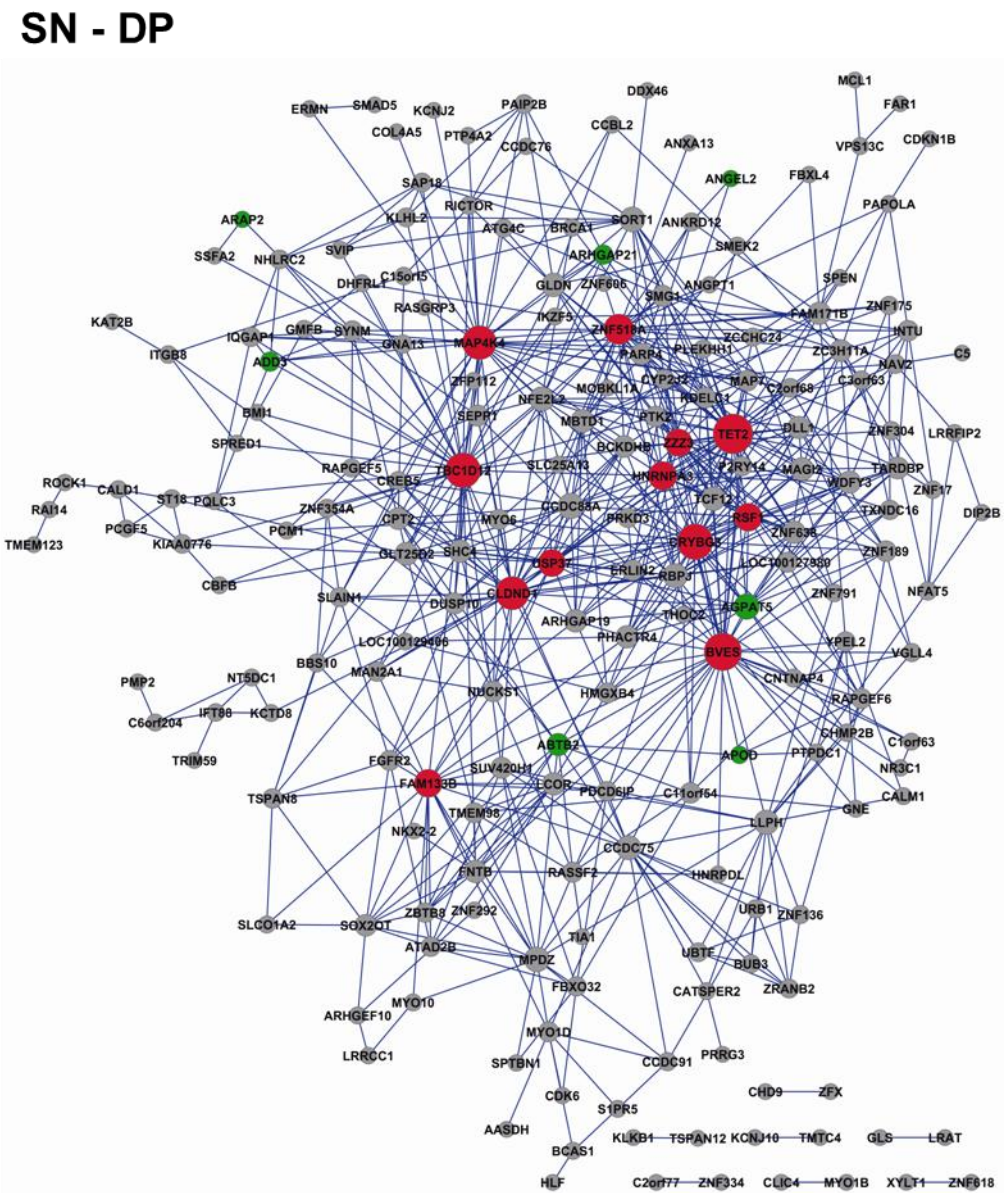

Figura 5. Rede de interação transcricional para amostras da Substância Nigra de indivíduos com Doença de Parkinson (SN-DP).

Primeiramente é importante ressaltar que na rede de interação gênica SN-DP se observa um numero bem maior de hubs com número alto ligações (45 hubs com mais de 10 ligações). Isto provavelmente reflete a ativação de diversas vias metabólicas envolvidas nas alterações celulares e teciduais causadas pela progressão da DP (Braak et al., 2003a e b). A seguir descreve-se sucintamente o papel cada um dos genes correspondentes aos 10 primeiros hubs principais, com ênfase, quando for o caso, no seu papel específico na região do cérebro em estudo e na DP.

TET2 – Este gene codifica uma proteína que catalisa a conversão de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina na mitocôndria, um mecanismo molecular associado à regulação epigenética da expressão gênica (Chen et al., 2012). Mecanismos epigenéticos, como os da hidroximetilação descrita acima, fazem parte de importantes vias reguladoras da expressão genica e a utilização do mecanismo catalizado por este gene tem sido observada na regulação adaptativa (neuroplasticidade) dos neurônios durante o envelhecimento (Sultan e Day, 2011; Dzitoyeva et al., 2012). O envelhecimento cerebral e as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento têm sido descritos como processos biológicos onde está aumentada a susceptibilidade a alterações epigenéticas aberrantes (Liu et al., 2009; Penner et al., 2010; Chouliaras et al., 2011; Mastroeni et al., 2011; Day e Sweatt, 2011). Por outro lado, o gene TET2, juntamente com PARP1, contribui para a reprogramação epigenética e indução de loci de pluripotencialidade em processos de reprogramação de células somáticas (Doege et al., 2012).

BVES – Este gene codifica uma proteína transmembrana e influencia a adesão e a motilidade celulares através de mecanismos ainda não completamente elucidados (Hager et al., 2010). Hager et al., (2010) descreveram que a proteína codificada pelo gene BVES interage diretamente com as codificadas pelo gene VAMP3 e a proteína SNARE. O gene VAMP3 codifica uma proteína que faz parte, como principal componente, de um complexo de proteico envolvido na ancoragem e / ou fusão de vesículas com a membrana pré-sináptica. A proteína codificada por este gene tem sido correlacionada com a regulação da exocitose de glutamato, um importante inibidor de vias do sistema nervoso central (Bezzi, et al., 2004). Estudos descrevem que pacientes com a doença de Parkinson possuem a neurotransmissão mediada por glutamato prejudicada, podendo ter relaçao com alguns dos déficits comportamentais associados com a doença (Lanoule et al., 2010).

CRYBG3 – A proteína codificada por este gene (*beta-gamma crystalline domain*) ainda não possui função definida, mas o gene que codifica as subunidades alfa e beta (CRYAB) possui função de supressão tumoral. Isto ocorreria através da manutenção de β catenina na membrana pela inibição internalização citoplasmática.

Este mecanismo reduz os níveis de expressão de alvos críticos, tais como a ciclina D1. Alterações neste tipo de ciclina foram descritas em modelos murinos de senescência e doença de Alzheimer (Casadesús et al., 2012).

TBC1D12 – Este gene, que ainda não é muito conhecido, parece ter uma função ativadora de Rab GTPases. As proteínas Rab são GTPases presentes em diversas vias metabólicas e atualmente estão descritas mais de 40 proteínas Rab, mas suas funções específicas são pouco conhecidas (Somsel Rodman e Wandinger-Ness, 2000). Elas parecem ser reguladores centrais de vias metabólicas, interferindo não só na endocitose e exocitose, mas também no surgimento de vesículas, ancoragem e fusão destas na fenda sináptica (Gonzalez e Scheller, 1999; Mohrmann e van der Sluijs, 1999; Schimmöller et al., 1998). As Rab GTPases regulam e integram cada passo do transporte vesicular (Somsel Rodman e Wandinger-Ness, 2000).

MAP4K4 – A proteína codificada por este gene faz parte da cascata clássica de sinalização MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e está envolvida na mediação da via de sinalização de TNF-alfa, uma citocina pró-inflamamatória (Bouzakri e Zierath Jr, 2007). Segundo Schapira et al. (2011) mudanças provocadas pela inflamação estariam relacionadas com processos de morte neuronal observados na DP. A ativação diferencial deste gene foi correlacionada com alterações da atividade elétrica do cortex cerebral na epilepsia do lobo temporal (Arion et al., 2006).

CLDND1 – Esse gene petence à família multigênica que codfica as claudinas, proteínas da membrana celular que são importantes elementos estruturais e funcionais das *tight junctions*, áreas de junção estreita entre duas células que formam uma barreira virtualmente impermeável a fluidos. As claudinas têm papel importante na regulação da permeabilidade e da polaridade celular em células epiteliais e endoteliais (Findley e Koval, 2009). O gene CLDND1, também conhecido como C3orf4, se expressa preferencialmente em estruturas mielinizadas do SNC, tais como corpo caloso e medula espinhal, sendo transcrito em oligodendrócitos, células que mielinizam os axônios e têm papel neurotrófico, mas não em astrócitos (Fayein et al., 2002).

ZNF518A – Este gene codifica uma proteína do tipo *zinc finger.* A maioria dos membros dessa familia é capaz de ligar-se a DNA, RNA e proteínas, desempenhando um papel ativo na regulação da expressão gênica. O nome *zinc finger* deriva da capacidade dessas proteínas em fazer ligações com moléculas de zinco para fins estruturais: o zinco liga-se a uma combinação de cisteína e histidina conferindo uma geometria tetraédrica que possibilita o dobramento e a função destas proteínas (Michalek et al., 2011). Esse tipo de domínio proteico é caracterizado por se ligar a outras proteínas, expondo seu dominio catalítico e ativando-as (Wu et al., 2012). A

função específica da proteína codificada por ZNF518A ainda não foi caracterizada.

HNRNPA3 – A proteína codificada por este gene se liga ao telômero e protege essa estrutura, ajudando a menter sua extensão. A manutenção da funcionalidade dos telômeros possui um papel fundamental no controle da senescência celular uma vez que telômeros disfuncionais causam a parada do crescimento celular e apoptose (Huang et al., 2008). Com base nas propriedades bioquímicas do HNRNPA3 *in vitro*, descritas por Huang et al., (2008), esta proteína poderia atuar na manutenção do comprimento dos telômeros *in vivo*.

FAM133B - *Family with sequence similarity 133, member B (FAM133B)*. Embora ainda não exista uma caracterização funcional da proteína codificada por este gene, recentemente foi descrita uma associação entre FAM133B e a proteína promotora da polimerização de tubulina, TPPP/p25, que é encontrada em corpúsculos de Lewy (Oláh et al., 2011).

RSF1 – Este gene, também conhecido como HBXAP codifica uma das subunidades do complexo ISWI de remodelação da cromatina. A remodelação da cromatina desempenha um papel fundamental na biologia celular, incluindo o desenvolvimento dos tecidos e a sua diferenciação, mas estudos recentes têm proporcionado novas evidências de que a remodelação da cromatina participa na patogênese de doenças neoplásicas, alterando a regulação do ciclo celular e expressão gênica (Fang et al., 2011).

USP37- A proteína codificada por este gene é uma peptidase - enzima que conduz a proteólise específica da ubiquitina (deubiquitinase) e faz parte da via de ubiquitinação de proteínas. Alterações na poliubiquitinação de proteínas-alvo gerariam uma falha na degradação destas através da via proteassomo-ubiquitina. Falhas na degradação proteica estão relacionadas com diversas doenças neurodegenerativas (Catalgol et al., 2012). Martins et al., (2011), em três estudos de associação genômicos, identificaram nove SNPs - *single nucleotide polymorphisms* - neste gene e os associaram com a susceptibilidade para a DP.

IV.2) Locus Cerúleo

Após a análise de qualidade das lâminas, foram selecionados 26.851 transcritos válidos. Para identificar aqueles que são diferencialmente expressos foi realizado um teste conhecido como SAM (Significance Analysis of Microarray) adotando-se *fold* maior que 2. Foram obtidos 158 transcritos diferencialmente expressos e 154 destes estão anotados no banco de dados GO (Gene Onthology). Todos os transcritos estavam hiperexpressos na comparação entre casos com Doença de Parkinson versus controles normais.

A rede das amostras controle de Locus cerúleo, LC-CT possui oito hubs principais (**Tabela 4**) enquanto que a rede da DP possui 46 (**Tabela 5**). Os genes diferencialmente expressos foram categorizados segundo seu papel em processos biológicos de acordo o banco de dados GO, conforme mostrado na **Figura 6**. É interessante notar que algumas das categorias que aparecem aqui como principais, têm grande importância na manutenção de funções cerebrais. Podemos perceber que, assim como acontece na SN, a rede LC-DP (**Figura 8**) possui uma complexidade maior do que a observada na rede dos controles (**Figura 7**).

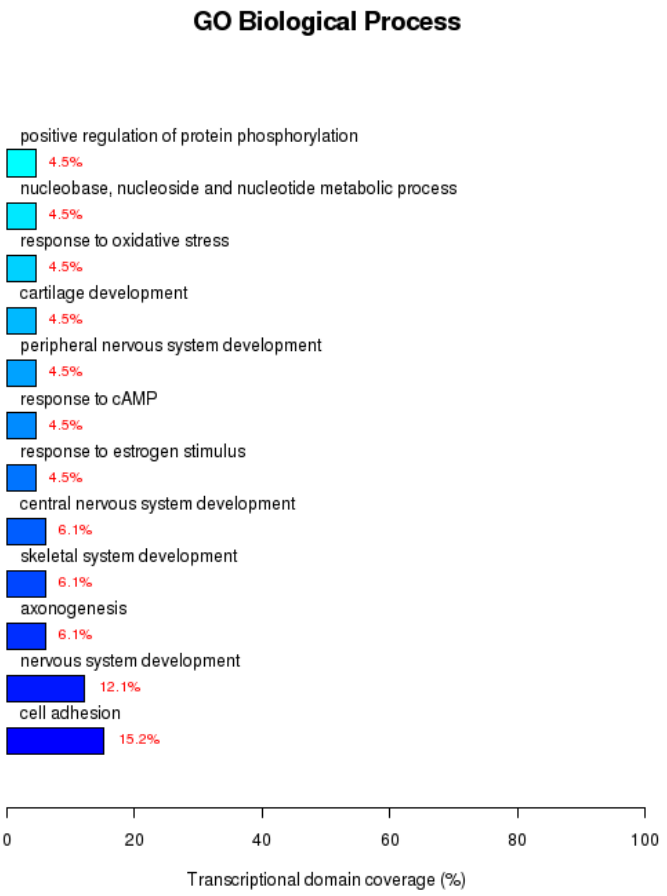

Figura 6.Categorização dos genes diferencialmente expressos no Locus Cerúleo.

IV-1.1) Análise dos hubs na rede LC-CT

A análise de rede foi feita através do software FunNet. Para esta análise foram consideradas 1.377 ligações gene-gene iniciais e, adotando-se um threshold de 0.75, forma selecionadas as 25% melhores ligações (218 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 153 genes dentro da rede LC-CT (**Figura 7**) e destes identificaram-se 8 hubs conforme a **Tabela 4**. A seguir são descritas sucintamente as funções dos genes que correspondem aos principais hubs, com o mesmo enfoque utilizado nas redes da Substancia Nigra, enfatizando, quando possível o papel do gene na região anatômica do cérebro sob estudo e na DP.

Tabela 4. Genes que possuem o maior número de ligações em amostras de *Locus ceruleus* na rede de interação do Controle (LC-CT). Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links LC-CT	Nº Links LC-DP
AMPD3	**43**	5
ACTA2	**41**	2
AQP4	**36**	6
ASPA	**31**	1
APOD	**28**	27
ALS2	**17**	14
AMT	**13**	9
ATG9B	**11**	4
C3orf58	5	6
TOB2	5	28
A1CF	4	0
CLCA4	4	3
ERMN	4	8
H3F3B	4	20
HIST1H2AC	4	19
IGSF11	4	7
MAP7	4	26
PCSK6	4	1
PI3	4	1
SATB2	4	0

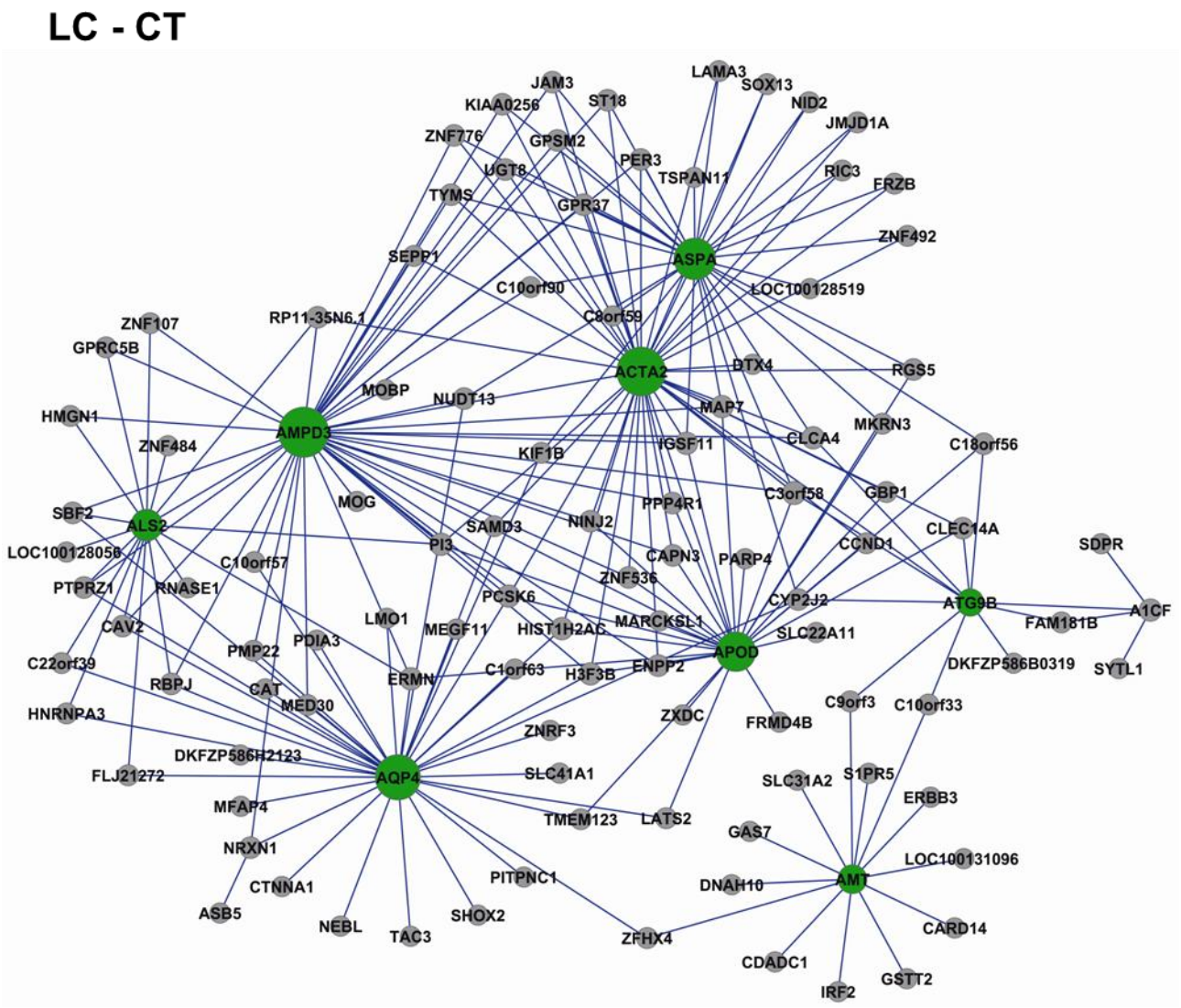

Figura 7. Rede de interação transcricional para amostras do Locus Cerúleo de indivíduos controle (LC-CT).

AMPD3 - Este gene codifica um membro da família AMP deaminase. Esta proteína é uma enzima altamente regulada que faz parte do ciclo da purina catalisando a desaminação hidrolítica do monofosfato de adenosina para monofosfato de inosina, produzindo amônia. As células do cérebro não possuem algumas enzimas chave envolvidas no ciclo da ureia e, assim, não é possível remover a amônía através desta rota. Em condições que levam a um aumento dos níveis de amônia, tais como na encefalopatia hepática, são observadas mudanças na função cerebral como desorientação e perda de memória (Kaminsky e Kosenko, 2010; Kosenko e Kaminsky, 2010). A desregulação do metabolismo da amônia pode afetar os neurônios e glia, comprometendo a viabilidade celular e afetando a capacidade de sinalização, a homeostase de íons, processamento de proteínas e o metabolismo destas células. Sims et al. (1998) descreveram que a atividade do gene AMPD estava aumentada em pacientes com a doença de Alzheimer.

ACTA2 - A proteína codificada por este gene, alfa-actina, pertence à família de proteínas da actina, que são altamente conservadas e desempenham um papel importante na motilidade, estrutura e manutenção da integridade celular (Malloy et al., 2012). Esta proteína é a mais abundante nas células da musculatura lisa (a alfa actina é um constituinte do aparato contrátil, enquanto que as isoformas beta e gama estão envolvidas na regulação da motilidade celular), e estão expressas nas artérias lesadas participando dos processos de proliferação celular, migração, e transdução de sinal (Ailawadi et al., 2009 e Alexander et al., 2012). Além disso, esta proteína é um marcador de pericítos (células de Rouget) no cérebro. Os pericitos são células progenitoras com potencial multilinhagem, capazes de liberar fatores neurotróficos (Somoza et al., 2010) e originar células gliais e neurônios imaturos (Paul et al., 2012), sendo objeto de grande interesse no campo da terapia celular da DP (Somoza et al., 2010; Dore-Duffy et al. 2011; Paul et al., 2012).

AQP4 - Este gene codifica um membro da família de proteínas de aquaporina que funcionam como canais seletivos de água na membrana citoplasmática de muitas células. A proteína codificada por este gene está localizada nos astrócitos e tem distribuição altamente polarizada. Supõe-se que essa expressão polarizada, juntamente com a ausência de tight junctions nos astrócitos aumente a homeostase iônica, melhorando assim o desempenho neuronal, possivelmente à custa de restrição da neurogênese e da regeneração (Mack e Wolburg 2012). AQP4 também ganhou muita atenção devido ao seu envolvimento na patofisiologia de diversos distúrbios cerebrais, incluindo hidrocefalia, tumores, AVC, infecções, epilepsia, e lesões cerebrais traumáticas (Chi et al., 2012). Além disso, a deficiencia de AQP4 aumenta o limiar e a duração das convulsões, sugerindo este gene tem papel na modulação da

excitabilidade neuronal através da regulação osmótica de ambientes iônicos em torno dos neurônios (Binder et al.,2004). Estudos recentes demonstraram que o gene AQP4 seria o antígeno alvo das respostas autoimunes na neuromielite óptica, uma doença inflamatória desmielinizante que afeta seletivamente nervos ópticos e medula espinal (Lennon et al., 2005). Existem evidências crescentes que indicam que as respostas neuroinflamatórias desempenham um papel importante na degeneração nigroestriatal associada à doença de Parkinson, tanto em modelo experimental murino (Gao et al, 2002, 2003; Iravani et al., 2002), como na DP clínica (Knott et al., 2000; McGeer & McGeer, 2004). Fan et al., (2008), descreveram que camundongos *knockout* para o gene AQP4 estavam mais propensos à degeneração causada pelo MPTP e que estes animais apresentarvm uma gravidade maior nos sintomas da DP do que os que expressavam normalmente o gene AQP4.

ASPA – Este gene codifica uma enzima que catalisa a conversão de N-acetyl_L-ácido aspártico (NAA) para aspartato e acetato (Sommer e Sass 2012). NAA é abundante no cérebro, onde a hidrólise por aspartoacilase parece ajudar na manutenção da substância branca. A deficiência genética de ASPA é a causa da doença Canavan (CD) (Kaul et al., 1993). CD é uma doença neurodegenerativa que apresenta uma leucodistrofia espongiforme e uma perda progressiva das funções neuronais que conduzem frequentemente à morte precoce (Sommer e Sass 2012).

APOD - Como descrito anteriormente, a proteína codificada por este gene tem sido relacionada com a resposta ao envelhecimento, lesões teciduais e neurodegeneração (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b). Ela também parece estar intimamente associada à lecitina, enzima envolvida com o metabolismo de lipoproteínas. É interessante notar que esse gene é um hub principal comum entre LC-CT e LC-DP, além de ser um dos hubs principais na rede SN-CT.

ALS2 - A proteína codificada por este gene, a alsina, funciona como um fator de troca de guanina pela GTPase codificada pelo gene RAB5. Esta proteína está localizada, junto com a de gene RAB5, nos endossomos imaturos e funciona como um modulador para a dinâmica endossomal. Mutações neste gene resultam em várias formas da esclerose lateral juvenil e infantil (Shirakawa et al., 2009 e Mintchev et al., 2009). Estas mutações são responsáveis por uma degeneração retrógrada dos neurônios motores superiores dos tratos piramidais, levando a uma paraplegia infantil ascendente contínua (Bertini et al., 2005). Li et al., (2011) descreveram que a alsina pode atenuar a sinalização de vias pró-inflamatórias reguladas por Nox2 em células gliais mutadas para o gene SOD1 e que este efeito, por sua vez, influencia a sobrevivência de neurônios motores. Interessantemente, a hiperexpressão de alsina, na ausência do gene SOD1 mutado, amplifica a sinalização das vias pro-infamatórias

promovendo a morte celular de uma maneira semelhante àquela que ocorre com a expressão de SOD1 mutado. Li et al., (2011) ainda sugerem que a alsina poderia regular as vias pró-inflamatórias através de endossomos de sinalização redox – redoxissomos- estas organelas são conhecidas por facilitar a ativação dos receptores TNFR e IL-1R, conhecidamente pró- inflamatórios, através de mecanismos de oxido-redução.

AMT - Este gene codifica um dos quatro componentes essenciais do sistema de clivagem de glicina, é expresso em astrócitos (Sato et al., 1991) e participa do metabolismo mitocondrial de folato (Narisawa et al., 2012). Tem sido sugerido o envolvimento deste sistema na patogênese de hiperglicinemias, um grupo de transtornos metabólicos caracterizado por níveis elevados de glicina nos fluidos corporais. Pacientes com um sistema defeituoso de clivagem da glicina desenvolvem letargia, hipotonia, mioclonias, convulsões generalizadas e não respondem à terapia anticonvulsivante (Pardal-Fernández et al., 2009). Mutações nesse gene causam defeitos de fechamento de tubo neural. (Narisawa et al., 2012)

ATG9B - É uma proteína transmembrana que atua na regulação da autofagia, uma via de degradação lisossomal. A atividade autofágica anormal é frequentemente observada em populações neuronais específicas presentes em doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Son et al., 2012). Além disso, estudos indicam que a α-sinucleína é degradada por um sistema de macro autofagia mediado pelas chaperonas (Son et al., 2012). Estudos indicam que a hiperexpressao da α-sinucleína inibe a autofagia (Winslow et al., 2011) provavelmente intensificando ainda mais o acúmulo e a toxicidade da α-sinucleína no cérebro.

IV-1.2) Análise dos hubs na rede LC-DP

A partir dos genes diferencialmente expressos foi feita uma análise de rede utilizando o software FunNet. Para esta análise foram consideradas 11.781 ligações gene-gene iniciais e, adotando-se um threshold de 0.92, foram selecionadas as 8% melhores ligações (628 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 127 genes dentro da rede LC-DP (**Figura 8**) e destes identificaram-se 47 hubs conforme a **Tabela 5**. A seguir descreve-se sucintamente o papel cada um dos genes correspondentes aos 10 primeiros hubs principais.

Tabela 5: Genes que possuem o maior número de ligações em amostras de *Locus ceruleus* na rede de interação da Doença de Parkinson (LC-DP).Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links LC-CT	N º Links LC-DP	Gene	Nº Links LC-CT	N º Links LC-DP
SDPR	1	**44**	ZNF484	1	20
PPP4R1	3	**43**	HIST1H2AC	4	19
FLJ21272	2	**42**	SLC41A1	1	19
PARP4	1	**33**	HIST1H3A	2	18
MED30	2	**30**	MITF	1	18
NUDT13	3	**29**	NAIP	1	18
GAS7	1	**28**	CTNNA1	1	17
SFRS18	1	**28**	PTPRZ1	3	17
TOB2	5	**28**	C9orf3	2	16
ZNRF3	1	**28**	LOC100128519	1	16
APOD	28	**27**	GPSM2	3	15
MAP7	4	26	RIC3	2	15
RGS5	3	26	ALS2	17	14
CCND1	2	25	CAV2	3	14
CTDSPL	1	25	HMGN1	2	14
HNRNPA3	2	24	KIAA0484	2	14
JMJD1A	2	24	MGP	1	13
LOC100128056	1	24	TSPAN11	1	13
C10orf57	2	23	C22orf39	2	12
KIF1B	2	23	CHD7	1	12
PLA2G5	2	22	SOX2OT	2	11
ZXDC	1	22	VCAN	1	11
H3F3B	4	20	SOX13	2	10
SBF2	3	20	AMT	13	9

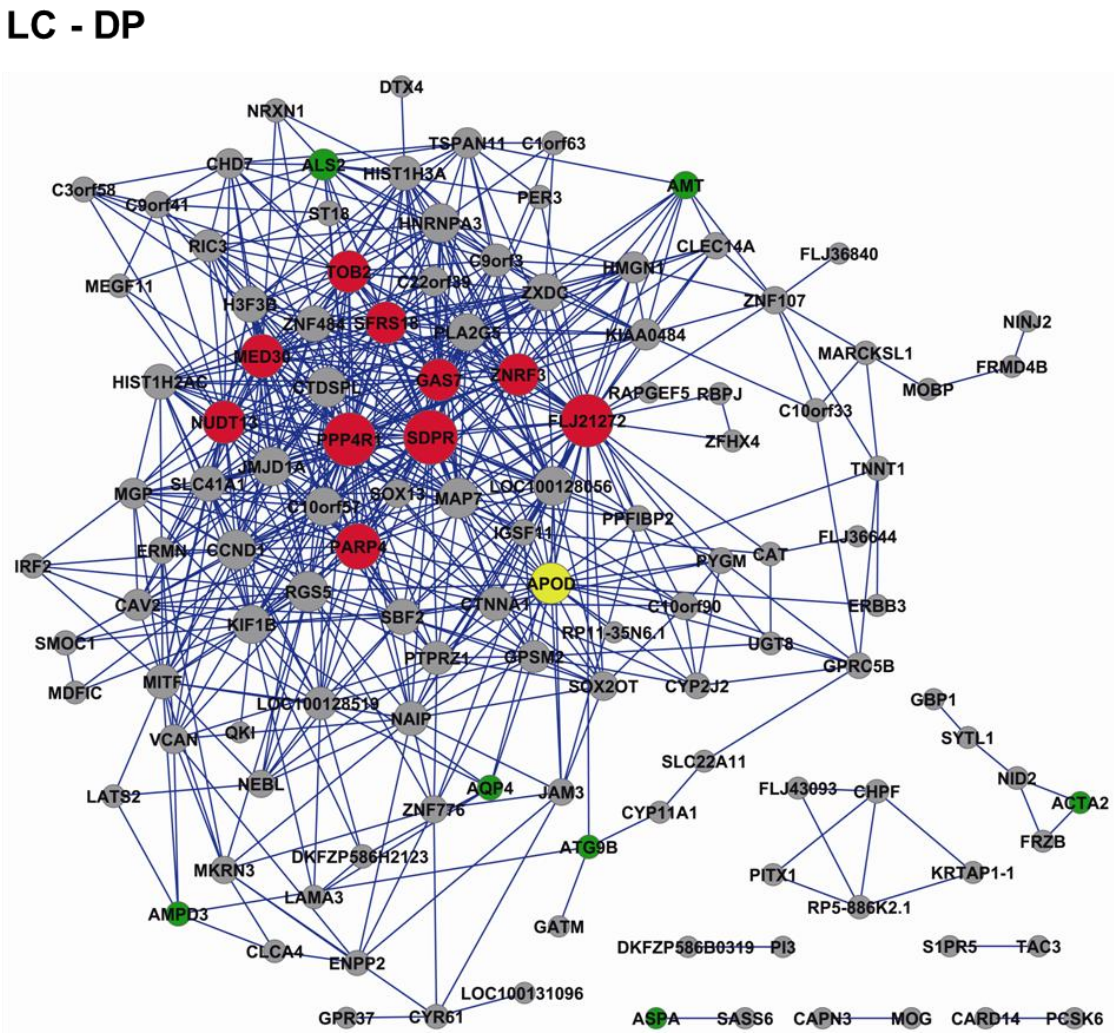

Figura 8. Rede de interação transcricional para amostras do Locus Cerúleo de indivíduos com Doença de Parkinson (LC-DP).

SDPR – Este gene codifica uma proteína que se liga a fosfolipídios independentemente da presença do cálcio. Este gene tem sido descrito como indutor da curvatura da membrana para a formação da clavéola. A clavéola forma um único compartimento na superfície da maioria das células que são capazes de fazer transporte transcelular de moléculas através da endocítose, exocitose, direcionando as moléculas para locais específicos dentro da célula ou exportando para o espaço extracelular (Anderson 1998). Estas estruturas têm um papel chave na manutenção da integridade da membrana plasmática e nos processos transdução de sinal (Gazzerro et al., 2010).

PPP4R1 – Este gene codifica uma das várias subunidades reguladoras de fosfatase 4 de serina / treonina (PP4c). Esta proteína faz parte da sinalização dependente de fosforilação. Uma questão importante neste mecanismo é a especificidade do processo, isto é, um determinado substrato deve ser fosforilado (e desfosforilado) em um momento e um local específico para regular adequadamente uma dada função. Vários mecanismos existem para garantir essa especificidade, por exemplo, os membros da família fosfatase fosfoproteína (PPP) 4 associados com proteínas reguladoras especificam o substrato alvo, a localização subcelular e a ativação de sinais (Chen et al., 2008). Este polipeptídeo também é essencial para o crescimento e organização de microtúbulos, recuperação de danos no checkpoint de DNA, apoptose e sinalização de TNFαI (Chen et al., 2008). Além disso, Zhang et al.,. (2005) descreveram que a proteína codificada por este gene interage com o gene HDAC3, responsável pela regulação da expressão gênica através da acetilação e desacetilação de histonas.

FLJ21272 - *hypothetical protein FLJ21272*. Atualmente é considerado um artefato de clonagem pelo NCBI (Gene ID: 80100, descontinuado em 21-Fev-2009). Mesmo assim, o *probe* para esta sequencia foi mantido pela Agilent Technologies no DNA *microarray* utilizado neste estudo. No entanto este transcrito não será aqui considerado funcionalmente tendo em vista o acima comentado.

PARP4 – A proteína codificada por este gene é capaz de catalizar a reação de polimerização de cadeias longas de poli ADP-ribose, é a maior preoteína da familia PARP com 193 kDa, e faz parte do chamado vault (MVP) - complexos de ribonucleoproteínas- que ainda não tiveram a sua função completamente elucidada. As MVPs estão presentes ao longo do eixo núcleo-neuritos, têm alta expressão em neurônios em desenvolvimento e se associam a mRNAs em neurônios corticais (Paspalas et al., 2008). Os vaults possuem o interior oco e alguns autores relacionam

sua função com o transporte de moléculas (Kickhoefer et al., 2010). Herlevsen et al., 2007 demonstraram que culturas de células de câncer de bexiga que tiveram os genes envolvidos com o vault silenciados apresentaram uma inibição do sequestro de doxorrubicina citosólica pelos lisossomos perinucleares. Este efeito foi acompanhado nao só por um maior acúmulo da droga administrada para tratamento do câncer, mas tambémpor uma maior citotoxicidade nuclear e perturbação geral do compartimento lisossomal, sugerindo um papel fundamental de MVP na manutenção dos lisossomos. O mecanismo de poli ADP-ribose possui papel importante em diversos processos biológicos como a regulação da estabilidade genômica, especificidade transcricional, metabolismo energético e apoptose. Além disso, o mecanismo de poliribosilação associado à PARP1 tem sido relacionado à patogenicidade de tumores, a processos inflamatórios e a doenças neurodegenerativas (Hassa e Hottiger, 2008).

MED30 - A proteína que este gene codifica faz parte do complexo de multiproteínas, TRAP/Mediator que facilita a expressão gênica através de uma grande variedade de ativadores de transcrição (Baek et al., 2002). Este complexo parece participar da transdução de sinal através da ativação e repressão da atividade da RNA polimerase II e dos fatores de transcrição (Conaway e Conaway, 2011). O complexo Mediador é um processador de sinal, através do qual, por fatores de transcrição de genes específicos, a informação para a regulação da RNA polimerase II é transmitida a fim de alterar a programação da expressão gênica, controlar o crescimento celular, a homeostase, desenvolvimento e a diferenciação. Evidências sugerem que este complexo daria suporte para a transcrição, em parte, atuando como uma ponte entre os fatores de transcrição, a RNA polimerase II e os outros componentes da maquinaria transcricional (Conaway e Conaway, 2011).

NUDT13 – as proteínas desta familia são conhecidas como hidrolases NUDIX e são responsáveis pela metabolização de nucletídeos (Abdelraheim et al., 2003). A função da proteína codificada por este gene, assim como as codificadas pelos genes NUDT7, 8, 12 and 19 posivelmente estariam ligadas a regulação da natural e / ou eliminação das formas oxidadas de NAD(P)H, cofatores de CoA nos peroxissomos, mitocôndrias e, possivelmente, no citoplasma (McLennan 2000). A mitocôndria é responsável por intensa produção de espécies reativas de oxigênio e também por manter o controle homeostático da concentração de íons como cálcio e ferro (de Moura, et al.,2010). Alterações na remoção de proteínas oxidadas ou no metabolismo da própria mitocondria poderiam gerar espércies reativas de oxigênio e, portanto um aumento no estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem papel importante no envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas, espécies reativas de oxigênio servem como moléculas sinalizadoras, mas o acumulo delas leva as disfunções de

proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (Wang et al., 2010).

GAS7 - A proteína codificada por este gene desempenha um importante papel no desenvolvimento neuronal- a neuritogênese - e é expressa principalmente em células do cérebro terminalmente diferenciadas, sendo detectada em células de Purkinje em cultura (You e Lin-Chao, 2010). A hipoexpressão deste gene foi mostrada no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Akiyama et al., 2009). Recentemente, Huang et al., (2012) demonstraram que camundongos com o gene GAS7 mutado apresentavam deficiência nas atividades motoras. Estas alterações seriam causadas pela diminuição no numero de neurônios motores e da força muscular. Eles ainda descreveram que o crescimento de neurônios na porção terminal dos nervos nas junções neuro-musculares estava consideravelmente reduzido durante o envelhecimento desses animais.

SFRS18 – A proteína codificada por este gene pertence à família SR de fatores de clivagem, com papel relevante na clivagem de pre-mRNAs e também em atividades pós-clivagem como a exportação do mRNA nuclear, sendo reguladores pivotais do metabolismo de RNA (Long e Cáceres, 2009).

TOB2 - As duas proteínas TOB em humanos, codificadas por genes parálogos (TOB1 e TOB2), pertencem a um grupo de fatores antiproliferativos, a família BTG / TOB. Além de possuírem funções na proliferação celular, as proteínas pertencentes à família BTG / TOB também têm sido relacionadas ao desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, a supressão de tumores e apoptose (Ezzeddine et al., 2012). A detecção de uma interação direta entre proteínas BTG / TOB e o CAF1 desadenilase sugere uma função dos genes TOB na desadelinação, importante processo pós-transcricional que regula os níveis citoplasmáticos de mRNA (Ezzeddine et al., 2012).

ZNRF3 - A proteína codificada por este gene, uma *zinc finger protein* de membrana, é uma E3 ubiquitina ligase (Koo et al., 2012). Este tipo de ligase possui função no metabolismo de degradação de proteínas através do mecanismo de ubquitina-proteassomo. Além disso, esta proteína ainda regula, através de feedback negativo, a via metabólica do Wnt. As proteínas envolvidas na via do Wnt regulam o cofator de transcrição β-catenina e a expressão de genes chave de controle de desenvolvimento. Estas proteínas também induzem a sinalização polar dos tecidos que rege os movimentos celulares. Perturbações da via de sinalização Wnt podem levar a doenças degenerativas e câncer (Koo et al., 2012).

APOD - Como descrito anteriormente, a proteína codificada por este gene tem sido relacionada com a resposta ao envelhecimento, dano tecidual e neurodegeneração (Bajo-Grañeras et al., 2011). Essa proteína tem função antioxidante e contribui para manter o perfil funcional do sistema nigroestriatal.

IV.3) Núcleo Dorsal do Nervo Vago

Após a análise de qualidade das lâminas, foram selecionados 22.227 transcritos válidos. Para identificar aqueles que são diferencialmente expressos foi realizado o teste de Mann-Whitney utilizando a significância de 1% adotando-se como *cut off* um *fold* maior que 1,47. Foram obtidos 319 transcritos diferencialmente expressos e 255 destes estão anotados no banco de dados GO (Gene Onthology). Todos os transcritos estavam hiperexpressos na comparação entre casos com Doença de Parkinson e controles normais. Nesta região, a rede VA-CT possui sete hubs e a VA-SN possui 40. Verifica-se, também neste caso, a maior complexidade da rede de interações gênicas na DP.

Para auxiliar o entendimento geral dos mecanismos alterados nesta área do cérebro os genes diferencialmente expressos foram categorizados segundo sua participação em processos biológicos, conforme o banco de dados GO, conforme mostrado na **Figura 9**. É interessante notar que as categorias de direcionamento de axônios, organização do citoesqueleto de actina e desenvolvimento do sistema nervoso que aparecem aqui tem grande importância na manutenção das funções cerebrais.

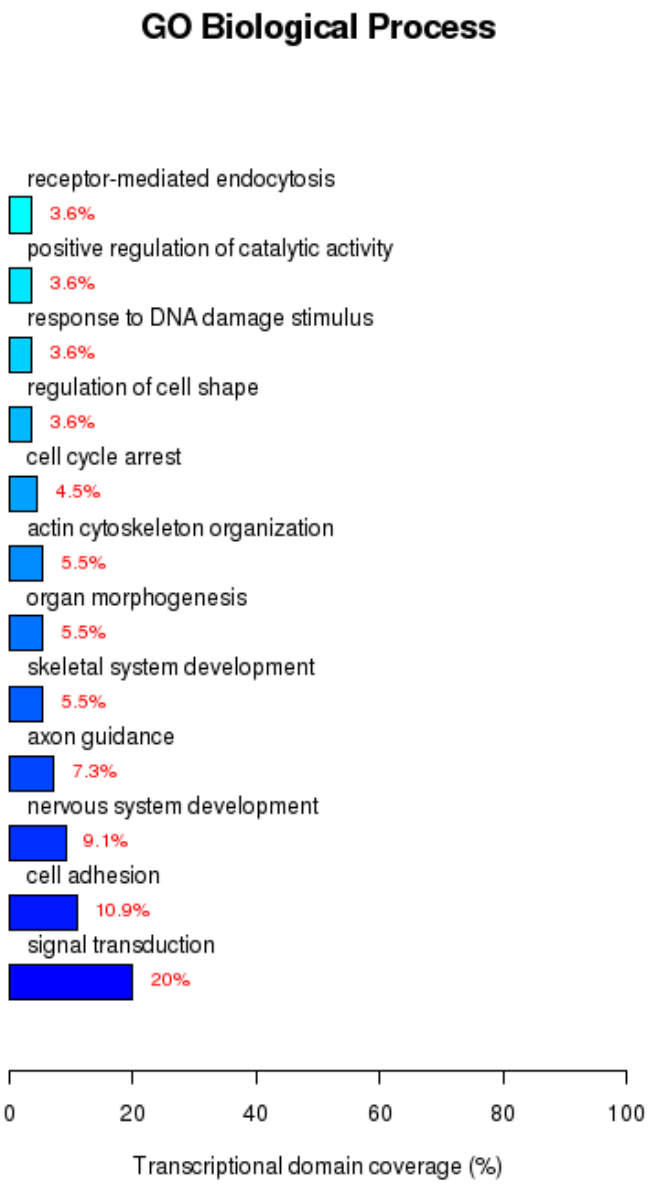

Figura 9. categorização dos genes diferencialmente expressos no Nícleo dorsal do nervo Vago.

IV-3.1) Análise dos hubs na rede VA-CT

A partir dos genes diferencialmente expressos foi feita uma análise de rede utilizando o software FunNet. Para esta análise foram consideradas 1.701 ligações gene-gene iniciais e, adotando-se um threshold de 0.89, foram selecionadas as 11% melhores ligações (322 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 164 genes dentro da rede de interação gênica VA-CT (**Figura 10**) e, destes, identificaram-se 7 hubs principais conforme a **Tabela 6.** A seguir descreve-se sucintamente o papel cada um dos genes correspondentes aos hubs principais, com ênfase, quando for o caso, no seu papel específico na região do cérebro em estudo e na DP.

Tabela 6. Genes que possuem o maior número de ligações na rede VA-CT. Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links VA-CT	Nº de Links VA-DP
AAAS	**83**	21
ABCA3	**70**	31
ABHD9	**51**	17
ADAP1	**38**	8
ABL1	**37**	12
ADAM15	**31**	3
ABLIM3	**15**	3
FLYWCH1	5	9
IFT88	5	13
JUP	5	6
BAHCC1	4	17
C19orf57	4	24
C7orf26	4	35
CDH22	4	7
CPNE2	4	42
CPSF3L	4	34
H1FX	4	5
HDGF2	4	13
MAN2A1	4	3
NAT9	4	6

VA - CT

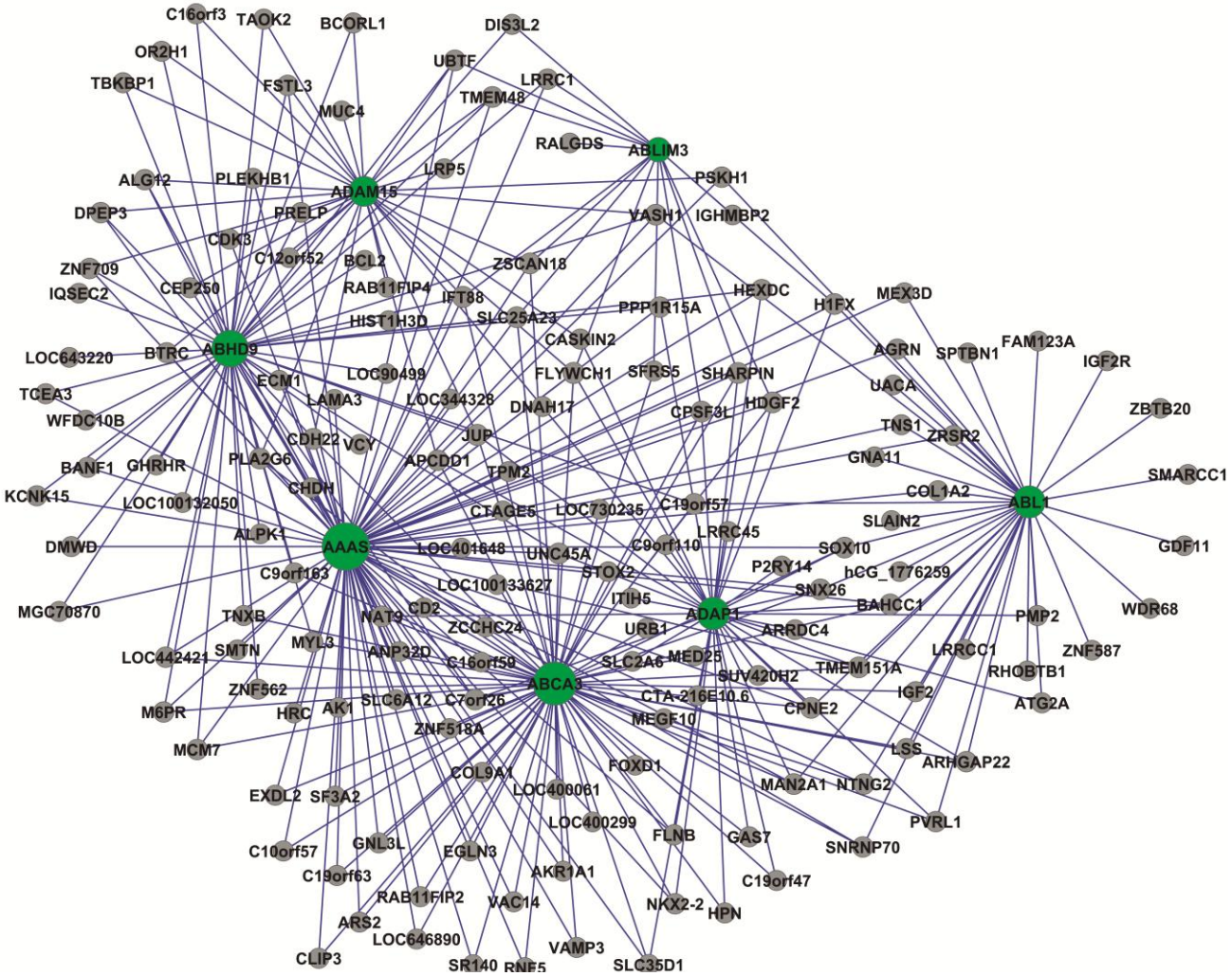

Figura 10. Rede de interação transcricional para amostras do Núcleo Dorsal do Nervo Vago de indivíduos controle (VA-CT)

AAAS - A proteína codificada por este gene é um membro da família WD-repeat de proteínas reguladoras e podem estar envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso periférico e central (Milenkovic et al., 2010). A proteína AAAS é parte do complexo do poro nuclear onde está ancorada via NDC1 Essa proteína está envolvida com a proteção do núcleo da célula contra dano oxidativo (Storr et al., 2009). Mutações no gene AAAS causam a síndrome Allgrove (Vallet et al., 2012; Milenkovic et al., 2010). Esta sindrome é caracterizada por apresentar, como primeiros sintomas, alterações endócrinas e gastrointestinais e posteriormente alterações neurológicas como dificuldade de andar na infância, acalasia (resultando em disfagia, vômitos e perda de peso) e alterações na marcha (Vallet et al., 2012).

ABCA3 – A proteína codificada por este gene faz parte da subclasse A da família de proteínas transportadoras ABC, é principalmente expressa no pulmão, mas sua expressão também foi detectada em oligodendrócitos, neurônios, astrócitos e microglia (Kim et al., 2006). Subcelularmente, estas proteínas estão localizadas na membrana plasmática, na membrana lipídica do complexo de Golgi, nos endosssomos, retículo endoplasmático, peroxissomos e também na mitocôndria (Kaminski et al.,, 2006). As proteínas ABC transportam diversas moléculas através das membranas extra e intracelulares e a subfamília A seria responsável pela regulação do transporte de lipídios no cérebro (Kim et al., 2006). Esta subfamília ganhou foco especial nos últimos anos, uma vez que mutações em quatro membros foram identificadas como as causas de algumas doenças monogênicas em seres humanos, incluindo mutações no ABCA1 (doença de Tangier), ABCA3 (deficiência de surfactante neonatal), ABCA4 (distrofias maculares), e ABCA12 (distúrbios hereditários de queratinização) (Kaminski et al., 2006). Lin et al., (2006) propuseram que, além de os transportadores ABC serem úteis como marcadores de células tronco estas proteínas também possuiriam papel crucial na auto-renovação deste tipo celular, impedindo a sua diferenciação. Pesquisas recentes também apontam para uma significativa contribuição de vários transportadores da subfamília de proteínas ABC para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, em especial a doença de Alzheimer (Piehler et al., 2012).

ABHD9 – As hidrolases de epóxido são uma superfamília de enzimas importantes para a destoxificação de epóxidos químicamente reativos e para o processamento de epóxidos endógenos que atuam como moléculas de sinalização (Decker et al., 2012). Estas moléculas de sinalização estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea, percepção da dor, angiogênese e inflamação (Decker et al., 2012). Foi descrito um aumento da expressão destas hidrolases em pacientes com a doença de Alzheimer (Liu et al., 2006).

ADAP1 – Esse gene codifica um proteína que possui intima ligação com a família de proteínas ArfGAP, que são descritos como reguladores do tráfego intracelular (Spang et al., 2010). Essa proteína, expressa principalmente nos neurônios do hipocampo, córtex, cerebelo e hipotálamo (Sedehizade et al., 2002), tem sido correlacionada com a manutenção da homeostase dos canais de cálcio na mitocôndria (Duszynski et ai. 2006). Sinais mediados pelo Ca2 + são cruciais para o controle de diversos processos fisiológicos como, por exemplo, em lesões celulares e morte celular programada (Galvita et al., 2009). Em neurônios, as mitocôndrias diminuem as grandes mudanças no Ca2 + citosólico dando suporte para a função neuronal (Nicholls et al.,. 2003). A mitocôndria é responsável por intensa produção de espécies reativas de oxigênio (de Moura et al., 2010) e, embora a causa da doença de Parkinson ainda seja obscura, a degeneração neuronal nesta doença sugere a existência de um processo ativo de toxicidade neuronal, provavelmente envolvendo estresse oxidativo.

ABL1- Esse gene codifica uma das três Abelson-quinases (ou AFKs), a Abl1. Além de seu conhecido papel na proliferação neoplásica, as AFKs, entre elas Abl1, tem função relevante na regulação da estrutura e função das sinapses. Recentemente mostrou-se que essas proteínas regulam a função dos receptores nicotínicos de acetilcolina e as sinapses nicotínicas nos neurônios autonômicos (Jayakar e Margiotta, 2011). Newhouse e Kelton (2000) descreveram que os receptores nicotínicos estariam alterados na doença de Alzheimer e Parkinson. Estes autores ainda relatam que a administração de nicotina melhora alguns aspectos do desempenho do motor e cognitivo e podem ajudar a aumentar a velocidade de processamento das tarefas mais complexas em pacientes com a DP.

ADAM15 – Este gene codifica uma metalopeptidase pertencente à família ADAM (desintegrina e metaloprotease). Este é uma família de glicoproteínas ancoradas na membrana celular. Estas metaloproteases são essenciais para a estrutura e função cerebral. Hipoxias nocivas e protetivas modificam expressão neuronal de ADAM15 e ADAM17 (Rybnikova et al., 2012). A proteína codificada pelo gene ADAM15, é capaz de neutralizar a apoptose induzida pelo estresse genotóxico através da supressão da ativação da caspase-3 (Fried et al., 2012). Foi demonstrado que a desregulação das ADAMs pode contribuir para a patogênese de doenças neurodegenerativas, especialmente Alzheimer e condições onde ocorre desmielinização (Rybnikova et al., 2011).

ABLIM3 – A proteína codificada por este gene e a codificada pelo gene ABLIM2 são expressas principalmente no músculo e no cérebro, conforme mostrado por Barrientos et al. (2007). Proteínas que possuem o domínio LIM foram descritas

desempenhando papéis importantes em vários processos biológicos, tais como o desenvolvimento embrionário e a diferenciação neoplásica. (Krupp et al. 2006). A função desta proteína ainda não foi completamente elucidada, mas ela parece servir como um andaime para módulos de sinalização do citoesqueleto de actina, através da interação com o gene STARS, e assim, modular a transcrição (Barrientos et al., 2007).

IV-3.2) Análise dos hubs na rede VA-DP

A partir dos genes diferencialmente expressos foi feita uma análise de rede utilizando o software FunNet. Para esta análise foram consideradas 14.794 ligações gene-gene iniciais e, com a adoção de um threshold de 0.92, forma selecionadas as 8% melhores ligações (634 ligações dentro da rede). Estas ligações correspondem a 197 genes dentro da rede VA-DP (**Figura 11**) e destes identificaram-se 40 hubs conforme a **Tabela 7.** A seguir descreve-se sucintamente o papel de cada um dos genes correspondentes aos 10 primeiros hubs, chamados de principais, com ênfase, quando for o caso, no seu papel específico na região do cérebro em estudo e na DP.

Tabela 7. Genes que possuem o maior número de ligações em amostras do Núcleo dorsal do nervo vago na rede de interação da Doença de Parkinson (VA-DP). Em negrito são destacados os hubs principais.

Gene	Nº Links VA-CT	Nº de Links VA-DP	Gene2	Nº Links VA-CT	Nº de Links VA-DP
ARS2	2	**42**	ARRDC4	1	14
CPNE2	4	**42**	C19orf47	2	14
BANF1	2	**35**	C10orf57	2	13
C7orf26	4	**35**	HDGF2	4	13
CPSF3L	4	**34**	IFT88	5	13
ABCA3	70	**31**	LOC442421	3	13
C19orf57	4	**24**	M6PR	3	13
APCDD1	3	**22**	ABL1	37	12
C19orf63	2	**22**	ALG12	3	12
CEP250	2	**22**	GNL3L	2	12
AAAS	83	**21**	VAMP3	2	12
AKR1A1	2	20	CD2	1	11
BTRC	2	20	CLIP3	2	11
ATF6B	1	18	LRRC1	3	11
ABHD9	51	17	TMEM48	4	11
AGRN	2	17	UBTF	4	11
BAHCC1	4	17	ANP32D	1	10
ARHGAP22	3	16	RNF5	2	10
ATG2A	2	16	SHARPIN	4	10
C9orf163	2	15	C3orf45	1	9
AK1	1	14			

VA - DP

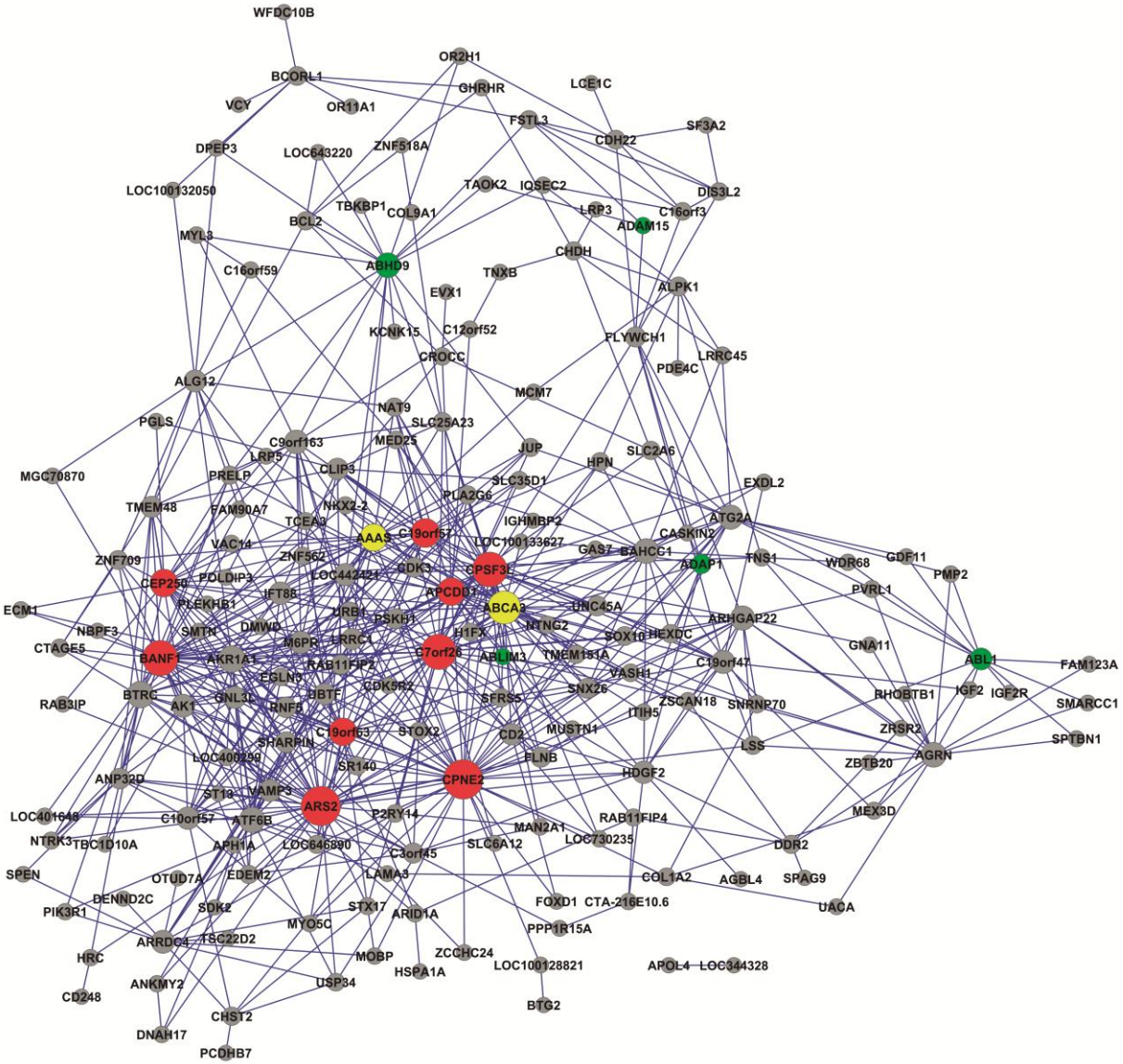

Figura 11. Rede de interação transcricional para amostras do Núcleo Dorsal do Nervo Vago em amostras de indivíduos com Doença de Parkinson

ARS2 – O produto deste gene é uma *zinc finger protein* que tem tido a sua função relacionada com a manutenção da plasticidade neuronal. ARS2 é altamente expresso durante a proliferação celular e retorna rapidamente para sua expressão basal após a remoção de sinais de crescimento (Gruber et al., 2012). Além disso, esta proteína é expressa por células tronco neuronais em camundongos adultos. Camundongos deficientes de ARS2 possuem uma diminuição no número de células tronco e na sua capacidade neurogênica (Andreu-Agullo et al., 2011).

CPNE2 - Este gene codifica uma proteína de ligação dependente de cálcio chamada copina, que pode regular eventos diversos moleculares na interface entre a membrana celular e o citoplasma. Alguns trabalhos mostram que estas proteínas podem representar uma via de transdução universal para a sinalização de cálcio, pois são capazes de interagir com uma grande variedade de proteínas alvo, incluindo MEK1 e CDC42, que são componentes de vias de sinalização intracelulares (Tomsig et al., 2003). Tomsig et al. também demonstraram que as copinas intermediam a associação, dependente de cálcio, de proteínas-alvo com fosfolipídeos, um fenômeno que poderia influenciar as atividades e localização intracelular das proteínas-alvo. As copinas podem, portanto, fazer parte de uma via diferente de sinalização através do cálcio abrangendo uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo o controle do crescimento, exocitose, mitose, apoptose, a transcrição gênica e organização do citoesqueleto (Tomsig et al.,. 2003).

CPSF3L – A proteína codificada por este gene faz parte do um complexo proteico chamado Complexo Integrador. Esse complexo é essencial para formação dos snRNAs (*small nuclear* RNAs), que têm como função o processamento de pré-mRNAs no núcleo da célula. Esta proteína é o centro catalítico deste complexo (Baillat et al., 2005) que tem uma associação direta com a porção C-terminal da RNA polimerase II, tendo assim papel na regulação da transcrição e no processamento de RNA (Baillat et al., 2005).

C7orf26 - A proteína codificada por este gene ainda não foi caracterizada (Gene ID: 79034, GeneBank).

BANF1 – A proteína codificada por este gene, denominada BAF, forma um homodímero que se localiza no núcleo e no citoplasma e é especificamente associada aos cromossomos durante a mitose. Essa proteína também tem sido relacionada com o processo de auto-renovação de células tronco. Células-tronco embrionárias humanas e murinas mutadas para o gene BANF1 entram em processo de diferenciação e tem sua sobreviência diminuída (Cox et al.,. 2011). Além disso, Puente et al.,. 2011 e Cabanillas et al. (2011) demonstraram que uma mutação neste gene seria a responsável por uma variante da Síndrome de Hutchinson-Gilford, denominada

Nestor-Gillermo Progeria Syndrome. Esta síndrome faz parte de um grupo de doenças raras de envelhecimento precoce, denominadas progerias. A análise funcional demonstrou que os fibroblastos dos pacientes com essa síndrome possuíam uma redução dramática no nível de proteína BAF, indicando que a mutação (p.Ala12Thr) prejudicaria a estabilidade dessa proteína (Puente et al., 2011).

ABCA3 – A proteína codificada por este gene faz parte da subclasse A da família de proteínas transportadoras ABC, como descrito na seção anterior. Pesquisas recentes apontam para uma significativa contribuição de vários transportadores de uma subfamília de proteínas ABC para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, em especial a doença de Alzheimer (Piehler et al., 2012).

C19orf57 - A proteína codificada por este gene ainda não foi caracterizada (Gene ID: 79173, GeneBank).

APCDD1 – A proteína codificada por este gene é um inibidor da via de sinalização do Wnt. As proteínas envolvidas na via do Wnt regulam o cofator de transcrição β-catenina e a expressão de genes chave de controle do desenvolvimento. A via de sinalização Wnt é crucial durante o desenvolvimento embrionário, desde o início da gastrulação e da organogênese e em organismos adultos, desempenha um papel central na manutenção da homeostase dos tecidos e na regulação das células tronco (Alves dos Santos e Smidt, 2011). Perturbações da via de sinalização Wnt podem levar a doenças degenerativas e câncer (Koo et al., 2012).Os cofatores da via de Wnt estão envolvidos na indução e manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico (Alves dos Santos e Smidt, 2011). Além disso, Giancarlo e Inestrosa (2000) já haviam mostrado que a perda da função de qualquer integrante da via do Wnt pode desencadear uma série de problemas de reconhecimento das proteínas que determinam o surgimento da doença de Alzheimer.

C19orf63 - A proteína codificada por este gene ainda não foi caracterizada (Gene ID: 284361, GeneBank).

CEP250 - Este gene codifica uma proteína do núcleo centrosomal necessária para a coesão centríolo-centríolo durante a interfase do ciclo celular (Mayor et al., 2002). O centrossomo é o centro de organização dos microtúbulos, ele possui importante papel nos processos relacionados com microtúbulos, tais como o tráfico intracelular, a morfologia e motilidade celular (Kim et al.,. 2008). A supressão deste gene induz a divisão celular prematura (Bahe et al.,. 2005).

AAAS – A proteína codificada por este gene é um membro da família WD-repeat de proteínas reguladoras provavelmente envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso periférico e central (Milenkovic et al., 2010). A proteína codificada é parte do complexo de poro nuclear onde está ancorada via NDC1. Mutações neste

gene causam a síndrome Allgrove, conforme mencionado na seção anterior (Vallet et al., 2012; Milenkovic et al., 2010).

V) DISCUSSÃO

A análise de redes de interação transcricional mostra que embora os genes integrantes dessas redes sejam essencialmente os mesmos para cada região anatômica, os genes que são hubs nas redes de amostras controle (redes CT, **Figuras 4, 7 e 10**) não se mantêm, salvo algumas poucas exceções, como hubs nas redes de amostras de pacientes (redes DP, **Figuras 5, 8 e 11**). As diferenças no padrão de ligações gene-gene entre redes CT e DP certamente estão associadas às alterações teciduais e metabólicas associadas à Doença de Parkinson. Essas diferenças de perfil transcricional entre CT e DP serão discutidas a seguir sob duas diferentes abordagens: i) análise comparativa dentro de cada região anatômica e ii) análise das principais categorias funcionais em que se distribuem os hubs, visando ao entendimento das vias moleculares associadas à Doença de Parkinson. A **Tabela 8** apresenta todos os hubs principais das redes de interação transcricional classificados por categoria funcional e sua distribuição pelas diferentes regiões anatômicas.

V-1) Perfis transcricionais na Substância Nigra

Os principais hubs da rede SN-CT (controles) estão distribuídos em três agrupamentos (**Figura 4**). O primeiro inclui os genes APOD, importante na resposta ao estresse oxidativo (Bajo-Grañeras et al., 2011a) e na proteção de astrócitos a substâncias geradoras de espécies reativas de oxigênio (Bajo-Grañeras et al., 2011b), e os genes mitocondriais AK2 e AGPAT5. AK2 tem papel relevante na proteção da célula contra proteínas não dobradas (Burkart et al., 2011) e AGPAT5 contribui para manter a adequada permeabilidade celular (Prasad et al., 2011) estando hiperexpresso em pacientes com a doença de Alzheimer (Williams, 2009). O segundo agrupamento tem como hub principal ANGEL2, um fator de transcrição, e os genes ABTB2, que integra o sistema ubiquitina-proteassomo e tem papel fundamental na degradação de proteínas danificadas pelo proteassomo (Catalgol e Grune, 2012), e ARHGAP1, importante para o controle dos filamentos de actina no complexo de Golgi. O terceiro agrupamento inclui os genes ANTXR1, que promove a proliferação celular e pode interagir com a via de Wnt, a qual está envolvida com a indução e manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico (Alves dos Santos e Smidt, 2011), ARAP2, que atua organização do citoesqueleto, transporte axonal e é hiperexpresso em neurônios submetidos a estresse oxidativo (Boutahar et al., 2011), e ADD3, que codifica uma aducina envolvida na função sináptica, no funcionamento do complexo de

Tabela 8 – Distribuição dos principais hubs por categoria funcional e região anatômica

Categoria	**Região anatômica**					
	SN- CT	**SN-DP**	**LC-CT**	**LC-DP**	**VA-CT**	**VA-DP**
Regulação da transcrição e expressão gênica	ANGEL2	RSF1		MED30; TOB2; SFRS18	ABLIM3	CPSF3L
Ubiquitina proteassomo/estresse oxidativo/ degradação/ autofagia/ neurotoxicidade	ABTB2; APOD	USP37	ATG9B; APOD; AMPD3	NUDT13; ZNRF3; APOD	ABDH9; AAAS	AAAS
Resposta ao envelhecimento/ Neuroproteção	APOD; AK2	HNRNPA3	APOD	APOD	ADAM15	BANF1
Dobramento proteico	AK2	ZNF518A				
Citoesqueleto/ actina/adesão celular/*axon guidance*	ARAP2; ARHGAP21; ANTXR1	CLDND1	ACTA2	PPP4R1	ABLIM3	CPNE2
Neurogenese/ plasticidade neuronal/ metilação regulação de proliferação e diferenciação celular	ANTXR1	TET2	ACTA2	GAS7; TOB2; PARP4	AAAS; ABCA3	ARS2; BANF1; AAAS; APCDD1
Transdução de sinal/ sinalização				PPP4R1	ABHD9	CPNE2
Mitocôndria	AK2; AGPAT5	TET2	AMT	NUDT13	ADAP1	
Apoptose				TOB2		
Tranporte de moléculas transmembrana				SPDR	AAAS; ABCA3	AAAS; ABCA3
Associados à DP, a outras doenças neurodegenerativas ou ao envelhecimento	AGPAT5	USP37; CRYBG3; TET2	AMPD3; AQP4; ASPA; ALS2; ATG9B	GAS7	ABCA3; ABHD9; ADAM15; ABL1	ABCA3; APCDD1
Inflamação		MAP4K4	ALS2			
Sinapse	ADD3	BVES; TBC1D12			ABL1	
Manutenção da substância branca			ASPA			
Ciclo celular				TOB2		CEP250
Homeostase iônica	AGPAT5		AQP4		ADAP1	
Permeabilidade e polaridade celular		CLDND1				

Golgi e no crescimento de neuritos (Lou et al., 2013).

Na rede SN-DP (pacientes com DP) há uma mudança significativa em relação à rede SN-CT (controles): os genes que eram hubs em SN-CT se deslocam para posições periféricas na rede (menos ligações gene-gene) e um novo conjunto de hubs emerge (**Figura 5**). Os hubs principais formam essencialmente um único agrupamento centrado em TET2. Esse gene atua no processo epigenético de regulação da expressão gênica e pode estar envolvido tanto nos processos de envelhecimento mitocondrial (Dzitoyeva et al., 2012), como de indução de pluripotencialidade em céluas somáticas (Doege et al., 2012). O segundo hub com maior número de ligações é BVES, um gene envolvido com transporte vesicular e transmissão sináptica, onde interage diretamente com SNARE (Hager et al., 2010). O terceiro hub, CRYBG3, é um marcador de senescência (Casadesús et al., 2012). Em sequência decrescente quanto ao número de ligações gene-gene aparecem os seguintes hubs: TBC1D12, envolvido com sinapse e transporte vesicular, MAP4K4 com inflamação e morte neuronal, CLCND1 com mielinização, oligodendrócitos e neurogênese, ZNF518A com dobramento proteíco, HNRNPA3, senescência e neuroproteção, FAM133B que codifica uma proteína associada aos corpúsculos de Lewy, RSF1 que participa da remodelação da cromatina e USP37, uma ubiquitina, associada à degradação proteica na DP (para detalhes e referências sobre esses genes ver a seção IV-1.2). Esse quadro é compatível com o cenário de degeneração neuronal derivado dos processos de envelhecimento (Schapira e Jenner, 2011) e com os mecanismos de compensação (neurogênese, Jing et al., 2012; Wang et al., 2012) ativados na substância nigra nos estágios 4 e 5 da DP (Kingsbury et al., 2010).

V-2) Perfis transcricionais no Locus Cerúleo

Todos os hubs da rede de interação transcricional LC-CT estão envolvidos em funções relevantes para a manutenção do funcionamento normal dos tecidos cerebrais. AMPD3, o hub principal, é um gene fundamental para regular o metabolismo de amônia no cérebro e sua expressão é aumentada em doenças neurodegenerativas (Kosenko e Kaminsky, 2010). ACTA2, o segundo hub com maior número de ligações gene-gene, se expressa em pericitos, células progenitoras mesenquimais capazes de liberar fatores neurotróficos e originar células gliais e neurônios imaturos (Somoza et al., 2010; Paul et al., 2012). AQP4 ajuda a regular a excitabilidade neuronal (Binder et al., 2004). Camundongos deficientes na expressão desse gene são mais sensíveis à neurodegeração causada por MPTP e apresentam maior gravidade nos sintomas de DP induzidos por essa droga (Fan et al., 2008). O próximo hub, ASPA, é um gene que

atua na manutenção da substância branca (Sommer e Sass, 2012). A seguir vem APOD, um gene importante na resposta ao envelhecimento, lesões teciduais e neurodegeneração (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b), e que é um hub principal comum às redes SN-CT, LC-CT e LC-DP. ALS2, que codifixa uma alsina, é um modulador da dinâmica endossomal: mutações nesse gene levam à degeração retrógrada dos neurônios motores superiores dos tratos piramidais (Bertini e t al., 2005). ALS2 também atenua a sinalização das vias pró-inflamatórias reguladas por Nox2, o que favorece a sobrevivência dos neurônios motores (Li et al., 2011). Finalmente, AMT é um gene essencial no metabolismo mitocondrisl de folato (Narisawa et al., 2012) e ATG9B codifica uma proteína transmembrana que atua na regulação a autofagia, um processo importante para a degradação de α-syn e que se encontra alterado na DP (Winslow et al., 2011).

A rede LC-DP forma um único agrupamento de hubs, onde os hubs principais, SPDR e PPP4R1 estão ligados, respectivamente, à formação da clavéola (uma estrutura essencial para os processos de endocitose e exocitose) (Gazzerro et al., 2010) e crescimento e organização de microtúbulos e acetilação/desacetilação de histonas (Chen et al., 2008). O hub seguinte, PARP4 é um gene expresso em neurônios em desenvolvimento e codifica uma proteína presente no eixo núcleo-neurito (Paspalas et al., 2008). MED30, o próximo hub, é um gene ligado ao controle da maquinaria de transcrição (Conaway e Conaway, 2011). A segir vem NUDT13, que atua no controle do estresse oxidativo ao nível mitocondrial, uma função muito demandada na DP (Wang et al., 2010). Na sequência tem-se GAS7, um gene importante para a neuritogênese, detectado em células de Purkinge (You e Lin-chiao, 2010). Camundongos com GAS7 mutado apresentam distúrbios motores (Huang et al., 2012). Os próximos hubs, SFRS18 e TOB2 são genes envolvidos no metabolismo de RNA. Finalmente tem-se ZNFR3, uma E3 ubiqutina ligase, e APOD, também presente na rede LC-CT, cuja proteína tem função antioxidante e contribui na manutenção do perfil funcional do sistema nigroestrial (Bajo-Grañeras, 2011a e b). Esse perfil de rede é muito diferente do observado em LC-CT. Em LC-DP predominam: i) genes envolvidos na regulação da expressão gênica e processos ligados à membrana plasmática (endocitose, exocitose); ii) genes ligados a processos de desenvolvimento neuronal, controle do extresse oxidativo e degradação de proteínas. Esse cenário sugere que no locus cerúleo a DP induziria a ativação de mecanismos compensatórios (Khaindrava et al., 2011; van Nuenen et al., 2012) para a degeneração neuronal, o que será discutido com maior detalhe nas seções V-4 e VI.

V-3) Perfis transcricionais no Núcleo Dorsal do Nervo Vago

A rede de interação transcricional VA-CT tem como hubs principais genes que controlam funções biológicas essenciais para a homeostase cerebral e a organização da atividade neuronal. Com efeito, o hub principal, AAAS, codifica uma proteína envolvida com a proteção do núcleo celular contra danos oxidativos (Storr et al., 2009). O segundo hub, ABCA3, pertence à família de proteínas transportadoras ABC, é reponsável pela regulação do metabolismo de lipídios no cérebro e se expressa em oligodendrócitos, neurônios, astrócitos, e micróglia (Kim et al., 2006). Esses dois hubs também estão presentes na rede VA-DP. O hub seguinte, ABDH9, é um gene reponsável pela destoxificação e processamento de epóxidos endógenos (Decker et al., 2012). Segue-se ABL1, que tem papel na regulação dos receptores nicotínicos nos neurônios autonômicos (Jaykar e Margiotta, 2011). O próximo hub, ADAM15, pertence a uma família de glicoproteínas essenciais para a estrutura e função cerebrais, sendo ADAM15 envolvida na neutralização da apoptose induzida por estresse genotóxico (Fred et al., 2012). Finalmente ABLIM3, que é um modulador da transcrição envolvido em processos de diferenciação celular (Krupp et al., 2006; Barrientos et al., 2007).

A rede VA-DP apresenta uma estrutura mais complexa que VA-CT, porém com um único agrupamento de hubs principais, ente os quais estão AAAS e ABCA3, os hubs com maior número de ligações na rede VA-CT. O principal hub de VA-DP é ARS2, um gene relacionado à plasticidade neuronal (Gruber et al., 2012) e presente em células tronco neuronais (Andreu-Agullo et al., 2011). O hub seguinte, CPNE2, codifica uma copina, proteína que integra uma via importante de sinalização de cálcio, intermediando também associação de proteínas-alvo e fosfolipídeos (Tomsig et al., 2003). CPSF3L é um membro do Complexo Integrador, essencial para a formação de snRNAs (Baillat et al., 2005). O próximo hub, BANF1 codifica uma proteína fundamental para o processo de auto-renovação de células tronco e mutações nesse gene causam progeria (Puente et al., 2011; Cabanillas et al., 2011). É interessante notar que outro hub nessa rede é APCDD1, que codifica um inibidor da via de sinalização do Wnt, envolvido na regulação das céluas tronco no organismo e na manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico (Alves dos Santos e Smidt, 2011). Os hubs restantes, AAAS e ABCA3, já foram caracterizados fucionalante em VA-CT. Em síntese, a rede VA-DP também abriga hubs que poderiam estar envolvidos em mecanismos compensatórios na DP, como discutiremos a seguir.

V-4) Análise das categorias funcionais em que se distribuem os hubs das redes de interação transcricional

A distribuição dos principais hubs das redes de interação transcricional por categoria funcional e região região anatômica mostra que os genes ligados a funções de neuroproteção e neurogênese são predominantes no conjunto dessas redes (**Tabela 8**). Essa distribuição dos hubs por categorias funcionais será aqui analisada partindo-se das redes do núcleo dorsal do nervo vago (VA), prosseguindo pelas do locus cerúleo (LC) e concluindo com as da substância nigra (SN), refletindo assim o modelo de progressão caudo-rostral da DP proposto por Braak et al. (2003b).

Nas redes VA, os genes com maior número de ligações gene-gene na rede do grupo controle (VA-CT), AAAS e ABCA3, tem papel de neuroproteção, o primeiro atuando contra danos oxidativos (Schapira e Jenner, 2011) e o segundo regulando o metabolismo de lipídeos (que é crítico para as funções neuronais e que sofre alterações em doenças neurodegerativas como a DP, Liu et al., 2010). Esses genes tembém são hubs importantes na rede do grupo de pacientes (VA-DP), indicando que no LC mecanismos de neuroproteção estão ativos na DP. Isso é reforçado quando se observa que entre os hubs principais em VA-CT estão ABDH9 e ADAM15, genes importantes nos processos de destoxificação e neutralizalação da aptose induzida por estresse genotóxico. Por outro lado, em VA-DP, destacam-se os genes, ARS2, ligado à manutenção da plasticidade neuronal, BSNF1, importante para a auto-renovação de células tronco e APCDD1, que regula a atividade de células-tronco e atua na manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico (Alves dos Santos e Smidt, 2011). Portanto, em VA a maioria dos hubs está envolvida em neuroproteção e mecanismos compensatórios.

No LC, a rede do grupo controle (LC-CT) também mostra uma predominância de hubs ligados a funções de manutenção da homeostase cerebral, como discutido na seção V-2. Na rede de pacientes (LC-DP), esse quadro muda, observando-se que os hubs principais estão envolvidos em mecanismos moleculares associados à neuroproteção e à neurogênese. Com efeito, os dois hubs com maior número de ligações (SPDR e PPP4R1) estão associados a mecanismos de endocitose e exocitose, que são importantes na remoção de proteínas e organelas degradadas ou defeituosas (Schapira e Jenner, 2011; Hansen e Li, 2012; Marques e Outeiro, 2012). Entre os demais hubs principais destacam-se GAS7, um gene importante para a neuritogênese, e APOD, que é um gene com papel pivotal para neuroproteção na DP, com função antioxidante e de manutenção do sistema nigroestrial (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b). Assim, nota-se em LC-DP uma atividade importante de genes ligados a

mecanismos compensatórios. Na DP os mecanismos compensatórios ao nível molecular e celular centram-se em proteção contra neuroxicidade (Bajo-Grañeras et al., 2011a e b) e neurogênese e reinervação de áreas afetadas (Domenger et al., 2012). Esses mecanismos são mais ativos em estágios iniciais e intermediários da doença e declinam nos estágios finais (Khaindrava et al., 2011; Nandhagopal et al., 2011). Por sua vez, a análise de redes de intereração transcricional feita neste trabalho mostra (como se verá mais claramente adiante) que os hubs relacionados à manutenção/regulação da homeostase vão sendo suplantados, na qualidade de hubs principais nas redes, por outros ligados a mecanismos claramente compensatórios e, finalmente, por aqueles ligados à degeneração neuronal, conforme a sequência nervo vago – locus cerúleo – substância nigra.

Na substância nigra o comentado acima, sobre a sucessão dos hubs principais conforme categorias funcionais e regiões anatômicas, fica bem evidenciado. Na rede de controles (SN-CT), se observa entre os hubs centrais e principais os genes APOD, extremamente importante nos mecanismos de neuroproteção e compensatórios na DP (Bajo-Grañeras et al. 2011a e b) e AK2, que proteje a célula contra proteínas não dobradas, caso da α-syn na DP (Hansen e Li, 2012). Quanto aos demais hubs dessa rede, ARAP2 atua na resposta ao estresse oxidativo e ANTXR1 e ADD3 têm, entre suas funções, a manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico e o crescimento de neuritos. É um quadro compatível com o funcionamento da substância nigra em indivíduos idosos.

Por outro lado, na rede do grupo de pacientes (SN-DP) há uma mudança significativa no perfil dos hubs principais, agrupados ao redor de TET2, o gene com maior número de ligações, que está envolvido nos processos de envelhecimento mitocondrial (Dzitoyeva et al., 2012). Seguem-se BVES, hub ligado ao transporte vesicular, um processo bastante alterado em fases mais avançadas da DP (Schapira e Jenner, 2011; Hansen e Li, 2012; Marques e Outeiro, 2012) e CRYBG3, um marcador de senescência (Casadesús et al., 2012). O próximo hub, TBC1D12 também está relacionado ao transporte vesicular, seguindo-se MAP4K4, ligado a inflamação e morte neuronal, processos característicos da DP na SN (Kingsbury et al. 2010; Schapira e Jenner, 2011, Hansen e Li, 2012, Marques e Outeiro, 2012; Yasuda et al., 2012). Entre os demais hubs principais estão ZNF518A, envolvido em dobramento de moléculas de proteína, HRNPA3, em senescência e neuroproteçao, FAM133B, que codifica uma proteína associada aos corpúsculos de Lewy (Oláh et al., 2011) e USP37, uma ubiquitina associada à degradação proteica. Esse é um perfil mais associado a alterações mitocondriais, degradação proteica, inflamação e morte neuronal, esperado para a SN de pacientes nos estágios 4-5 da DP (Parkkinen et al., 2008; Rosso et al.,

2008; Kingsbusry et al., 2010, Obeso et al., 2010; Schapira e Jenner , 2011; Marques e Outeiro, 2012).

Em seu conjunto, os resultados das análises das redes de interação transcricional em VA, LC e SN mostram que na DP as duas primeiras áreas anatômicas são lugar de atuação de diversos mecanismos compensatórios de neuroproteção e neurogênese, tanto nas redes do grupo controle com nas do grupo de pacientes, enquanto que na SN há um cenário com maior destaque para genes que podem ter papel na neurodegeneração. Esse quadro pode agora ser colocado em tela com o modelo de progressão caudo-rostral da DP. Considerando que há evidências sólidas que a DP inicia-se no núcleo dorsal do nervo vago e/ou bulbo olfatório e progride para áreas específicas do cérebro através de um mecanismo *prion-like* de transferência neuro-neuron de moléculas de α-syn alteradas (Dunning et al., 2012; Hansen e Li, 2012; Marques e Outeiro, 2012), a SN atingida pela patologia dos corpúsculos de Lewy nos estágios 3-4 da DP (Braak et al., 2003a e b; Rosso et al., 2008; Kingsbury et al., 2010) mostra menor ativação de circuitos gênicos ligados à neuroproteção do que o verificado no VA e no LC. Isso está em concordância com o fato bem estabelecido de que a DP pode ser diagnosticada clinicamente a partir do estágio 3 de Braak, embora os pacientes possam apresentar sinais prodômicos em estágios anteriores (Obeso et al., 2010; Ferrer et al., 2011).

Finalmente, cabe considerar, ainda que brevemente, as vantagens da abordagem de genômica funcional para esclarecimento do mecanismo molecular de doenças complexas e seu papel na identificação de alvos terapêuticos (ver revisão na seção I-3 desta dissertação). Neste trabalho foi possível, utilizando a tecnologia de DNA microarrays e ferramentas de bioinformática, fazer uma análise comparativa da expressão gênica global de três regiões anatômicas do cérebro envolvidas na DP. Através de redes de interação transcricional foram identificados os genes que, por terem maior número de ligações gene-gene, são candidatos a serem *broker genes* (Cai et al., 2010) isto é, terem papel significativo na etiologia da doença. Esses genes podem ser candidatos a futuros alvos terapêuticos. Para alguns deles, é preciso que seu papel na DP venha a ser validado através de estudos experimentais in vitro e em modelos animais. Para outros, como APOE por exemplo, já existe um considerável conjunto de evidências que pavimenta o caminho para seu eventual uso em aplicações terapêuticas.

No presente, existem poucas alternativas terapêuticas para a DP, além da terapia sintomática ainda centrada na Levodopa e, em menor grau, nos agonistas do receptor de dopamina e em terapias não dopaminérgicas (Smith e col. 2012). A terapia celular, iniciada com transplantes de tecido fetal, controversos sob os aspectos éticos

(usos de tecidos fetais provenientes de abortos) e técnicos (o tratamento completo – transplante bilateral - de um único paciente pode demandar tecidos de até uma dezena de fetos), teve abertas novas perspectivas com o uso de células tronco embrionárias e, mais recentemente, de células pluripotentes induzidas, as IPSC (*induced pluripotent stem cells*) (ver revisão de terapias celulares na DP em Ali et al., 2013). As IPSC são promissoras quanto à perspectiva de se obter grande número de neurônios dopaminérgicos nigrais. No entanto a DP não se restringe a esses neurônios, ou a neurônios em geral (Obeso et al., 2010; Ali et al., 2013). Por outro lado, devido à propagação *prion-like* da DP, as células transplantadas acabarão por ser atingidas pela pela patologia dos corpúsculos de Lewy (Li et al., 2008; Hansen e Li, 2012). Assim, abordagem de genômica funcional para a identificação de mecanismos moleculares que levem à descoberta de novos alvos terapêuticos na DP (Edwards et al., 2011; Greene, 2012, Lewis e Cookson, 2012) é uma estratégia importante, principalmente quando se consideram as limitações das terapias atuais e a necessidade de abranger os aspectos não motores da DP.

VI) CONCLUSÕES

VI-1) O estudo comparativo das redes de interação transcricional no Núcleo Dorsal do Nervo Vago, Locus Cerúleo e Substância Nigra entre pacientes com Doença de Parkinson idiopática nos estágios Braak 4-5 e controles livres da doença utilizando material de necropsia permitiu identificar em cada rede transcricional os genes com maior número de ligações gene-gene, ou hubs, que foram correlacionados com sua função biológica e possível papel na doença de Parkinson.

VI-2) A análise comparativa entre o perfil de hubs (número de ligações, posição na rede) em cada região anatômica para pacientes e controles revelou que: i) no núcleo dorsal do nervo vago os hubs principais nas redes de controles e pacientes estão relacionados a funções de manutenção da homeostase cerebral e organização neuronal, ii) no locus cerúleo os hubs principais dos controles são genes ligados à manutenção das funções cerebrais, mobilização de células progenitoras (pericitos) e controle de vias inflamatórias, enquanto que na rede de pacientes esses hubs estão ligados aos processos de endo e exocitose, desenvolvimento neuronal e controle do estresse oxidativo e degradação de proteínas; iii) na substância nigra os principais hubs da rede de controles estão envolvidos na proteção contra estresse oxidativo e proteínas não dobradas e na manutenção do sistema dopaminérgico mesodiencefálico, enquanto que na rede de pacientes predominam hubs ligados a processos epigenéticos de envelhecimento mitocondrial, transporte vesicular, neurogênese, inflamação e morte neuronal.

VI-3) Os resultados da análise de redes de interação transcricional de pacientes e controles em diferentes regiões anatômicas são compatíveis com o modelo de progressão caudo-rostral da doença de Parkinson e apontam para mecanismos compensatórios no núcleo dorsal do nervo vago e locus cerúleo.

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelraheim SR, Spiller DG, McLennan AG. Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein. Biochem J. 2003;374(Pt 2):329-35.

Ailawadi G, Moehle CW, Pei H, Walton SP, Yang Z, Kron IL, et al. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;138:1392-9.

Akiyama H, Gotoh A, Shin RW, Koga T, Ohashi T, Sakamoto W, et al. A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease. J Biol Chem. 2009;284:32695-9.

Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. Annu Rev Physiol. 2012;74:13-40.

Ali F, Stott SR, Barker RA. Stem cells and the treatment of Parkinson's disease. Exp Neurol. 2013 J*an* 6. pii: S0014-4886(13)00004-6. doi: 0.1016/j.expneurol.2012.12.017. [Epub ahead of print]

Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. Arch Neurol. 2010;67:1464-72.

Alves dos Santos MT, Smidt MP. En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. Neural Dev. 2011;6:23.

Anderson RG. The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem. 1998;67:199-225.

Andreu-Agullo C, Maurin T, Thompson CB, Lai EC. Ars2 maintains neural stem-cell identity through direct transcriptional activation of Sox2. Nature. 2011; 481:195-8.

Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? Lancet Neurol. 2010;9:1128-38.

Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, Alonso-Nanclares L, Ballesteros-Yanez I, et al. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis. 2006;22:374-87.

Arisi I, D'Onofrio M, Brandi R, Felsani A, Capsoni S, Drovandi G, et al. Gene expression biomarkers in the brain of a mouse model for Alzheimer's disease: mining of microarray data by logic classification and feature selection. J Alzheimers Dis. 2011;24:721-38.

Azuma T, Cruz RF, Bayles KA, Tomoeda CK, Montgomery EB, Jr. A longitudinal study of neuropsychological change in individuals with Parkinson's disease. Int J Geriatr Psychiatry. 2003;18:1115-20.

Babic M, Zinsmaier KE. Memory, synapse stability, and beta-adducin. Neuron. 2011;69:1039-41.

Baek HJ, Malik S, Qin J, Roeder RG. Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-

associated TAF(II)s. Mol Cell Biol. 2002;22:2842-52.

Bahe S, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Leiss F, Nigg EA. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. J Cell Biol. 2005; 171:27-33.

Baillat D, Hakimi MA, Naar AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. Cell. 2005;123:265-76.

Bajo-Graneras R, Ganfornina MD, Martin-Tejedor E, Sanchez D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. Glia. 2011a;59:1551-66.

Bajo-Graneras R, Sanchez D, Gutierrez G, Gonzalez C, Do Carmo S, Rassart E, et al. Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. J Neurochem. 2011b;117:949-60.

Bando SY, Alegro MC, Amaro E, Jr., Silva AV, Castro LH, Wen HT, et al. Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy. PLoS One. 2011;6(10):e26268.

Barabasi AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. Nat Rev Genet. 2011;12:56-68.

Barcellos KS, Bigarella CL, Wagner MV, Vieira KP, Lazarini M, Langford PR, et al. ARHGAP21: a new partner of alpha-tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for Epithelial-Mesenchymal Transition. J Biol Chem. 2012. Dec 12. [Epub ahead of print]

Barrientos T, Frank D, Kuwahara K, Bezprozvannaya S, Pipes GC, Bassel-Duby R, et al. Two novel members of the ABLIM protein family, ABLIM-2 and -3, associate with STARS and directly bind F-actin. J Biol Chem. 2007;282:8393-403.

Basseres DS, Tizzei EV, Duarte AA, Costa FF, Saad ST. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. Biochem Biophys Res Commun. 2002;294:579-85.

Bertini ES, Eymard-Pierre E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW, Yamanaka K. ALS2-Related Disorders . GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2005 Oct 21 [updated 2011 Feb 10].

Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. Nat Neurosci. 2004;7:613-20.

Bhatia S, Knoch B, Wong J, Kim WS, Else PL, Oakley AJ, et al. Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. Biochem J. 2012;442:713-21.

Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Manley GT. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. Neuroreport. 2004;15:259-62.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:845618.

Bohus B, Koolhaas JM, Luiten PG, Korte SM, Roozendaal B, Wiersma A. The neurobiology of the central nucleus of the amygdala in relation to neuroendocrine and autonomic outflow. Prog Brain Res. 1996; 107:447-60.

Boutahar N, Reynaud E, Lassabliere F, Borg J. Brain-derived neurotrophic factor inhibits cell cycle reentry but not endoplasmic reticulum stress in cultured neurons following oxidative or excitotoxic stress. J Neurosci Res. 2010; 88:2263-71.

Boutahar N, Wierinckx A, Camdessanche JP, Antoine JC, Reynaud E, Lassabliere F, et al. Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. J Neurosci Res. 2011; 89:1439-50.

Bouzakri K, Zierath JR. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. J Biol Chem. 2007; 282:7783-9.

Braak H, Braak E. Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with ageing and Alzheimer's disease. Prog Brain Res. 1986;70:185-212.

Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Prog Brain Res. 1998;117:267-85.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging. 2003a;24:197-211.

Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. J Neural Transm. 2003b;110:517-36.

Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res. 2004;318(1):121-34.

Burkart A, Shi X, Chouinard M, Corvera S. Adenylate kinase 2 links mitochondrial energy metabolism to the induction of the unfolded protein response. J Biol Chem. 2011;286(6):4081-9.

Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science. 2010;329(5999):1663-7.

Cabanillas R, Cadinanos J, Villameytide JA, Perez M, Longo J, Richard JM, et al. Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. Am J Med Genet A. 2011;155A:2617-25.

Cai JJ, Borenstein E, Petrov DA. Broker genes in human disease. Genome Biol Evol. 2010;2:815-25.

Casadesus G, Gutierrez-Cuesta J, Lee HG, Jimenez A, Tajes M, Ortuno-Sahagun D, et al. Neuronal cell cycle re-entry markers are altered in the senescence accelerated

mouse P8 (SAMP8). J Alzheimers Dis. 2012;30:573-83.

Catalgol B, Grune T. Proteasome and neurodegenerative diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;109:397-414.

Chavali S, Barrenas F, Kanduri K, Benson M. Network properties of human disease genes with pleiotropic effects. BMC Syst Biol. 2010;4:78.

Chen GI, Tisayakorn S, Jorgensen C, D'Ambrosio LM, Goudreault M, Gingras AC. PP4R4/KIAA1622 forms a novel stable cytosolic complex with phosphoprotein phosphatase 4. J Biol Chem. 2008;283:29273-84.

Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. Nature. 2012 Dec 9. doi: 10.1038/nature11742. [Epub ahead of print]

Chi Y, Fan Y, He L, Liu W, Wen X, Zhou S, et al. Novel role of aquaporin-4 in CD4+ CD25+ T regulatory cell development and severity of Parkinson's disease. Aging Cell. 2011;10:368-82.

Chouliaras L, van den Hove DL, Kenis G, Keitel S, Hof PR, van Os J, et al. Prevention of age-related changes in hippocampal levels of 5-methylcytidine by caloric restriction. Neurobiol Aging. 2012;33:1672-81.

Chuang HY, Hofree M, Ideker T. A decade of systems biology. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010;26:721-44.

Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. Hum Mol Genet. 2005;14:1709-25.

Cicchetti F, Saporta S, Hauser RA, Parent M, Saint-Pierre M, Sanberg PR, et al. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:12483-8.

Conaway RC, Conaway JW. Function and regulation of the Mediator complex. Curr Opin Genet Dev. 2011;21:225-30.

Cookson MR. Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(9):a009415.

Correa-Costa M, Azevedo H, Amano MT, Goncalves GM, Hyane MI, Cenedeze MA, et al. Transcriptome analysis of renal ischemia/reperfusion injury and its modulation by ischemic pre-conditioning or hemin treatment. PLoS One. 2012;7(11):e49569.

Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, et al. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. Brain Res. 2012;1441:64-78.

Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. Physiol Rev. 2011;91:1161-218.

Cox JL, Mallanna SK, Ormsbee BD, Desler M, Wiebe MS, Rizzino A. Banf1 is required to maintain the self-renewal of both mouse and human embryonic stem cells. J Cell

Sci. 2011;124(Pt 15):2654-65.

Danzer KM, Ruf WP, Putcha P, Joyner D, Hashimoto T, Glabe C, et al. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. FASEB J. 2011;25:326-36.

Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron. 2011; 70:813-29.

de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. Environ Mol Mutagen. 2010;51:391-405.

Decker M, Adamska M, Cronin A, Di Giallonardo F, Burgener J, Marowsky A, et al. EH3 (ABHD9): the first member of a new epoxide hydrolase family with high activity for fatty acid epoxides. J Lipid Res. 2012;53(10):2038-45.

Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? J Neuropathol Exp Neurol. 2002;61:413-26.

Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:13010-5.

Doege CA, Inoue K, Yamashita T, Rhee DB, Travis S, Fujita R, et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1and Tet2. Nature. 2012; 488:652-5.

Domenger D, Dea D, Theroux L, Moquin L, Gratton A, Poirier J. The MPTP neurotoxic lesion model of Parkinson's disease activates the apolipoprotein E cascade in the mouse brain. Exp Neurol. 2012; 233:513-22.

Dore-Duffy P, Mehedi A, Wang X, Bradley M, Trotter R, Gow A. Immortalized CNS pericytes are quiescent smooth muscle actin-negative and pluripotent. Microvasc Res. 2011;82:18-27.

Dunning CJ, Reyes JF, Steiner JA, Brundin P. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? Prog Neurobiol. 2012;97:205-19.

Duszynski J, Koziel R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zablocki K. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. Biochim Biophys Acta. 2006;1757:380-7.

Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. Neurobiol Aging. 2012;33:2881-91.

Edwards YJ, Beecham GW, Scott WK, Khuri S, Bademci G, Tekin D, et al. Identifying consensus disease pathways in Parkinson's disease using an integrative systems biology approach. PLoS One. 2011;6(2):e16917.

Ezzeddine N, Chen CY, Shyu AB. Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and antiproliferative activities. Mol Cell Biol. 2012;32:1089-98.

Fan Y, Kong H, Shi X, Sun X, Ding J, Wu J, et al. Hypersensitivity of aquaporin 4-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrindine and astrocytic modulation. Neurobiol Aging. 2008;29:1226-36.

Fang FM, Li CF, Huang HY, Lai MT, Chen CM, Chiu IW, et al. Overexpression of a chromatin remodeling factor, RSF-1/HBXAP, correlates with aggressive oral squamous cell carcinoma. Am J Pathol. 2011;178:2407-15.

Fayein NA, Stankoff B, Auffray C, Devignes MD. Characterization of tissue expression and full-length coding sequence of a novel human gene mapping at 3q12.1 and transcribed in oligodendrocytes. Gene. 2002;289:119-29.

Ferrer I, Martinez A, Blanco R, Dalfo E, Carmona M. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. J Neural Transm. 2011;118:821-39.

Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. IUBMB Life. 2009;61:431-7.

Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Goetz CG, Stebbins GT, Aarsland D, et al. A 12-year population-based study of psychosis in Parkinson disease. Arch Neurol. 2010;67:996-1001.

Fried D, Bohm BB, Krause K, Burkhardt H. ADAM15 protein amplifies focal adhesion kinase phosphorylation under genotoxic stress conditions. J Biol Chem. 2012;287:21214-23.

Galvita A, Grachev D, Azarashvili T, Baburina Y, Krestinina O, Stricker R, et al. The brain-specific protein, p42(IP4) (ADAP 1) is localized in mitochondria and involved in regulation of mitochondrial Ca2+. J Neurochem. 2009;109:1701-13.

Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. J Neurochem. 2002;81:1285-97.

Gao HM, Liu B, Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. J Neurosci. 2003;23:6181-7.

Gavicherla B, Ritchey L, Gianfelice A, Kolokoltsov AA, Davey RA, Ireton K. Critical role for the host GTPase-activating protein ARAP2 in InlB-mediated entry of Listeria monocytogenes. Infect Immun. 2010;78:4532-41.

Gazzerro E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. Eur J Hum Genet. 2010;18:137-45.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. Hum Mol Genet. 2010;19:4861-70.

Goldberg JA, Guzman JN, Estep CM, Ilijic E, Kondapalli J, Sanchez-Padilla J, et al. Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. Nat Neurosci. 2012;15:1414-21.

Gonzalez L, Jr., Scheller RH. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. Cell. 1999;96:755-8.

Greene JG. Current status and future directions of gene expression profiling in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2012;45:76-82.

Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. Cell Tissue Bank. 2007;8:151-62.

Gruber JJ, Olejniczak SH, Yong J, La Rocca G, Dreyfuss G, Thompson CB. Ars2 promotes proper replication-dependent histone mRNA 3' end formation. Mol Cell. 2012;45:87-98.

Hager HA, Roberts RJ, Cross EE, Proux-Gillardeaux V, Bader DM. Identification of a novel Bves function: regulation of vesicular transport. EMBO J. 2010;29:532-45.

Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. J Clin Invest. 2011;121:715-25.

Hansen C, Li JY. Beyond alpha-synuclein transfer: pathology propagation in Parkinson's disease. Trends Mol Med. 2012;18:248-55.

Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature. 2012;485:195-200.

Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front Biosci. 2008;13:3046-82.

Herlevsen M, Oxford G, Owens CR, Conaway M, Theodorescu D. Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. Mol Cancer Ther. 2007;6:1804-13.

Herrmann D, Ferrer-Vaquer A, Lahsnig C, Firnberg N, Leibbrandt A, Neubuser A. Expression and regulation of ANTXR1 in the chick embryo. Dev Dyn. 2010;239(2):680-687.

Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11 Suppl 1:S9-S15.

Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Scheper W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. Neurodegener Dis. 2012;10(1-4):212-5.

Huang BT, Chang PY, Su CH, Chao CC, Lin-Chao S. Gas7-deficient mouse reveals roles in motor function and muscle fiber composition during aging. PLoS One. 2012;7(5):e37702.

Huang PR, Tsai ST, Hsieh KH, Wang TC. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 binds single-stranded telomeric DNA and inhibits telomerase extension in vitro. Biochim Biophys Acta. 2008;1783:193-202.

Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2003;53 Suppl 3:S49-58; discussion S-60.

Ideker T, Krogan NJ. Differential network biology. Mol Syst Biol. 2012;8:565.

Inouye S, Yamada Y, Miura K, Suzuki H, Kawata K, Shinoda K, et al. Distribution and developmental changes of adenylate kinase isozymes in the rat brain: localization of

adenylate kinase 1 in the olfactory bulb. Biochem Biophys Res Commun. 1999;254:618-22.

International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). 2011. A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. PLoS Genet 7:e1002142.

Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. Neuroscience. 2002;110:49-58.

Jankovic J. Current concepts in Parkinson's disease and other movement disorders. Curr Opin Neurol. 2012;25(4):429-32.

Jayakar SS, Margiotta JF. Abelson family tyrosine kinases regulate the function of nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic synapses on autonomic neurons. Mol Pharmacol. 2011;80:97-109.

Jellinger K. A critical evaluation of current staging of a-synuclein pathology in Lewy body disorders. Biochim Biophys Acta 2009;1792:730–740.

Jing X, Miwa H, Sawada T, Nakanishi I, Kondo T, Miyajima M, Sakaguchi K. Ephrin-A1-mediated dopaminergic neurogenesis and angiogenesis in a rat model of Parkinson's disease. PLoS One. 2012;7(2):e32019.

Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RB. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging.Neuropathol Appl Neurobiol 2008;34:284–295.

Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. Biochim Biophys Acta. 2006;1762(5):510-24.

Kaminsky Y, Kosenko E. AMP deaminase and adenosine deaminase activities in liver and brain regions in acute ammonia intoxication and subacute toxic hepatitis. Brain Res. 2010 1311:175-81.

Kaul R, Balamurugan K, Gao GP, Matalon R. Canavan disease: genomic organization and localization of human ASPA to 17p13-ter and conservation of the ASPA gene during evolution. Genomics. 1994;21:364-70.

Khaindrava VG, Kozina EA, Kudrin VS, Kucheryanu VG, Klodt PD, Narkevich VB, et al. Experimental modeling of preclinical and clinical stages of Parkinson's disease Bull Exp Biol Med. 2011; 150:566-9.

Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, et al. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. J Cell Biol. 1999;146:917-28.

Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Neurobiol Dis. 2002;9:244-8.

Kim K, Lee S, Chang J, Rhee K. A novel function of CEP135 as a platform protein of C-NAP1 for its centriolar localization. Exp Cell Res. 2008;314:3692-700.

Kim WS, Guillemin GJ, Glaros EN, Lim CK, Garner B. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. Neuroreport. 2006;17:891-6.

Kim YA, Wuchty S, Przytycka TM. Identifying causal genes and dysregulated pathways in complex diseases. PLoS Comput Biol. 2011;7(3):e1001095.

Kingsbury AE, Bandopadhyay R, Silveira-Moriyama L, Ayling H, Kallis C, Sterlacci W, et al. Brain stem pathology in Parkinson's disease: an evaluation of the Braak staging model. Mov Disord. 2010;25:2508-15.

Klein C, Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. Curr Opin Neurol. 2007;20:453-64.

Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. Mol Cell Neurosci. 2000;16:724-39.

Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Clevers H. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. Nature. 2012 4883:665-9.

Kosenko EA, Kaminsky YG. Activation of AMP deaminase and adenosine deaminase in the liver during ammonia poisoning and hepatitis. Bull Exp Biol Med. 2010;150:36-8.

Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science. 2009;324:929-30.

Krugmann S, Anderson KE, Ridley SH, Risso N, McGregor A, Coadwell J, et al. Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. Mol Cell. 2002;9:95-108.

Krupp M, Weinmann A, Galle PR, Teufel A. Actin binding LIM protein 3 (abLIM3). Int J Mol Med. 2006;17:129-33.

Kurzik-Dumke U, Zengerle A. Identification of a novel Drosophila melanogaster gene, angel, a member of a nested gene cluster at locus 59F4,5. Biochim Biophys Acta. 1996;1308:177-81.

Lanoue AC, Dumitriu A, Myers RH, Soghomonian JJ. Decreased glutamic acid decarboxylase mRNA expression in prefrontal cortex in Parkinson's disease. Exp Neurol. 2010;226:207-17.

Lee SJ. Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. J Mol Neurosci. 2008;34:17-22.

Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. J Exp Med. 2005;202:473-7.

Lenssen E, Oberholzer U, Labarre J, De Virgilio C, Collart MA. Saccharomyces cerevisiae Ccr4-not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway. Mol Microbiol. 2002;43:1023-37.

Lewis PA, Cookson MR. Gene expression in the Parkinson's disease brain. Brain Res Bull. 2012;88:302-12.

Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nat Med. 2008;14:501-3.

Li Q, Spencer NY, Pantazis NJ, Engelhardt JF. Alsin and SOD1(G93A) proteins regulate endosomal reactive oxygen species production by glial cells and proinflammatory pathways responsible for neurotoxicity. J Biol Chem. 2011;286:40151-62.

Liu JP, Tang Y, Zhou S, Toh BH, McLean C, Li H. Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Mol Cell Neurosci. 2010; 43:33-42. 2009.

Liu L, van Groen T, Kadish I, Tollefsbol TO. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. Neurobiol Aging. 2009;30:549-60.

Liu M, Sun A, Shin EJ, Liu X, Kim SG, Runyons CR, et al. Expression of microsomal epoxide hydrolase is elevated in Alzheimer's hippocampus and induced by exogenous beta-amyloid and trimethyl-tin. Eur J Neurosci. 2006;23:2027-34.

Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. Biochem J. 2009;417:15-27.

Lou H, Park JJ, Phillips A, Loh YP. γ-Adducin promotes process outgrowth and secretory protein exit from the Golgi apparatus. J Mol Neurosci. 2013 ;49:1-10.

Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The role of autophagy in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(4):a009357.

Mack AF, Wolburg H. A Novel Look at Astrocytes: Aquaporins, Ionic Homeostasis, and the Role of the Microenvironment for Regeneration in the CNS. Neuroscientist. 2012.

Malloy LE, Wen KK, Pierick AR, Wedemeyer EW, Bergeron SE, Vanderpool ND, et al. Thoracic aortic aneurysm (TAAD)-causing mutation in actin affects formin regulation of polymerization. J Biol Chem. 2012;287:28398-408.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature. 2009;461:747-53.

Marques O, Outeiro TF. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. Cell Death Dis. 2012;3:e350.

Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. J Clin Invest. 2008;118:777-88.

Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca BV, Gotovac K, Violante S, Mestre T, Coelho M, Rosa MM, Martin ER, Vance JM, Outeiro TF, Wang L, Borovecki F, Ferreira JJ, Oliveira SA. Convergence of miRNA expression profiling, α-synuclein interacton and GWAS in Parkinson's disease. PLoS One. 2011;6(10):e25443.

Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2011;32:1161-80.

Mayor T, Hacker U, Stierhof YD, Nigg EA. The mechanism regulating the dissociation

of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. J Cell Sci. 2002;115(Pt 16):3275-84.

McCoy MK, Cookson MR. Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal. 2012;16):869-82.

McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2004;10 Suppl 1:S3-7.

McLennan AG, Cartwright JL, Gasmi L. The human NUDT family of nucleotide hydrolases. Enzymes of diverse substrate specificity. Adv Exp Med Biol. 2000;486:115-8.

Menetrey J, Perderiset M, Cicolari J, Dubois T, Elkhatib N, El Khadali F, et al. Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes. EMBO J. 2007;26:1953-62.

Michalek JL, Besold AN, Michel SL. Cysteine and histidine shuffling: mixing and matching cysteine and histidine residues in zinc finger proteins to afford different folds and function. Dalton Trans. 2011;40:12619-32.

Milenkovic T, Zdravkovic D, Savic N, Todorovic S, Mitrovic K, Koehler K, et al. Triple A syndrome: 32 years experience of a single centre (1977-2008). Eur J Pediatr. 2010;169:1323-8.

Mintchev N, Zamba-Papanicolaou E, Kleopa KA, Christodoulou K. A novel ALS2 splice-site mutation in a Cypriot juvenile-onset primary lateral sclerosis family. Neurology. 2009;72:28-32.

Miura Y, Abe K, Urano S, Furuse T, Noda Y, Tatsumi K, et al. Adaptive response and the influence of ageing: effects of low-dose irradiation on cell growth of cultured glial cells. Int J Radiat Biol. 2002;78:913-21.

Mohrmann K, van der Sluijs P. Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. Mol Membr Biol. 1999;16:81-7.

Nandhagopal R, Kuramoto L, Schulzer M, Mak E, Cragg J, McKenzie J, et al. Longitudinal evolution of compensatory changes in striatal dopamine processing in Parkinson's disease. Brain. 2011; 134(Pt 11):3290-8.

Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, et al. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. Hum Mol Genet. 2012;21:1496-503.

Newhouse PA, Kelton M. Nicotinic systems in central nervous systems disease: degenerative disorders and beyond. Pharm Acta Helv. 2000;74:91-101.

Nicholls DG, Vesce S, Kirk L, Chalmers S. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. Cell Calcium. 2003;34:407-24.

Nikolaus S, Antke C, Muller HW. In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders. Behav Brain Res. 2009;204:32-66.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of

multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell. 1995;81:53-62.

Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. N Engl J Med. 2003;348:1356-64.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. Nat Med. 2010;16:653-61.

Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozsó Z, Tőkési N, et al. Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. J Biol Chem. 2011 286:34088-100.

O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. Mov Disord. 2008;23:101-6.

Pardal-Fernandez JM, Carrascosa-Romero MC, de Cabo-de la Vega C, Iniesta-Lopez I, Gil-Pons E, Martinez-Gutierrez A. Atypical glycine encephalopathy in an extremely low birth weight infant: description of a new mutation and clinical and electroencephalographic analysis. Epileptic Disord. 2009;11:48-53.

Parkkinen L, Pirttila T, Alafuzoff I. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. Acta Neuropathol. 2008;115:399-407.

Paspalas CD, Perley CC, Venkitaramani DV, Goebel-Goody SM, Zhang Y, Kurup P, Mattis JH, Lombroso PJ. Major vault protein is expressed along the nucleus-neurite axis and associates with mRNAs in cortical neurons. Cereb Cortex. 2009 ;19:1666-77.

Paul G, Ozen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J, et al. The Adult Human Brain Harbors Multipotent Perivascular Mesenchymal Stem Cells. PLoS ONE 2012; 7(4): e35577.

Penner MR, Roth TL, Barnes CA, Sweatt JD. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. Front Aging Neurosci. 2010;2:9.

Perier C, Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(2):a009332.

Piehler AP, Ozcurumez M, Kaminski WE. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. Front Psychiatry. 2012;3:17.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997;276(5321):2045-7.

Prasad SS, Garg A, Agarwal AK. Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria. J Lipid Res. 2011;52:451-62.

Puente XS, Quesada V, Osorio FG, Cabanillas R, Cadiñanos J, Fraile JM, et al. Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. Am J Hum Genet. 2011; 88:650-6.

Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome

sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet. 2012;44:47-52.

Rosso AL, Nicaretta DH, Mattos JP. Correlações anatomoclínicas na doença de Parkinson. Revista Brasileira de Neurologia 2008 44:41-47.

Rybnikova E, Gluschenko T, Galeeva A, Tulkova E, Nalivaeva NN, Makova NZ, et al. Differential expression of ADAM15 and ADAM17 metalloproteases in the rat brain after severe hypobaric hypoxia and hypoxic preconditioning. Neurosci Res. 2012;72:364-73.

Saha AR, Hill J, Utton MA, Asuni AA, Ackerley S, Grierson AJ, et al. Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. J Cell Sci. 2004;117(Pt 7):1017-24.

Saper CB. Diffuse cortical projection systems: anatomical organization and role in cortical function. In: Plum F (ed) Handbook of physiology, 1991. The nervous system. American Physiology

Sato K, Yoshida S, Fujiwara K, Tada K, Tohyama M. Glycine cleavage system in astrocytes. Brain Res. 1991;567:64-70.

Savica R, Rocca WA, Ahlskog JE. When does Parkinson disease start? Arch Neurol. 2010;67:798-801.

Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2008;7:97-109.

Schapira AH. Mitochondrial pathology in Parkinson's disease. Mt Sinai J Med. 2011;78:872-81.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet. 1989;1(8649):1269.

Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Mov Disord. 2011;26:1049-55.

Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR. Rab GTPases, directors of vesicle docking. J Biol Chem. 1998;273:22161-4.

Scholz SW, Mhyre T, Ressom H, Shah S, Federoff HJ. Genomics and bioinformatics of Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(7):a009449.

Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. Nat Cell Biol. 2002;4(4):E65-8.

Sedehizade F, Hanck T, Stricker R, Horstmayer A, Bernstein HG, Reiser G. Cellular expression and subcellular localization of the human Ins(1,3,4,5)P(4)-binding protein, p42(IP4), in human brain and in neuronal cells. Brain Res Mol Brain Res. 2002;99:1-11.

Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood. 2004;104:1606-15.

Shirakawa K, Suzuki H, Ito M, Kono S, Uchiyama T, Ohashi T, et al. Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. Neurology. 2009;73:2124-6.

Sims B, Powers RE, Sabina RL, Theibert AB. Elevated adenosine monophosphate deaminase activity in Alzheimer's disease brain. Neurobiol Aging. 1998;19:385-91.

Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. Neuropsychopharmacology. 2012 ;37:213-46.

Sommer A, Sass JO. Expression of aspartoacylase (ASPA) and Canavan disease. Gene. 2012;505:206-10.

Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. Rab GTPases coordinate endocytosis. J Cell Sci. 2000;113 Pt 2:183-92.

Somoza R, Juri C, Baes M, Wyneken U, Rubio FJ. Intranigral transplantation of epigenetically induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2010; 16:1530-40.

Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. Exp Mol Med. 2012;44:89-98.

Spang A, Shiba Y, Randazzo PA. Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation. FEBS Lett. 2010;584:2646-51.

Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:1398-400.

Storr HL, Kind B, Parfitt DA, Chapple JP, Lorenz M, Koehler K, Huebner A, Clark AJ. Deficiency of ferritin heavy-chain nuclear import in triple a syndrome implies nuclear oxidative damage as the primary disease mechanism. Mol Endocrinol. 2009; 23:2086-94.

Sultan FA, Day JJ. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. Epigenomics. 2011; 3:157-81.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Neuroscience. 2011;198:221-31.

Surmeier DJ, Schumacker PT. Calcium, bioenergetics and neuronal vulnerability in Parkinsons disease. J Biol Chem. 2013, no prelo. [Epub ahead of print Oct 19, 2012]

Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007;78:905-6.

Thal DR, Del Tredici K, Braak H. Neurodegeneration in normal brain aging and disease. Sci Aging Knowledge Environ. 2004;2004(23):pe26.

Tomsig JL, Snyder SL, Creutz CE. Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins. Characterization of a coiled-coil copine-binding motif. J Biol Chem. 2003;278:10048-54.

Ungerstedt U, Ljungberg T, Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine

neurons. Adv Neurol. 1974;5:421-6.

Vallet AE, Verschueren A, Petiot P, Vandenberghe N, Nicolino M, Roman S, et al. Neurological features in adult Triple-A (Allgrove) syndrome. J Neurol. 2012;259:39-46.
.
van Nuenen BF, Helmich RC, Buenen N, van de Warrenburg BP, Bloem BR, Toni I. Compensatory activity in the extrastriate body area of Parkinson's disease patients. J Neurosci. 2012; 32:9546-53.

Walden H, Martinez-Torres RJ. Regulation of Parkin E3 ubiquitin ligase activity. Cell Mol Life Sci. 2012;69:3053-67.

Wang X, Zaidi A, Pal R, Garrett AS, Braceras R, Chen XW, et al. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. BMC Neurosci. 2009;10:12.

Wang S, Okun MS, Suslov O, Zheng T, McFarland NR, Vedam-Mai V, Foote KD, Roper SN, Yachnis AT, Siebzehnrubl FA, Steindler DA. Neurogenic potential of progenitor cells isolated from postmortem human Parkinsonian brains. Brain Res. 2012 ;1464:61-72.

Williams C (2009) Transcription profiling of human Alzheimers disease patients to identify genes regulating synaptic function and neuroplasticity in incipient AD. The ArrayExpress Archive, E-GEOD-12685, Public Release Date January 17, 2009.

Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. Curr Pharm Des. 2007;13:1925-8.

Winslow AR, Rubinsztein DC. The Parkinson disease protein alpha-synuclein inhibits autophagy. Autophagy. 2011;7:429-31.

Witt SN. Molecular Chaperones, Alpha-Synuclein, and Neurodegeneration. Mol Neurobiol. 2012.

Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. Nat Neurosci. 2010;13:805-11.

Wu X, Cheng Y, Li T, Wang Z, Liu JY. In vitro identification of DNA-binding motif for the new zinc finger protein AtYY1. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2012; 44:483-9.

Yang H, Francis SC, Sellers K, De Barros M, Sun C, Sumners C, et al. Hypertension-linked decrease in the expression of brain gamma-adducin. Circ Res. 2002; 91:633-9.

Yasuda T, Nakata Y, Mochizuki H. alpha-Synuclein and Neuronal Cell Death. Mol Neurobiol. 2012.

Yoon HY, Miura K, Cuthbert EJ, Davis KK, Ahvazi B, Casanova JE, et al. ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP. J Cell Sci. 2006;119(Pt 22):4650-66.

You JJ, Lin-Chao S. Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons. J Biol Chem. 2010;285:11652-66.

Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, et al. Histone deacetylase

3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. Genes Dev. 2005;19(7):827-39.