



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Bruna Luísa Franco Fadel

**Análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo
de pacientes com Doença de Parkinson**

Rio de Janeiro

2020

Bruna Luísa Franco Fadel

**Análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo
de pacientes com Doença de Parkinson**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Luciana Pizzatti Barboza

Rio de Janeiro

2020

Dedico esta dissertação à minha família, a todos os pacientes que sofrem com a Doença de Parkinson e a todos os cientistas e médicos que assim como eu estudam e buscam alternativas para melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, Andréa e Paulo, por todo apoio e incentivo, pelos cafezinhos durante as noites viradas estudando e escrevendo, pelas distrações durante os intervalos e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

À minha irmã Paula, por me fazer sorrir e acreditar sempre que achei que não era possível, por me ouvir reclamar do quão difícil estava sendo e me impulsionar pra frente, por nunca ter deixado eu desistir.

Aos meus avós, Tânia e Ronaldo, e aos meus tios, Rebeca e Antônio, que mesmo de longe se fizeram presente com todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Carlos, por todo apoio e incentivo e por não ter desistido de mim mesmo com tantas crises.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana Pizzatti, pelo auxílio nesta caminhada, e a todos do LABMOPS, Sheila, Nicole, Gaby, João, Jéssica, Mariana, vocês foram essenciais nessa jornada, tornando tudo mais leve e divertido, muito obrigada. Obrigada Letícia, que mesmo já tendo seguido seu novo caminho me deixou o legado dos exossomos e me auxiliou mesmo de longe.

À toda equipe do LabProt, Joseph, Gabriel, Natália, Adrieli, Yasmin e Prof. Dr. Fábio, por sempre me auxiliarem quando necessário e por terem me apresentado ao universo da proteômica, minha mais nova paixão.

À Dr. Ana Rosso, por nos receber em seu consultório e por compartilhar seu conhecimento e pacientes conosco.

Aos pacientes, por aceitarem doar um pouquinho de si, por acreditarem de alguma forma na importância da ciência e da construção do conhecimento.

À Pós-Graduação em Bioquímica por todo apoio necessário.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a produção dessa dissertação e que por algum motivo não foram citados.

“Longo é o caminho

E árduo, que do Inferno leva à Luz.”

- John Milton, Paraíso Perdido.

Resumo

Fadel, Bruna Luísa. Análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando milhões de pessoas em todo mundo. Até o momento não existe nenhum biomarcador, no sangue, para identificação da doença e o diagnóstico é exclusivamente clínico. A DP é caracterizada clinicamente por quatro sintomas principais: bradicinesia, tremor em repouso, instabilidade postural e rigidez, sendo caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* e formação de agregados de alfa-sinucleína, denominados corpos de *Lewy*. Com relação a progressão, a DP pode ser classificada de acordo com a escala de estadiamento de Hoehn e Yahr onde os pacientes são classificados em grau leve, moderado ou avançado de acordo com o comprometimento motor relacionado a doença. Estudos sobre exossomos indicam uma mediação na comunicação intercelular através de contato direto célula-célula ou a partir da transferência de moléculas secretadas. Os exossomos são nanovesículas (40-120nm) envoltas por uma bicamada lipídica que podem conter ácidos nucleicos, metabólitos, proteínas específicas, dentre outros em seu interior. Apesar de muitos esforços serem feitos para revelar os mecanismos envolvidos na patogênese da DP, ainda há muito a ser descoberto principalmente com relação a biomarcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico. O objetivo geral deste trabalho foi a análise do perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com doença de Parkinson. Para isso, foram coletadas amostras em colaboração com o departamento de neurologia do Hospital Universitário da UFRJ. Foram utilizadas uma coorte de 32 amostras de plasma de controles saudáveis e 97 amostras ao todo de pacientes com DP classificados clinicamente como leve (n=44), moderado (n=41) e avançado (n=12). Foram montados 4 pools os quais tiveram os exossomos enriquecidos com uso do *Kit ExoQuick®*. A partir desses exossomos foi feita a extração de proteínas e posterior análise proteômica *shotgun*; LC-MS/MS (*Q-Exactive plus*, *EASY-nLCII*, *Thermo Fisher Scientific*) dessas amostras e os resultados foram analisados por bioinformática. Foram identificadas de forma redundante um total de 671 proteínas no somatório das amostras de pacientes com DP e 229 proteínas no

grupo controle saudável. Foram identificadas 8, 9, 7, 9 proteínas exclusivamente presentes nos grupos leve, moderado, avançado e controle respectivamente. Do total de proteínas não redundantes, 234 atenderam aos critérios do software PERSEUS e seguiram para as análises quantitativas. Na comparação do grupo leve versus controle, foram identificadas um total de 42 proteínas diferencialmente expressas; na comparação do grupo moderado versus controle foram identificadas um total de 33 proteínas diferencialmente expressas; e na comparação do grupo avançado versus controle foram identificados um total de 16 proteínas diferencialmente expressas. Foram identificadas vias relacionadas a ativação plaquetária, ativação do sistema complemento e sua cascata e vias do sistema imune inato. Além disso, foram identificados níveis significativamente aumentados de hidroperóxido nos exossomos do grupo com classificação clínica leve em relação ao grupo controle e ao grupo com classificação clínica moderado. O nível antioxidante foi mensurado e foi observado uma depleção significativa em todos os grupos clínicos quando comparados com o grupo controle. O índice de estresse oxidativo apresentou nível significativamente elevado nos grupos com classificação clínica leve e moderado em relação ao grupo controle.

Palavras chave: Proteômica, Doença de Parkinson, Exossomos, Espectrometria de Massas, Sangue.

Abstract

Fadel, Bruna Luísa. Proteomic profile analysis of blood plasma enriched exosomes in patients with Parkinson's disease. Dissertation (Masters in biochemistry) – Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, affecting millions of people worldwide. So far, there is no biomarker in the blood to identify the disease and the diagnosis is exclusive clinical. PD is clinically characterized by four main symptoms: bradykinesia, tremor at rest, postural instability and stiffness, being characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and formation of alpha-synuclein aggregates, called Lewy bodies. Regarding progression, PD can be classified according to the Hoehn and Yahr staging scale where patients are classified as mild, moderate or advanced according to the disease-related motor impairment. Exosome studies indicate a mediation in intercellular communication through direct cell-cell contact or through the transfer of secreted molecules. Exosomes are nanovesicles (40-120 nm) surrounded by a Lipid bilayer that can contain nucleic acids, metabolites, specific proteins, among other insides. Although many efforts have been made to reveal the mechanisms involved in the pathogenesis of PD, there is still much to be discovered, especially regarding diagnostic and prognostic molecular biomarkers. The general objective of this work was to analyse the proteomic profile of blood plasma enriched exosomes of patients with Parkinson's disease. For this, blood samples were collected in collaboration with the neurology department of the UFRJ University Hospital. A cohort of 32 plasma samples from healthy controls and 97 samples from PD patients clinically classified as mild (n=44), moderate (n=41) and advanced (n=12) were used. Four pools were set up, which had the exosomes enriched using the ExoQuick® Kit. From these exosomes, protein extraction and subsequent shotgun proteomic analysis were performed; LC-MS/MS (Q-Exactive plus, EASY-nLCII, Thermo Fisher Scientific) of these samples and the results were analysed by bioinformatics. A total of 671 proteins were identified redundantly in the sum of samples from patients with PD and 229 proteins in the healthy control group. In a non-redundant way, a total of 260 proteins were identified in all groups in the present study. 8, 9, 7, 9, proteins were identified exclusively present in the mild, moderate, advanced and control group, respectively. Of the total number of non-redundant proteins, 234 met the criteria of the PERSEUS software and went on to quantitative analysis. When comparing the mild versus control group, a total

of 42 differentially expressed proteins were identified. When comparing the moderate versus control groups, a total of 33 differentially expressed proteins were identified. And in the comparison of the advanced versus control group, a total of 16 differentially expressed proteins were identified. Pathways related to platelet activation, activation of the complement system and its cascade and pathways of the innate immune system were identified. In addition, significantly increased levels of hydroperoxide were identified in the exosomes of the group with mild clinical classification in relation to the control group and the group with moderate clinical classification. The antioxidant level was measured and significant depletion was observed in all clinical groups when compared to the control group. The oxidative stress index showed a significantly high level in the groups with mild and moderate clinical classification in relation to the control group.

Keywords: Proteomic, Parkinson Disease, Exosome, Mass Spectrometry, Blood.

Lista de abreviaturas

2,4-D – Ácido diclorofenoxiacético

ACN – Acetonitrila

AHSG – *Alpha-2-HS-glycoprotein*

AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina

APCS – *Serum amyloid P-component*

APN – *Adiponectin*

ATP – Adenosina trifosfato

BBB – Barreira hematoencefálica; do inglês: “*Blood-brain barrier*”

CFHR5 – *Complement factor D*

CL – Corpus de Lewy

CLU – *Clusterin*

CMV – Corpus multivesiculares

CNDP1 – *Beta-Ala-His dipeptidase*

COLL1A2 – *Collagen alpha 1 (I) chain*

COMP – *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*

CRP – *C-reactive protein*

DA – Doença de Alzheimer

DDA – Aquisição dependente de dados; do inglês: “*Data dependent acquisition*”

DIA – Aquisição independente de dados; do inglês: “*data independent acquisition*”

DLB – Demência com corpos de Lewy; do inglês: “*Dementia with Lewy bodies*”

DNA – Ácido desoxirribonucleico; do inglês: “*Deoxyribonucleic acid*”

DP – Doença de Parkinson

DTT – Ditionitreitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético; do inglês: “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

EM – Espectrometria de massas

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ESCRT – Complexo de classificação endossômica necessário para o transporte; do inglês: “*Endosomal sorting complexes required for transport*”

ETC – Cadeia transportadora de elétrons; do inglês: “*Electron transport chain*”

FA – Ácido fórmico; do inglês: “*Formic acid*”

FCN2 – *Ficolin-2*

FDR – Taxa de descoberta falsa; do inglês: “*False Discovery rate*”

FLNA – *Filamin-A*

Gcase – Glucocerebrosidase

GPX3 – *Glutathione peroxidase 3*

GSH – Glutathione

GTP – Trifosfato de guanosina

H&Y – Escala de Hoehn & Yahr modificada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCD – Energia de dissociação de colisão; do inglês: “*higher energy collision dissociation*”

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HSC70 – *Heat shock cognate 71KDa protein*

IAA – Iodoacetamida

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística

IGF2 – *Insuline-like growth factor 2*

IL-1 β – Interleucina-1 β

IMC – Índice de massa corporal

ITGA1 – *Integrin alpha 1*

ITIH3 – *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3*

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *em tandem*; do inglês: “*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*”

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDHB – *L lactate dehydrogenase B chain*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LUM – *Lumican*

M – Misto

m/z – Razão massa carga

MAPK – MAP quinase

MASP2 – *Mannan-binding lectin serine protease 2*

miRNA – micro RNA

MPT – Modificação pós-traducional

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

mRNA – RNA mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

NAC – Componente não- β -amilóide; do inglês: “*Non-A β componente*”

NaCl – Cloreto de sódio

NADH – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PFN1 – *Profilin-1*

PGC-1alfa – Co ativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo; do inglês: “*Peroxisome proliferator-activated gamma receptor coactivator 1-alpha*”

PKM – *Pyruvate kinase*

PON1 – *Serum paraoxonase/arylesterase*

PRG4 – *Proteoglycan 4*

PROZ – *Vitamin k- dependente protein Z*

PrP – Proteína priônica

PRX1 – *Peroxiredoxin 1*

RA – Rígido Acinético

RAP1B – *Ras Related protein RAP1b*

RNA – Ácido ribonucleico; do inglês: “*Ribonucleic acid*”

rpm – Rotação por minuto

S100A8 – *Protein S100-A8*

SAA4 – *Serum amyloid A-4*

SE – Escala de Schwab & England

Se – Selênio

SEEP1 – *Selenoprotein P*

SM – Sintomas motores

SNARES - Receptor solúvel de fixação de NSF; do inglês: “*Soluble NSF attachment receptor*”

SNC – Sistema nervoso central

Snca – Gene da α -sinucleína

SNE – Sistema nervoso entérico

SNM – Sintomas não motores

SNP – Sistema nervoso periférico

SNpc – Substância negra *pars compacta*

SOD – Superóxido dismutase

TD – Tremor-dominante

TFA – Ácido trifluoroacético; do inglês: “*trifluoroacetic acid*”

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TRAP – Medida da capacidade antioxidante plasmática; do inglês: “*total reactive antioxidant potential*”

UPDR – Escala unificada de classificação da doença de Parkinson; do inglês: “*Unified Parkinson’s disease rating scale*”

UPS – Sistema ubiquitina proteassoma; do inglês: “*Proteasome Ubiquitin System*”

VEs – Vesículas extracelulares

VILs – Vesículas intraluminais

YKL40 – *Chitinase-3-like protein1*

α -SIN – proteína α -sinucleína

Lista de figuras

Figura 1. Marcas celulares características da DP já registradas.....	22
Figura 2. Influência de fatores ambientais e genéticos na DP.....	23
Figura 3. Vias afetadas na DP.....	27
Figura 4. Alfa-sinucleína humana.....	39
Figura 5. Propagação tipo príon de agregados de α -sinucleína patogênicos.....	43
Figura 6. Propagação da α -sinucleína segundo Braak.....	44
Figura 7. Representação esquemática da hipótese de Braak na doença de Parkinson.....	46
Figura 8. Tipo de vesículas extracelulares.....	48
Figura 9. Representação esquemática da biogênese dos exossomos.....	51
Figura 10. Exossomos como mediadores da comunicação intercelular neurônio-glia na progressão da doença de Parkinson.....	53
Figura 11. Exossomos como potenciais ferramentas biológicas para diagnóstico e terapia.....	57
Figura 12. Cromatogramas.....	75
Figura 13. Diagrama de Venn da distribuição das proteínas identificadas em cada grupo de pacientes classificados clinicamente de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis.....	79
Figura 14. Histograma.....	84
Figura 15. Gráfico de dispersão <i>volcano</i> representando as proteínas diferencialmente expressas entre as classificações clínicas e controles.....	85
Figura 16. Análise de origem celular das proteínas diferencialmente expressas nos grupos clínicos estudados.....	98
Figura 17. Processos biológicos representados pelas proteínas diferencialmente expressas identificadas em exossomos.....	99

Figura 18. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Leve.....	101
Figura 19. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Moderado.....	102
Figura 20. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Avançado.....	103
Figura 21. Resumo das proteínas diferencialmente expressas estatisticamente significativas encontradas em exossomos enriquecidos de plasma sanguíneo de pacientes com DP e controles saudáveis.....	105
Figura 22. Rede de interação das proteínas super expressas identificadas em todos os grupos classificados clinicamente.....	108
Figura 23. Quantificação de hidroperóxidos em exossomos de pacientes com DP e controles pareados por idade.....	110
Figura 24. Perfil antioxidante de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com DP classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis.....	111
Figura 25. Índice de estresse oxidativo presente em amostras de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com DP classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis.....	112

Lista de tabelas

Tabela 1. Critério de diagnóstico clínico segundo a <i>UK Parkinson's Disease Society Brain Bank</i>	34
Tabela 2. Escala de Estadiamento de Hoehn e Yahr Modificada.....	37
Tabela 3. Escala de Atividades de Schwab e England.....	37
Tabela 4. Total de amostras utilizadas no trabalho e divisão em grupos clínicos de acordo com a escala de estadiamento de H&Y.....	66
Tabela 5. Informações clínicas e demográficas da coorte.....	73
Tabela 6. Proteínas exclusivas H&Y e controles saudáveis.....	79
Tabela 7. Análise funcional de associações de processos biológicos.....	82
Tabela 8. Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação LEVE (H&Y) em relação a controles saudáveis.....	86
Tabela 9. Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação MODERADO (H&Y) em relação a controles saudáveis.....	91
Tabela 10. Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação AVANÇADO (H&Y) em relação a controles saudáveis.....	94
Tabela 11. Vias de sinalização enriquecidas representadas pelos perfis proteômicos em todos os grupos clínicos após comparação com controles saudáveis.....	106

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	20
1.1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson.....	20
1.1.2 Etiologia da Doença de Parkinson.....	21
1.1.3 Patogenia da Doença de Parkinson.....	25
1.1.4 O papel do estresse oxidativo na Doença de Parkinson.....	29
1.1.5 Avaliação clínica e sintomas da Doença de Parkinson.....	32
1.1.6 α -sinucleína na Doença de Parkinson.....	38
1.1.7 Hipóteses de propagação da α -sinucleína sugeridos para patologia da Doença de Parkinson.....	41
1.2 EXOSSOMOS.....	47
1.2.1 Biogênese e função dos exossomos.....	47
1.2.2 Exossomos na Doença de Parkinson.....	52
1.2.3 Potencial terapêutico dos exossomos.....	56
1.3 PROTEÔMICA.....	57
1.3.1 Proteômica na Doença de Parkinson.....	60
2 JUSTIFICATIVA.....	61
3 OBJETIVOS.....	64
3.1 OBJETIVO GERAL.....	64
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	64
4.2 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	66
4.2.1 Enriquecimento e caracterização dos exossomos.....	66

4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	67
4.3.1 Preparo das amostras e digestão de proteínas.....	67
4.3.2 Purificação e secagem dos peptídeos trípticos.....	68
4.3.3 Espectrometria de massas.....	69
4.3.4 Análise dos dados brutos e identificação das proteínas.....	70
4.4 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	70
4.5 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (HIDROPERÓXIDOS) PLASMÁTICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PLASMÁTICA (TRAP).....	71
5 RESULTADOS.....	73
5.1 ANÁLISE PROTEÔMICA DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLASMA DE PACIENTES COM DP E CONTROLES SAUDÁVEIS.....	73
5.1.1 Caracterização clínica da coorte.....	73
5.1.2 Análise proteômica.....	75
5.2 ANÁLISE FUNCIONAL <i>IN SILICO</i>	97
5.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EXOSSOMOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON.....	108
6 DISCUSSÃO.....	112
7 CONCLUSÃO.....	134
8 REFERÊNCIAS.....	135
9 ANEXOS.....	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817 em sua publicação *“An Essay on the Shaking Palsy”* (SAUERBIER *et al.*, 2016; CACABELOS, 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). É a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, progressiva e relacionada à idade, atrás apenas da Doença de Alzheimer (DA) (SRIVASTAVA *et al.*, 2010; ANTONY *et al.*, 2013; CACABELOS, 2017; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Com uma incidência anual de 1,5 a 346 por 100.000 habitantes em diferentes países, esta doença está se tornando um importante problema de saúde relacionado a idade (CACABELOS, 2017). A idade de início é por volta dos 60 anos (OLANOW; STERN; SETHI, 2009), havendo uma estimativa de que afete aproximadamente 2 a 3% da população idosa (YILMAZ *et al.*, 2018). A DP esporádica é rara antes dos 50 anos, no entanto, há uma prevalência de 2% na população global com 65 anos, chegando a 5% em indivíduos com 80 anos (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Análises sistemáticas de estudos epidemiológicos apontam um aumento mundial do número de pacientes acometidos por este distúrbio de 2,5 milhões para 6,1 milhões no período de 1990 a 2016, tornando-a a doença neurológica que mais cresce no mundo. As principais razões para o aumento nos números são o envelhecimento e o aumento da expectativa de vida da população (AMADORI, K.; STEINER, T., 2019). Sendo assim, regiões geográficas com populações mais velhas e maior expectativa de vida tendem a ter uma maior prevalência de casos de DP (BEN-JOSEPH, A. *et al.*, 2019).

A DP difere significativamente entre as regiões geográficas, sendo observadas taxas mais altas na América do Sul em comparação com Europa e América do Norte, independentemente da faixa etária (RODRIGUES-DE-PAULA *et al.*, 2018). Mudanças nos perfis demográficos no Brasil e no mundo vem sendo observadas, concomitantemente com o maior envelhecimento populacional. É estimado que em 2060 os indivíduos com mais de 60 anos respondam a cerca de 33,7% de toda a população brasileira, o que leva a expectativa de que doenças características dos

idosos, como é o caso desta enfermidade, passem a ser mais prevalentes. No Brasil, o relato de DP não é obrigatório, resultando apenas numa estimativa de sua prevalência, não havendo um dado oficial sobre o número real de pacientes (BOLOVENTA; FELÍCIO, 2016). Tal estimativa envolve uma taxa de acometimento de cerca de 3.300 por 100.000 indivíduos acima de 64 anos, uma das mais altas em relação a outros países (RODRIGUES-DE-PAULA *et al.*, 2018). Com isso, aumenta a importância da compreensão das patologias neurodegenerativas e se torna urgentemente necessário o desenvolvimento de terapias e tratamentos, visando uma melhor qualidade de vida aos idosos acometidos por estas doenças (YLMAZ *et al.*, 2018).

1.1.2 Etiologia da Doença de Parkinson

Anteriormente, pensava-se que a DP era causada principalmente por fatores ambientais (KALIA; LANG, 2015), mas a pesquisa na área está revelando que a maioria dos casos tem uma etiologia multifatorial, resultante de uma complicada combinação de fatores ambientais e/ou genéticos os quais estão correlacionados à fenótipos celulares, considerados como “ as marcas registradas da DP” (do inglês: “*Hallmarks of PD*”) os quais podem ser observados na figura 1. Apesar de mutações identificadas em certos genes causarem a DP em cerca de 5-10% dos casos, as mesmas estão ausentes na maioria dos indivíduos que apresentam o diagnóstico, sendo então classificados como casos esporádicos da doença (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Embora a DP esporádica raramente ocorra antes dos 50 anos de idade, sua prevalência aumenta acentuadamente com o aumento da idade. (AMADORI; STEINER, 2019).



Figura 1: Marcas celulares características da DP já registradas. Todos os subtipos da DP podem dividir fenótipos celulares comuns. Correlações entre os fenótipos celulares representados e a progressão da doença foram estabelecidos. Em contraste os mecanismos cronológicos relativos a cada subtipo celular ainda não foram estabelecidos. **Adaptado de ANTONY *et al.*, 2013.**

Diversos estudos em todo o mundo apontam a exposição a pesticidas, o trabalho agrícola ou a residência rural e o consumo de água de poço como associados a um risco aumentado de desenvolvimento da DP (ANTONY *et al.*, 2013; KALIA; LANG, 2015; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Os pesticidas associados à DP, incluindo paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto), rotenona, 2,4-D e vários ditiocarbamatos e organoclorados, causam Parkinsonismo experimental em estudos de laboratório, apoiando a possibilidade de que essas associações podem refletir efeitos causais. Assim como uma maior ingestão de derivados lácteos tem sido associada ao maior risco de desenvolvimento desta doença, possivelmente devido à concentração de substâncias tóxicas no leite (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Toxinas e pesticidas ambientais tais como MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) e rotenona, atravessam livremente as membranas lipídicas e se acumulam nas mitocôndrias após inalação ou ingestão. Uma vez dentro das mitocôndrias, essas substâncias prejudicam significativamente a atividade redox do complexo mitocondrial I, bloqueando o fluxo de elétrons da desidrogenase da NADH para a coenzima Q, promovendo significativa geração de oxigênio (O_2) e redução da síntese de ATP (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Por outro lado, comportamentos como boas práticas de higiene ou alimentação saudável, mais ricas em frutas,

vegetais e grãos, podem proteger contra os efeitos adversos da exposição a pesticidas. Atividades físicas, mesmo em níveis considerados modestos, vêm sendo associadas à redução do risco de DP. A ingestão de café e o uso de cafeína também vem sendo associado a um menor risco de desenvolvimento da doença, assim como maior consumo de chá. (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

De forma geral, fatores genéticos específicos que desempenham um papel importante para o risco de DP podem ser identificados em um subconjunto de pacientes. A genética dessa doença é complexa. Variantes comuns podem contribuir para o risco de DP e podem interagir com outros fatores genéticos e com fatores ambientais como pode ser observado na figura 2 (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

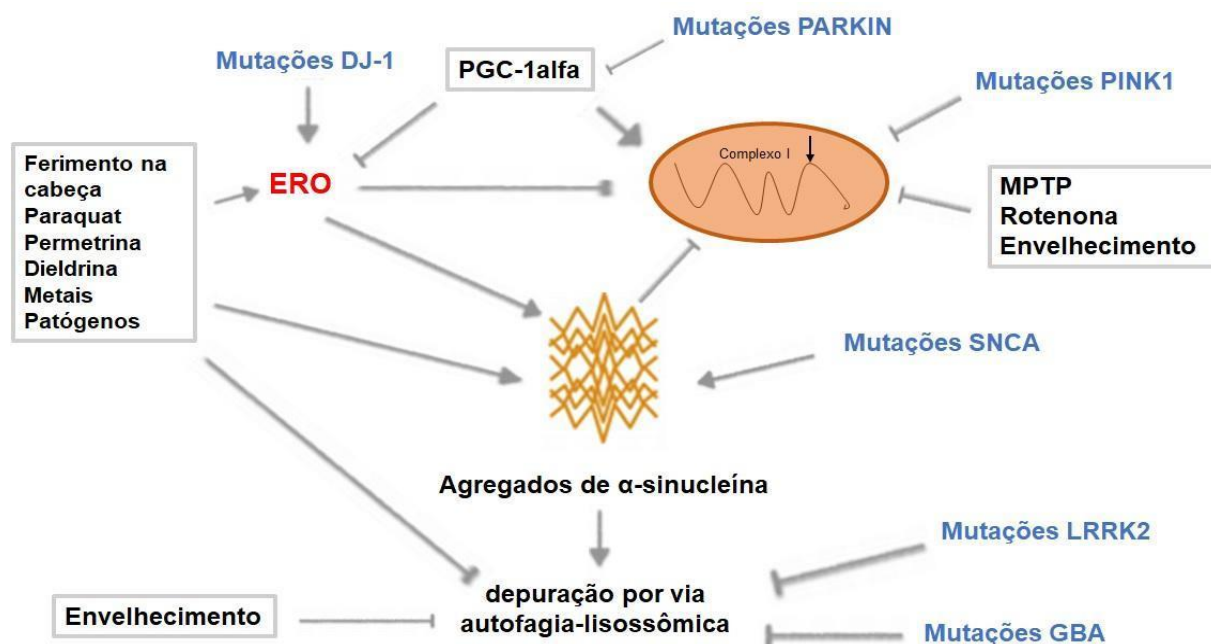


Figura 2: Influência de fatores ambientais e genéticos na DP. Fatores ambientais e genéticos influenciam a patogênese da DP ao impactar vias semelhantes, incluindo a função mitocondrial, estresse oxidativo, agregação de α -sinucleína e vias de eliminação de proteínas anormais. ERO: espécies reativas de oxigênio; SNCA: gene da α -sinucleína; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina; PGC-1alfa: do inglês - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*. Adaptado de SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019.

Além dos fatores químicos, quase todas as mutações genéticas conhecidas ligadas à DP resultam em um comprometimento da atividade do complexo mitocondrial I e na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), embora por diferentes vias moleculares. Geralmente, mutações associadas a formas

autossômicas recessivas da DP (*dj-1*, *pink1*, *parkin*, *gba-1*, *atp13a2*) resultam em fragmentação mitocondrial e perda da atividade do complexo mitocondrial I após a perda de função dos seus produtos proteicos. Por outro lado, mutações subjacentes à DP autossômica dominante (*snca* (gene da α -sinucleína), *lrrk2*) estão associadas a uma função de ganho de toxicidade de produtos proteicos mal enovelados, interrompendo a fosforilação oxidativa mitocondrial por meio de uma interação com o complexo mitocondrial I (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Os genes *parkin* e *pink1* foram associados a uma via celular envolvendo a degradação preferencial nos lisossomos das mitocôndrias disfuncionais através da macroautofagia, um processo denominado mitofagia (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). O gene *pink1* se acumula na membrana externa das mitocôndrias danificadas seguido pelo recrutamento de *parkin* para promover a mitofagia (CACABELOS, 2017). Com isso, a perda de funções desses genes leva a diminuição desse processo, resultando no acúmulo de mitocôndrias disfuncionais. As mutações em *pink1* e *dj-1* podem apresentar déficits motores progressivos e disfunção da marcha (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

O gene *dj-1*, desempenha um papel significativo na defesa antioxidante celular contra o estresse oxidativo (CACABELOS, 2017; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). O gene *parkin* é a única ubiquitina ligase multifuncional, cujos diversos papéis na célula, particularmente nos neurônios, são amplamente considerados protetores. A disfunção em *parkin* representa uma causa predominante de Parkinsonismo familiar e um fator de risco para a forma esporádica da doença. Este gene desempenha funções de controle de qualidade de proteínas *housekeeping*, presentes para manutenção do próprio funcionamento celular, regula a homeostase mitocondrial e a sinalização relacionada ao estresse oxidativo (CACABELOS, 2017). O gene *parkin* também regula indiretamente os níveis de *pcg-1alfa* (Co ativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo, do inglês: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), importante regulador transcricional, responsável por regular de forma coordenada a expressão dos genes necessários à biogênese mitocondrial, bem como múltiplas defesas antioxidantes. Os níveis de *pcg-1alfa* são baixos na DP esporádica (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

Mutações no gene *lrrk2* estão presentes em cerca de 1 a 2% de todos os pacientes com DP e 5% na DP familiar (DOTY *et al.*, 2012; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Esse gene codifica a repetição da quinase 2 rica em leucina, uma grande proteína de múltiplos domínios envolvida em diversos processos celulares, incluindo crescimento de neurites e morfogênese sináptica, tráfego de membranas, autofagia e síntese de proteínas. Este gene também pode apresentar um papel no sistema imunológico inato, sua atividade é conferida, em parte, por suas duplas funções enzimáticas (GTPase e serina-treonina-quinase) (KALIA; LANG, 2015). Pacientes com mutação *parkin* tem um início mais precoce e simétrico da doença, com uma progressão mais lenta, diferente do *lrrk2* (SAUERBIER *et al.*, 2016). Os genes *lrrk2* e *parkin* são as causas mais comuns da DP herdada dominante e recessiva, respectivamente (KALIA; LANG, 2015).

Outro fator genético comumente encontrado como contribuinte para o risco de DP está relacionado a mutações no gene *gba*, associados a doença de Gaucher autossômica recessiva. Os portadores de mutações no gene *gba* apresentam um risco aproximadamente 4 vezes maior de desenvolver esta patologia, embora o risco varie com diferentes mutações GBA. Tais mutações, promovem uma perda de atividade da enzima lisossômica glucocerebrosidase (GCase) (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). A presença de GCase mal enovelada nos lisossomos, juntamente com uma redução de seu tipo selvagem, leva a um retardo da degradação de α -sinucleína (α -SIN) via autofagia mediada por chaperonas, resultando assim num acúmulo e agregação desta proteína (CACABELOS, 2017). Além disso, mutações GBA também são reconhecidos como um importante fator de risco para o desenvolvimento de DP esporádica e está associada ao declínio cognitivo e a demência (SAUERBIER *et al.*, 2016).

1.1.3. Patogenia da Doença de Parkinson

Patologicamente, a DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra *pars compacta* (SNpc) localizada no mesencéfalo, juntamente com o surgimento de inclusões proteicas intracitoplasmáticas incluindo agregados de α -SIN insolúveis, denominados corpos de Lewy (CL) (OLANOW, C.W. *et al.*, 2009; CACABELOS, 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). A perda neuronal na SNpc apresenta uma relação linear com os

sintomas motores (SM) (RIETDIJK *et al.*, 2017). Além disso, o estresse oxidativo, vem sendo implicado como um fator chave da cascata degenerativa complexa subjacente a neurodegeneração dopaminérgica em todas as formas de DP. Seu surgimento se dá a partir da desregulação da atividade redox celular, onde a produção de ERO supera a depuração por enzimas antioxidantes endógenas e chaperonas moleculares (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Os sistemas de neurotransmissores afetados na DP são generalizados e a convergência de déficits em várias vias de transmissão que incluem disfunções nas vias colinérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas como pode ser observado na figura 3, possivelmente levando a uma atividade anormal da rede cerebral central originando alguns dos SM e não motores, resultando na expressão clínica da DP (TITOVA *et al.*, 2016).

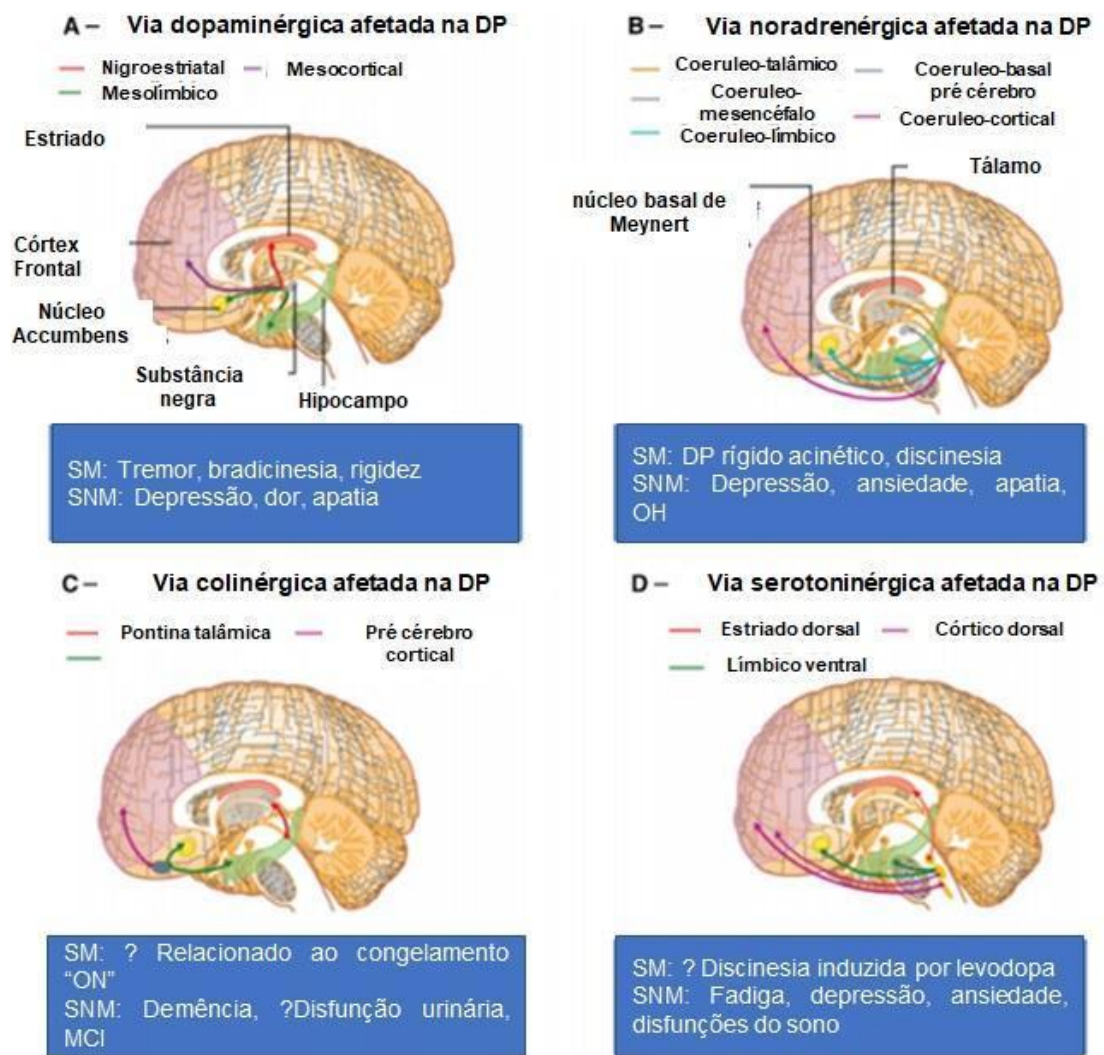


Figura 3: Vias afetadas na DP. Disfunção multissistêmica e multi-neurotransmissor na DP. As setas indicam os caminhos das alterações das respectivas vias afetadas na DP. SNM: Sintomas não motores. SM: sintomas motores. OH: Hipotensão ortostática. MCI: leve comprometimento cognitivo. **Adaptado de TITOVA et al., 2016.**

A DP é caracterizada por ser a patologia mais difundida em outras regiões do cérebro envolvendo também neurônios não dopaminérgicos (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Alguns autores relataram que núcleos não dopaminérgicos podem degenerar numa taxa mais rápida e às vezes em maior grau do que os neurônios dopaminérgicos nos estágios iniciais e prodromico, que antecedem as manifestações e/ou aparecimento da doença (TITOVA et al., 2016).

O processo patológico que leva a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra e a neurodegeneração mais disseminada na DP tem sido associado à inflamação neuronal (YILMAZ et al., 2018). O termo

neuroinflamação define amplamente processos inflamatórios que ocorrem no sistema nervoso central (SNC), envolvendo o sistema imunológico inato e adaptativo (GELDERS *et al.*, 2018). A neuroinflamação é outra característica, além da presença dos CL, da patologia da doença. A presença de uma resposta inflamatória ativa no cérebro mediada principalmente por astrócitos e microglia residentes é reconhecida há muito tempo, mas de certa forma esquecida quando se trata da DP (KALIA; LANG, 2015). Microglia são as principais células imunes inatas do cérebro e têm papéis fundamentais na homeostase do SNC. Tais células examinam continuamente seu microambiente e monitoram a atividade sináptica em andamento, removem células apoptóticas e fornecem suporte trófico para os neurônios. Essas células representam a primeira linha de defesa no cérebro e reagem a eventos patológicos através de uma cascata de processos inflamatórios. Já os astrócitos, são células residentes do cérebro, que contribuem para o desenvolvimento e plasticidade do SNC, fornecendo energia aos neurônios e mantendo a homeostase cerebral (GELDERS *et al.*, 2018).

Normalmente a inflamação é um mecanismo de defesa complexo que ocorre no corpo em resposta à homeostase perturbada (GELDERS *et al.*, 2018). É um processo crítico na progressão da DP. Uma resposta inflamatória adequada é essencial para o reparo tecidual, mas uma resposta inflamatória excessiva e retardada pode levar a um ciclo maligno de neuroinflamação e propagação da doença. Os exossomos, que serão mencionados na seção 1.2, podem participar de diferentes estágios do processo inflamatório, incluindo o estágio de ativação, por meio da comunicação neurônio-neuroglia, e o estágio de exacerbação, por meio da comunicação neuroglia-neuroglia. Até agora, o papel exato dos exossomos na neuroinflamação não foi completamente elucidado, e mais pesquisas são essenciais (YU *et al.*, 2020). A neuroinflamação, anteriormente costumava ser vista apenas como uma resposta a neurodegeneração em andamento. Estudos recentes sugerem que a neuroinflamação pode ser um evento colaborador importante e essencial à agregação da α -SIN e do processo neurodegenerativo. Além disso, estudos epidemiológicos forneceram evidências de associações entre doenças com inflamação periférica (por exemplo, diabetes tipo 2 e doença inflamatória intestinal) e risco elevado de DP (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). A pesquisa sobre neuroinflamação na DP concentra-se principalmente no sistema imunológico inato e, em particular, no papel da microglia (ANTONY *et al.*, 2013), uma vez que as células gliais são os principais

contribuintes para a neuroinflamação, em parte por meio dos receptores *toll-like* (RIETDIJK *et al.*, 2017).

É provável que a neurodegeneração relacionada à DP ocorra várias décadas antes do início dos SM (CACABELOS, 2017). Até a presente data, foram identificados 70 loci no genoma que, quando alterados, contribuem para o risco de DP. Vários desses loci estão próximos de genes envolvidos no sistema lisossômico-autofágico e no sistema imune, cujas funções esperadas para desempenhar papéis importantes no manuseio da α -SIN mal enovelada (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). A disfunção da degradação molecular e organelar é uma característica da DP, evidências crescentes indicam alterações funcionais entre o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS, do inglês: ubiquitin-proteasome system) e a autofagia. A disfunção desses sistemas de depuração facilita o acúmulo de α -SIN e mitocôndrias defeituosas (ANTONY *et al.*, 2013). As células da microglia são capazes de detectar a α -SIN mal enovelada e aumentar a neurotoxicidade através da produção de ERO e citocinas pró-inflamatórias (ANTONY *et al.*, 2013).

O acúmulo de α -SIN, disfunção mitocondrial, comprometimento autofágico, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático são achados comuns na cascata patogênica da DP (CACABELOS, 2017). Dados atuais demonstram alterações patológicas moderadas na região da SNpc humana. Esses dados foram obtidos em análises *pós-mortem* em indivíduos saudáveis, quando comparados com outras regiões cerebrais com idade semelhante. As alterações incluem disfunção mitocondrial leve, desregulação de cálcio e ferro e deficiências antioxidantes. Essas patologias são provavelmente um produto de distúrbios no ambiente bioquímico exclusivo de neurônios dopaminérgicos nigrais do envelhecimento. Sendo estas, sugeridas como base da mudança gradual do equilíbrio redox neuronal para níveis perigosos à medida que o cérebro envelhece (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

1.1.4 O papel do estresse oxidativo na Doença de Parkinson

As ERO são normalmente produzidas na célula durante as reações da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ETC, do inglês: *electron transport chain*) ou a partir de reações redox e são de fato um componente necessário à homeostase celular. No entanto, apesar da importância das ERO na fisiologia normal, proteínas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e glutatona (GSH) também

impedem que os níveis de ERO fiquem muito altos. A falha desses antioxidantes na regulação dos níveis de ERO leva ao estresse oxidativo (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

O estresse oxidativo em si não é patológico, ao contrário, o acúmulo de ERO após o desequilíbrio redox celular medeia os danos neuronais. Embora as ERO constituam importantes moléculas de sinalização que regulam a transcrição de genes e as interações proteicas, como por exemplo em casos de disfunção mitocondrial, seu acúmulo pode resultar em danos oxidativos aos lipídeos, proteínas, DNA, RNA. Dependendo da localização subcelular da produção de ERO, podem comprometer a função neuronal e a integridade estrutural, além de causar a interrupção das cascatas de sinalização (ANTONY *et al.*, 2013; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Com o estresse oxidativo, as chances de mutações espontâneas aumentam, tornando possível o desencadeamento de mutações que tornam as células mais vulneráveis às disfunções ocorridas na patologia (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017). O estresse oxidativo desempenha um papel central na progressão da DP, uma vez que pode atuar afetando a estabilidade do ácido nucleico pela oxidação do RNA, aumentando a mutação do mtDNA e iniciando a síntese de translesão, perturbando a homeostase proteica, acelerando a agregação de α -SIN, agregação de PARKIN e dissociação de proteassomos (CACABELOS, 2017).

O envolvimento das mitocôndrias na patogênese da DP foi sugerido pela primeira vez após indivíduos consumirem drogas ilícitas contaminadas com MPTP. Sintomas semelhantes aos presentes na DP foram observados logo após a ingestão do medicamento, com análises *pós-mortem*, revelando a destruição da SNpc (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017). Foi proposto que a disfunção mitocondrial possa ser central na patogênese da DP esporádica e familiar. Observações a partir de modelos experimentais e de DP humana forneceram fortes evidências da ocorrência de rupturas na dinâmica mitocondrial, de defeitos de bioenergética, de inibição do complexo I da ETC e do aumento das ERO (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Tal declínio do complexo I e ERO intracelular elevada foram verificadas na SNpc do cérebro *pós-mortem* de pacientes com DP. A produção de ERO a partir da ação mitocondrial é fisiológica, mas a disfunção do ETC na mitocôndria danificada causa produção excessiva de ERO, sendo prejudicial para as células (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

Apoiando ainda mais a importância das mitocôndrias e sua relevância na DP, está o fato de que genes relacionados à DP, como *pink1*, *parkin*, *dj-1* e *lrrk2*, codificam proteínas que regulam a homeostase mitocondrial e de ERO. A proteína mitocondrial PINK1 é degradada rapidamente em mitocôndrias saudáveis. Já em mitocôndrias defeituosas, as quais podem exibir, altos níveis de estresse oxidativo, diminuição do potencial de membrana, ou presença de proteínas mal enoveladas, a degradação de PINK1 é impedida, o que leva ao seu acúmulo na membrana externa. (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

Dados coletados de pacientes com DP em estágio inicial demonstram que o estresse oxidativo elevado é uma característica robusta dos estágios iniciais da doença, ocorrendo antes da perda significativa de neurônios. Isso implica a geração descontrolada de ERO como um fator causal potencial na morte de neurônios dopaminérgicos, em vez de ser uma resposta secundária a neurodegeneração progressiva (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Ao mesmo tempo, mecanismos de defesa antioxidante são ativados para compensar a homeostase redox desarranjada (ANTONY *et al.*, 2013). Uma melhor compreensão do papel complexo do estresse oxidativo na etiologia da DP pode, portanto, revelar novos alvos para modificações terapêuticas e diagnóstico pré-clínico (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

O cérebro é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo em comparação com outros órgãos periféricos devido a altos níveis de gorduras poli-insaturadas e atividade antioxidante relativamente baixa (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Muitos fatores determinantes do estresse oxidativo nigral no envelhecimento saudável foram identificados como principais contribuintes para o estresse oxidativo aumentado na SNpc da DP, sugerindo que a etiologia da DP pode envolver uma exacerbação das vias moleculares envolvidas no envelhecimento saudável (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Evidências substanciais sugerem que há uma relação bidirecional entre a oligomerização da α -SIN e a geração de ERO. Uma via para a geração de estresse oxidativo a partir do acúmulo de α -SIN é através da ativação de células microgliais (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Foi relatado que em neurônios tratados com oligômeros de α -SIN ocorre o desencadeamento do estresse oxidativo de forma mais potente do que em neurônios tratados com monômeros e fibrilas, além disso, os neurônios tratados com oligômeros de α -SIN demonstraram uma redução no nível de GSH e um aumento na peroxidação lipídica (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

Embora a toxicidade da α -SIN, ou seja, seus oligômeros, possa contribuir para elevar o estresse oxidativo celular, também foi sugerido que o estresse oxidativo pode desencadear a toxicidade, a partir da formação de oligômeros, da α -SIN (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

1.1.5 Avaliação clínica e sintomas da Doença de Parkinson

A neurodegeneração dopaminérgica resulta na depleção de dopamina na região do estriado, levando à perda do controle motor e ao início dos SM conhecidos como as principais características da DP, sendo eles: tremor em repouso, instabilidade postural, rigidez muscular e lentidão dos movimentos (bradicinesia) (ANTONY *et al.*, 2013; SRIVASTAVA *et al.*, 2010). A bradicinesia é considerada a principal característica e a condição necessária para o diagnóstico da DP (KALIA; LANG, 2015; LIAN *et al.*, 2019). Ainda não é possível um diagnóstico de DP em estágio inicial, uma vez que o diagnóstico é apenas clínico e os sintomas clínicos da doença aparecem apenas após uma perda de 70 a 80% dos neurônios dopaminérgicos, deixando opções muito limitadas para intervenção terapêutica (SRIVASTAVA *et al.*, 2010; ANTONY *et al.*, 2013; HORVATH *et al.*, 2017). A deficiência de dopamina resultante nos gânglios da base leva a um distúrbio do movimento caracterizado por SM Parkinsonianos clássicos (KALIA; LANG, 2015; LIAN *et al.*, 2019). Sendo assim, a DP quase se tornou sinônimo de uma síndrome motora por deficiência de dopamina, essa posição foi reforçada pelo efeito dramático da levodopa na redução das características motoras da doença, no entanto, quando se trata da síndrome não motora ele não se mostra tão efetivo (TITOVA *et al.*, 2016).

Evidências crescentes apontam a DP como, de fato, um distúrbio multissistêmico complexo, sendo uma combinação de síndromes motoras e não motoras. O foco do gerenciamento e tratamento da DP tem sido o controle dos SM, no entanto, foi demonstrado que a linha do tempo para o desenvolvimento da DP inclui um período que varia de 5-20 anos, dominado por uma série de sintomas não motores (SNM) anteriores ao início dos SM. Cada paciente apresenta uma resposta individual à medicação, complicações específicas e prognóstico variável. No entanto, ainda não é possível prever a resposta e o prognóstico do tratamento (SAUERBIER *et al.*, 2016). Hiposmia (baixa sensibilidade olfativa); anosmia (perda do olfato); distúrbios do sono, como o distúrbio do comportamento do sono por movimentos oculares rápidos;

depressão, constipação e outros sintomas disautonômicos (transtorno provocado por alterações que ocorrem no sistema nervoso autônomo, quando um desequilíbrio do sistema simpático/parassimpático afeta as funções involuntárias que ajuda a coordenar), são alguns dos SNM que podem anteceder o surgimento dos déficits motores (ANTONY *et al.*, 2013; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Em particular, o movimento rápido dos olhos, o distúrbio do comportamento do sono e a hiposmia de início tardio, geralmente, começam antes do início da síndrome motora central, as quais se apresentam como possíveis características importantes para o desenvolvimento dos aspectos motores do Parkinsonismo e da DP (ANTONY *et al.*, 2013; SAUERBIER *et al.*, 2016).

Com a progressão da doença, características não motoras adicionais podem surgir em estágios posteriores, como por exemplo a disfunção autonômica já mencionada, dor, fadiga, sonolência e declínio cognitivo (TITOVA *et al.*, 2016; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Alguns desses sintomas, como a constipação, disfagia, náusea e o problema da perda de olfato (anosmia), são evidências que apoiam a hipótese de Braak que será comentada mais adiante, na seção 1.1.7 (RIETDIJK *et al.*, 2017).

Atualmente, não há cura para a DP, e os objetivos do tratamento são aliviar os sintomas para o conforto dos pacientes e minimizar a discinesia. A levodopa é a linha principal da terapia de reposição de dopamina que restaura déficits resultantes da perda de neurônios dopaminérgicos. Isso proporciona o maior benefício sintomático e alivia os SM (ANTONY *et al.*, 2013; RIETDIJK *et al.*, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017). No entanto, como a eficácia diminui com o tempo, os médicos precisam adiar a prescrição de levodopa o máximo possível. Os relatórios mostraram que apenas ~25% dos pacientes tratados com levodopa por cinco anos continuam tendo uma boa resposta (WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Foram observados efeitos adversos da levodopa como por exemplo, discinesia, psicose, alucinações e hipotensão (NICOLETTI *et al.*, 2016; WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Além disso, embora existam outras opções terapêuticas como Sinemet (carbidopa-levodopa), Rasagilina/Azilet (inibidor irreversível da monoamina oxidase B), antioxidantes e fatores que inibem a apoptose, além de tratamentos operativos como estimulação cerebral profunda, seus efeitos colaterais também são de grande preocupação (WU; ZHENG; ZHANG, 2017).

O diagnóstico segue os critérios do *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank*, que se concentram exclusivamente nos SM descritos na tabela 1 (HUGHES *et al.*, 1992; SAUERBIER *et al.*, 2016).

Tabela 1: Critério de diagnóstico clínico segundo a UK Parkinson's Disease Society Brain Bank. O diagnóstico é feito seguindo três passos mostrados na tabela. MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. Crises oculogíricas: reação a certas drogas ou condições médicas caracterizadas por um desvio prolongado involuntário acima dos olhos. **Adaptado de HUGHES *et al.*, 1992.**

Critérios de diagnóstico clínico segundo a UK Parkinson's Disease Society Brain Bank	
1º Passo: Diagnóstico da síndrome Parkinsoniana	
Bradicinesia	
E no mínimo uma das seguintes características:	
Rigidez muscular	
Tremor em repouso de 4-6 Hz	
Instabilidade postural	
não sendo causada por disfunção visual primária, vestibular, cerebelar ou proprioceptiva	
2º Passo: Critério de exclusão para doença de Parkinson	
Histórico de acidente vascular cerebral com progressão para características parkinsonianas	
Histórico de traumatismo craniano	
Histórico de encefalite definitiva	
Crises oculogíricas	
Tratamento com neurolépticos no início dos sintomas	
Mais de um parente afetado	
Remissão sustentada	
Estritamente de características unilaterais, após 3 anos	
Paralisia supranuclear	
Sinal cerebelar	
Envolvimento autonômico severo inicial	
Demência grave inicial com perturbações da memória, e práxis	
Sinal de Babinski	
Presença de tumor cerebral ou hidrocefalia comunicante em tomografia computadorizada	
Resposta negativa para grandes doses de levodopa (excluídos se má absorção)	
Exposição a MPTP	
Continua	

Conclusão
3º Passo: Critério de suporte positivo prospectivo para doença de Parkinson (três ou mais são necessários para definir o diagnóstico de doença de Parkinson) - Começo unilateral - Presença de tremor em repouso - Desordem progressiva - Assimetria afetando lado de início mais persistente - Excelente resposta (70-100%) para levodopa - Coréia induzida por levodopa - Resposta levodopa por 5 anos ou mais - Curso clínico de 10 anos ou mais

A progressão da DP é caracterizada pelo agravamento das características motoras, que inicialmente poderiam ser gerenciadas com terapias sintomáticas. No entanto, à medida que a doença avança, surgem complicações relacionadas ao tratamento sintomático a longo prazo, incluindo flutuações motoras e não motoras, discinesia e psicose. Essas complicações relacionadas ao tratamento são desafios substanciais no manejo clínico do estágio avançado da DP. No estágio avançado, os recursos motores e não motores ao tratamento são proeminentes e incluem sintomas motores axiais, como instabilidade postural, congelamento de marcha, quedas, disfagia e disfunção da fala. Após cerca de anos de doença, até 80% dos pacientes com DP apresentam congelamento de marcha e quedas e até 50% relatam asfixia (KALIA; LANG, 2015).

Geralmente, dividimos a DP em diferentes subtipos motores, o subtipo tremor-dominante (TD - com uma relativa ausência de outros SM), o subtipo rígido acinético (RA - que inclui fenótipos descritos como uma síndrome rígida acinética e distúrbio da marcha com instabilidade postural) e o subtipo misto (M - com diversos sintomas motores e gravidade comparável aos demais subtipos). (KALIA; LANG, 2015; NICOLETTI *et al.*, 2016; SAUERBIER *et al.*, 2016; LIAN *et al.*, 2019). O curso e prognóstico da doença diferem entre os subtipos, o subtipo TD é frequentemente associado a uma taxa mais lenta de progressão, menos incapacidade funcional, menos SNM, mais chances de melhora ao usar levodopa e maiores taxas de

sobrevivência do que a DP no subtipo RA. Além disso, há a hipótese dos vários subtipos da DP ter etiologia e patogênese distintas (KALIA; LANG, 2015; LIAN *et al.*, 2019). Pacientes classificados como TD mostram diferentes padrões morfológicos de lesão cerebral em comparação com os classificados como RA. (NICOLETTI *et al.*, 2016). Na prática clínica recomenda-se aplicar juntamente com os critérios de diagnóstico do *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* uma avaliação clínica e motora clínica, como a escala de estadiamento de Hoehn & Yahr modificada (H&Y) (SAUERBIER *et al.*, 2016).

A escala de H&Y foi projetada originalmente para ser uma escala descritiva simplificada de estadiamento, que fornece uma estimativa geral da função clínica na DP, combinando déficits funcionais (incapacidade) e sinais objetivos (comprometimento) descritos na tabela 2 (GOETZ *et al.*, 2004). Essa escala faz parte da *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDR), e é amplamente utilizada para monitorar a progressão da doença e a eficácia do tratamento. A escala de H&Y surgiu a partir da necessidade de se obter um método uniforme para avaliar os sinais da DP (GOULART; PEREIRA, 2005). Sua modificação mais relevante foi introduzida em 1987 pelo Comitê de Desenvolvimento da UPDR, a qual incluiu estágios intermediários, para melhor enquadramento dos pacientes (MARTINEZ-MARTIN, 2010). A escala de H&Y é baseada no conceito duplo de que a gravidade da disfunção parkinsoniana geral está relacionada ao envolvimento motor bilateral e ao comprometimento do equilíbrio e da marcha (GOETZ *et al.*, 2004). O estadiamento fornece uma descrição geral da condição do paciente com DP, permitindo uma tradução clínica para níveis leves (estágios 1-2), moderados (estágios 2,5-3) e avançados (estágios 4-5). Como indicador da progressão da DP, a mudança no estágio de H&Y é uma característica importante no curso da doença e influencia seu manejo (MARTINEZ-MARTIN, 2010).

Tabela 2: Escala de Estadiamento de Hoehn e Yahr Modificada. Essa escala foi utilizada para determinar o estadiamento da DP, de acordo com a distribuição corporal dos sintomas e nível de incapacidade. Indivíduos no estágio 1 são considerados levemente comprometidos, enquanto no estágio 5 estão restritos a cadeira de rodas ou ao leito. **Adaptado de GOETZ *et al.*, 2004.**

Escala de Estadiamento de Hoehn e Yahr Modificada
• Estágio 0 = Nenhum sinal da doença. • Estágio 1 = Doença unilateral. • Estágio 1,5 = Envolvimento unilateral e axial. • Estágio 2 = Doença bilateral, sem comprometimento do equilíbrio. • Estágio 2,5 = Doença bilateral leve, com recuperação no teste de puxar o paciente pelas costas. • Estágio 3 = Doença bilateral leve a moderada; alguma instabilidade postural; fisicamente independente. • Estágio 4 = Incapacidade severa; ainda capaz de andar ou permanecer em pé sem assistência. • Estágio 5 = Restrito a cadeira de rodas ou ao leito. Necessita de ajuda.

Além da escala de H&Y, a escala de Schwab & England (SE), descrita na tabela 3, também faz parte da UPDR (GOULART; PEREIRA, 2005). Essa escala analisa o grau de dependência para realizar atividades do dia-a-dia dos Parkinsonianos (RAMAKER *et al.*, 2002).

Tabela 3: Escala de Atividades de Schwab e England. A escala foi aplicada para avaliar a capacidade funcional dos indivíduos com DP. É graduada em percentuais, em que 100% representa independência para realizar atividades diárias e 0% impotência total. **Adaptado de RAMAKER *et al.*, 2002.**

Escala de Atividades Diárias de Schwab e England
100% - Completamente independente. Capaz de realizar todas as atividades diárias sem lentidão, dificuldade ou comprometimento. Essencialmente normal. 90% - Completamente independente. Capaz de realizar todas as atividades diárias, com algum grau de lentidão, dificuldade e comprometimento. Pode demorar o dobro. Começando a ficar consciente da dificuldade. 80% - Completamente independente na maioria das atividades. Demora o dobro. Consciente da dificuldade e lentidão. 70% - Não completamente independente. Maior dificuldade em algumas atividades. Três a quatro vezes mais demorado em algumas. Pode gastar uma grande parte do dia com elas. 60% - Alguma dependência. Pode realizar a maioria das atividades, mas é excessivamente lento e faz muito esforço. Algumas impossíveis. 50% - Mais dependente. Metade das atividades com auxílio, mais lento. Dificuldade com tudo. 40% - Muito dependente. Participa de todas as atividades, mas poucas sozinho. Continua

Conclusão
30% - Com esforço consegue realizar poucas atividades, ou iniciá-las sozinho. Necessita de muito auxílio.
20% - Nada realiza só. Pode ser auxiliado em algumas atividades. Invalidez severa.
10% - Totalmente dependente, desamparado. Completamente inválido
0% - Ausência de controle de funções vegetativas como deglutição, micção e evacuação. Restrito ao leito.

1.1.6 α -sinucleína na Doença de Parkinson

Diversas doenças neurodegenerativas tem como característica agregados de proteínas mal enoveladas. O que difere um distúrbio neurodegenerativo de outro é o principal constituinte proteico desses agregados e quais regiões do cérebro são afetadas (MELKI, 2018). No caso da DP, o principal constituinte proteico é a proteína α -SIN que forma agregados encontrados nos CL e neurites de *Lewy*, marcas patológicas não apenas no cérebro de portadores de mutações, mas também na forma esporádica comum da DP (ANTONY *et al.*, 2013; ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017; MELKI, 2018). Os CL são encontrados nos neurônios dopaminérgicos restantes da SNpc e são descritos como inclusões eosinofílicas intraneuronais, redondas e com núcleo hialino, sempre positivas para α -SIN e ubiquitina. As neurites de *Lewy* referem-se a neurites anormais que contêm material granular e filamentos de α -SIN, semelhantes aos encontrados nos CL, sendo mais abundantes que os CL e se acumulam na amígdala e no estriado na maioria dos casos de DP (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017).

A α -SIN é uma proteína pequena, pré-sináptica, composta por 140 aminoácidos (LEE *et al.*, 2006; ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017; MELKI, 2018). Essa proteína é dividida em três regiões distintas: uma região N-terminal com carga positiva, altamente conservada com uma série hexamérica (KTKEGV) que se repete, uma região hidrofóbica central que tem alta propensão à agregar e um domínio C-terminal altamente ácido (GALLEGOS *et al.*, 2015; ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). O domínio hidrofóbico central é referido como região NAC (componente não- β -amilóide, do inglês: *Non-A β component*). Esta região amiloidogênica tem a capacidade de alterar a conformação de *random coil* para a estrutura em folha β (SERPELL *et al.*, 2000), e formar *A β -like* protofibrilas e fibrilas (HARPER *et al.*, 1999; ROCHA;

MIRANDA; SANDERS, 2017). Um esquema da morfologia da proteína α -SIN pode ser observado na figura 4.

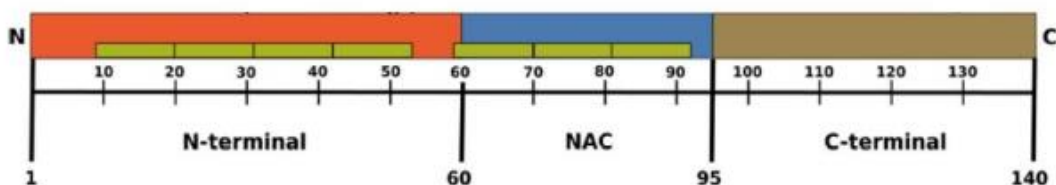


Figura 4: Alfa-sinucleína humana. Representação esquemática da estrutura da α -sinucleína humana, mostrando os três domínios distintos: N-terminal, componente não- β -amilóide (NAC) e C-terminal. Posição dos aminoácidos indicada na parte inferior. Caixas verdes representam as repetições hexaméricas KTGEGV. **Adaptado: GALLEGOS et al., 2015.**

A α -SIN é uma proteína neuronal abundante que se liga de forma reversível as membranas intracelulares (SAMUEL *et al.*, 2016). A α -SIN citosólica não enovelada, está em equilíbrio dinâmico com a forma associada à membrana que é parcialmente restringida em uma conformação α -helicoidal anfipática. Em neurônios saudáveis, a proteína tem uma localização predominante nos terminais pré-sinápticos e acredita-se que apresenta importância para a plasticidade sináptica e para o empacotamento vesicular (LEE *et al.*, 2006; ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017; MELKI, 2018). Esta proteína também está presente nas células não neuronais, como por exemplo, no fígado, músculo, linfócitos, neutrófilos e glóbulos vermelhos, e seus papéis funcionais fisiológicos não são totalmente elucidados (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

O fato da α -SIN ser patogênica do contexto da DP se dá devido ao encontro de um *link* genético associando essa proteína a doença. A mutação pontual no gene *snca* (A53T), demonstrou causar a DP autossômica dominante e diversas outras mutações pontuais (A30P, E46K, H50Q, G51D e A53E) mostraram desde então causar as formas familiares da DP e demência com corpos de *Lewy* (DLB, do inglês: *dementia with lewy bodies*) (BENGOA-VERGNIORY *et al.*, 2017). Além disso, a duplicação ou triplicação do gene *snca* tipo selvagem foi identificado como uma forma patogênica causal de uma forma familiar de DP e de alguns casos esporádicos (BENGOA-VERGNIORY *et al.*, 2017; BRAAK; TREDICI, 2017). Nesse caso, níveis elevados da proteína não mutada são suficientes para desencadear doenças acompanhadas pela formação dos CL (BRAAK; TREDICI, 2017). Além disso, foi demonstrado que a

triplicação do gene *snca* leva ao aumento de aproximadamente duas vezes a concentração de α -SIN não apenas no cérebro, mas também no sangue, em comparação com concentrações encontradas em indivíduos controles (LEE *et al.*, 2006).

A homeostase da α -SIN pode ser perturbada desde o início por mau funcionamento proteossomal e lisossômico que prejudicam a eliminação de proteínas danificadas ou desnaturadas ou por falta de chaperonas moleculares ou anticorpos naturais que protegem ou re-enovelam as proteínas (KOEHLER *et al.*, 2015). Uma das características da patologia da DP é a falha na liberação de proteínas pelo UPS e pela via autofagia-lisossomal. O comprometimento de uma dessas vias leva a agregação intracelular de α -SIN (YU *et al.*, 2020). O UPS é a principal via de degradação da α -SIN em condições fisiológicas normais. Essas maquinarias estão envolvidas na prevenção da agregação, re-enovelamento, desagregação e degradação de proteínas propensas a agregação (MELKI, 2018). A falha desses sistemas proteolíticos funcionalmente interconectados pode ser acompanhada de acúmulo de α -SIN agregada, que acaba interferindo na função celular adequada e contribuindo para a patogênese da DP (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017), e então, esses agregados são absorvidos pelos neurônios vizinhos, onde são capazes de semear α -SIN monomérica em agregados semelhantes a CL (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

A α -SIN pode ser alterada por diversas modificações-pós-traducionais (MPT) covalentes e truncamentos que podem afetar a transferência interneuronal e seu enovelamento, limitando sua flexibilidade, modificando a sua associação à membrana, formação de complexo e degradação (SAMUEL *et al.*, 2016). Tais MPT incluem dentre outras modificações, fosforilação e nitração, as quais parecem favorecer a oligomerização (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Níveis elevados de tensões oxidativas ou nitrativas têm sido implicados na toxicidade relacionada à α -SIN (CACABELOS, 2017). Curiosamente, as formas fosforiladas e nitradas da α -SIN estão presentes no cérebro de pacientes com DP (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Quase 90% da α -SIN nos CL é fosforilada na serina 129 (S129), mas apenas 5% da α -SIN no cérebro normal é modificada da mesma forma, sugerindo que a fosforilação pode influenciar na taxa de agregação e toxicidade ou na estabilidade geral dessa proteína (SAMUEL *et al.*, 2016; ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017). Estudos

posteriores mostram que a hiper fosforilação da α -SIN pode afetar sua solubilidade, propriedades de ligação à membrana e distribuição subcelular, favorecendo um estado patogênico (ROCHA; MIRANDA; SANDERS, 2017).

Uma questão considerada importante quando se fala da α -SIN é, qual poderia ser o ponto de partida para sua agregação. Alguns modelos propõem que uma gama de fatores estão envolvidos, incluindo alguns dos fatores de risco ambientais discutidos anteriormente, como os pesticidas e poluentes ambientais, bem como patógenos comuns (por exemplo, vírus, bactérias e fungos) que podem obter acesso a células contendo α -SIN inicialmente no sistema olfativo e intestino. Na maioria das vezes, esses agregados são manipulados por mecanismos celulares proteostáticos normais e não levam à disseminação da patologia de *Lewy*. Na presença simultânea de fatores facilitadores, por exemplo, envelhecimento, predisposição genética e inflamação periférica, o modelo propõe que os agregados de α -SIN podem passar pela depuração normal e causar sinucleinopatia no cérebro (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Alguns estudos sugerem que a forma oligomérica é a mais tóxica da proteína. Também foi demonstrada uma maior toxicidade para espécies oligoméricas ligadas a exossomos em comparação com os oligômeros livres, além da capacidade das fibrilas de α -SIN agirem como sementes exógenas e recrutarem α -SIN endógena para o corpo de inclusão, mesmo em células que não super expressavam a proteína (RIETDIJK *et al.*, 2017).

1.1.7 Hipóteses de propagação da α -sinucleína sugeridos para patologia da Doença de Parkinson

Até pouco tempo, pensava-se que a disseminação e transmissão de doenças por meio de agregados proteicos mal enovelados estava restrita à proteína priônica (PrP). Evidências sugerindo que a PrP agregada não é única e que outros agregados de proteínas são uma das principais características de diversas doenças neurodegenerativas, os quais podem se propagar e amplificar de maneira semelhante a um prion, veio primeiro do trabalho de Heiko Braak. Quanto ao PrP, esses patógenos foram inicialmente considerados de natureza viral (MELKI, 2018). A percepção de que a α -SIN mal enovelada exibe propriedades semelhantes a príons levou a atenção para o sistema proposto por Braak, que será abordado ainda nessa seção.

A hipótese de uma disseminação “príon” da α -SIN seria que uma forma patogênica (isto é, propensa a agregação) da proteína poderia se reunir em oligômeros e fibrilas, e transferir-se para outra célula nervosa, onde recrutaria a α -SIN endógena, e assim instalando a auto propagação gradual, mas praticamente indefinida, dos novos agregados de α -SIN insolúveis. (SAMUEL *et al.*, 2016; BRAAK; TREDICI, 2017; RIETDIJK *et al.*, 2017). Na figura 5 é possível observar a propagação tipo príon de agregados de α -SIN patogênicos. Onde agregados patogênicos da proteína são liberados pelos neurônios que estão sofrendo morte celular, sendo absorvidos por neurônios não afetados, astrócitos, oligodendrócitos, etc. Esses agregados também podem ser liberados de forma independente por neurônios afetados ou dentro de partículas membranosas (exossomos e ectossomos). Após a ligação aos parceiros proteicos na superfície das células não afetadas, os agregados são absorvidos por endocitose/micropinocitose ou por processos não convencionais. Esses agregados de α -SIN trafegam entre células afetadas e/ou não afetadas através de contatos celulares, no caso de sinapses por exemplo, ou estruturas membranosas, como nanotubos de tunelamento. Foi demonstrado que os agregados de α -SIN rompem o compartimento membranoso endolisossômico e atingem o citosol de células, onde podem crescer e multiplicar através do recrutamento da sua forma monomérica (MELK, 2018). Essa propagação tipo príon da proteína mal enovelada, seria como uma proteína infecciosa, juntamente com a propagação de toxicidade, formando um molde tóxico o qual semeia o mal enovelamento para a próxima proteína α -SIN, transformando a proteína anteriormente saudável em uma proteína tóxica, promovendo a formação dos CL (RIETDIJK *et al.*, 2017).

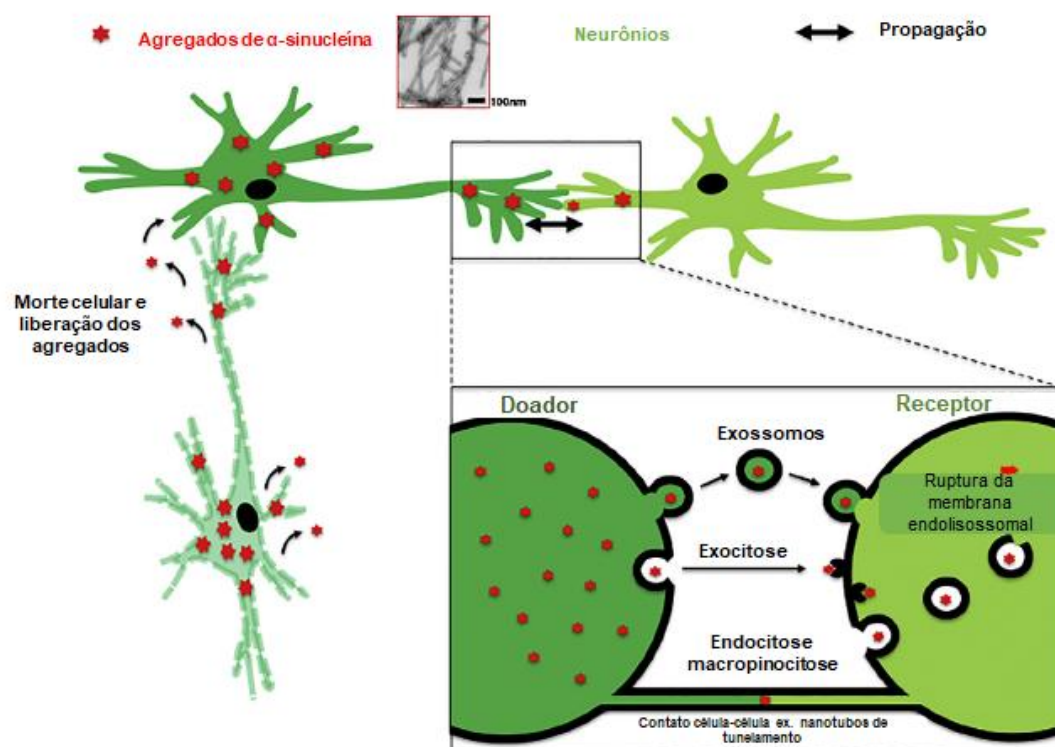


Figura 5: Propagação tipo prion de agregados de α -sinucleína patogênicas. Estrelas vermelhas: Agregados de α -sinucleína. Adaptado de MELKI, 2018.

Em uma série de estudos, Braak e colegas (2003) enfatizaram a patologia multifocal e multi neurotransmissora da DP, onde foi proposto um processo patológico de seis estágios da patologia de *Lewy* na DP, começando no sistema nervoso periférico (SNP) e afetando progressivamente o SNC (KALIA; LANG, 2015; TITOVA *et al.*, 2016; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019). Nesse modelo, regiões incluindo o bulbo olfativo e o sistema nervoso entérico (SNE), com suas conexões com a medula através do núcleo motor dorsal do nervo vago, atuam como um “canal” para a patologia em expansão talvez mediada por um processo semelhante a um prion (TITOVA *et al.*, 2016).

Braak e colegas sugeriram em seu estudo, como pode ser observado na figura 6, que nos primeiros estágios a patologia de *Lewy* se limita ao núcleo motor dorsal do nervo vago, localizado na medula oblonga (porção inferior do tronco encefálico, também conhecido como bulbo raquidiano), e a origem das fibras nervosas innervando o intestino e outros órgãos viscerais e o bulbo olfatório estritamente associado ao núcleo olfativo. Também foi sugerido que a patologia subsequente se espalha de maneira estereotipada pelas vias neurais do cérebro, não atingindo a SNpc até o

terceiro estágio neuropatológico e, eventualmente, envolvendo os hemisférios cerebrais no sexto estágio terminal (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2019).

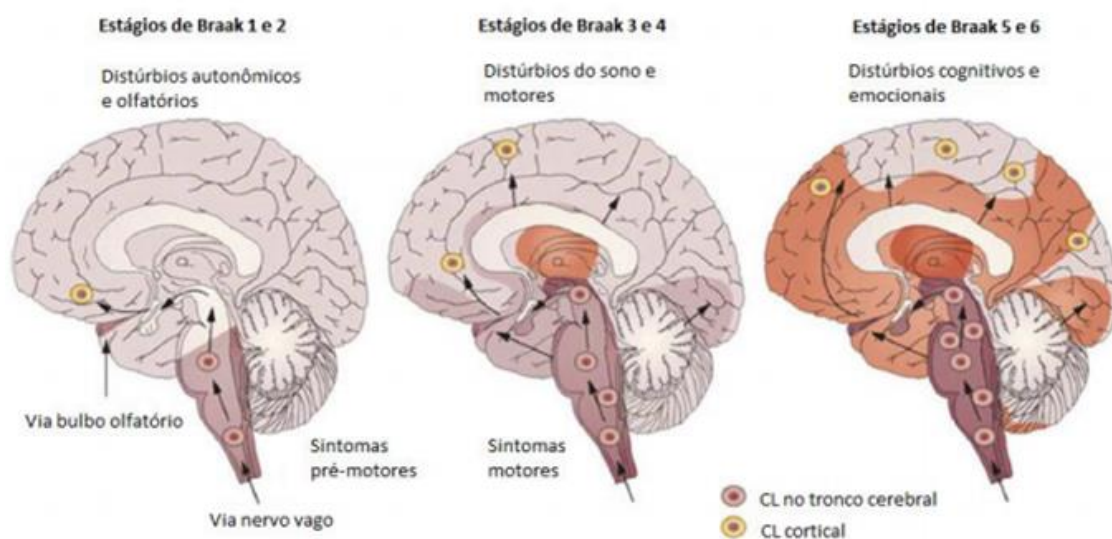


Figura 6: Propagação da α -sinucleína segundo Braak. Os estágios de Braak levam à hipótese de que a doença de Parkinson se inicia no bulbo olfativo e se dispersa para as regiões corticais. **Adaptado de DOTY, 2012.**

Ainda de acordo com o observado na figura 6, os estágios 1 e 2 podem corresponder ao início dos sintomas pré-motores. Esses achados apontam para a presença precoce de lesões nas estruturas olfativas. Dada a existência de técnicas avançadas para a mensuração confiável do desempenho olfativo, não parece inadequado o uso da deficiência de olfação como um dos marcadores para as fases iniciais da DP. Sinais de disfunções autonômicas também são relatados como precedendo os SM (KALIA; LANG, 2015). A destruição da SNpc segue nos estágios 3 e 4 e é exacerbada pela deterioração de núcleos talâmicos específicos, bem como áreas neocorticais nos estágios 5 e 6. O estágio 3 ocorre quando as características motoras estão presentes devido à deficiência de dopamina nigroestriatal. A SNpc é composta de forma heterogênea, o que significa que seus constituintes neuronais exibem características regionalmente variáveis. Deve-se enfatizar que a substância negra não é a primeira estrutura no cérebro a desenvolver lesões relacionadas à DP, com isso, a ausência de lesões nessa região, não descarta a presença de lesões em outras partes do cérebro. O envolvimento das principais áreas neocorticais permite a

distinção dos dois estágios finais, 5 e 6. No estágio 5, a patologia chega do mesocórtex temporal às áreas adjacentes de associação sensorial de alta ordem do neocórtex maduro. No estágio 6, a patologia cortical se estende ainda mais para as áreas de associações sensoriais de primeira ordem, campos motores, dentre outros (BRAAK *et al.*, 2003; KALIA; LANG, 2015). Esse modelo permite que as populações dopaminérgicas e não dopaminérgicas sejam afetadas diferencialmente permitindo *insights* sobre os SM e SNM (TITOVA *et al.*, 2016). Estudos recentes concomitantemente as análises feitas por Braak e colegas demonstram que a sinucleinopatia ocorre no SNE em um estágio muito inicial da DP, mesmo antes do envolvimento do SNC. O nervo vago recebe projeções do SNE e da medula espinal e é proposto como a conexão entre o SNP e o SNC (GELDERS *et al.*, 2018). Evidências clínicas, mencionadas anteriormente, sobre manifestações gastrointestinais frequentes que precedem os SM em pacientes com DP (MULAK, 2018) e presença de CL nos neurônios do trato olfativo e no SNE (RIETDIJK *et al.*, 2017), apoiam a hipótese de que o processo patológico na DP possa se espalhar do intestino para o cérebro como observado no esquema da figura 7 (MULAK, 2018). A presença de CL no SNE está positivamente correlacionada com constipação e problemas motores em pacientes com DP. Também existem evidências clínicas de que o CL nas regiões nasal e gastrointestinal precede potencialmente o diagnóstico da doença, levando os pacientes a se queixarem do trato digestivo e problemas de olfato durante os estágios iniciais (RIETDIJK *et al.*, 2017). O impacto da microbiota intestinal no eixo intestino-cérebro envolve mecanismos imunológicos, neuroendócrinos e neurais diretos através do nervo vago (MULAK, 2018).

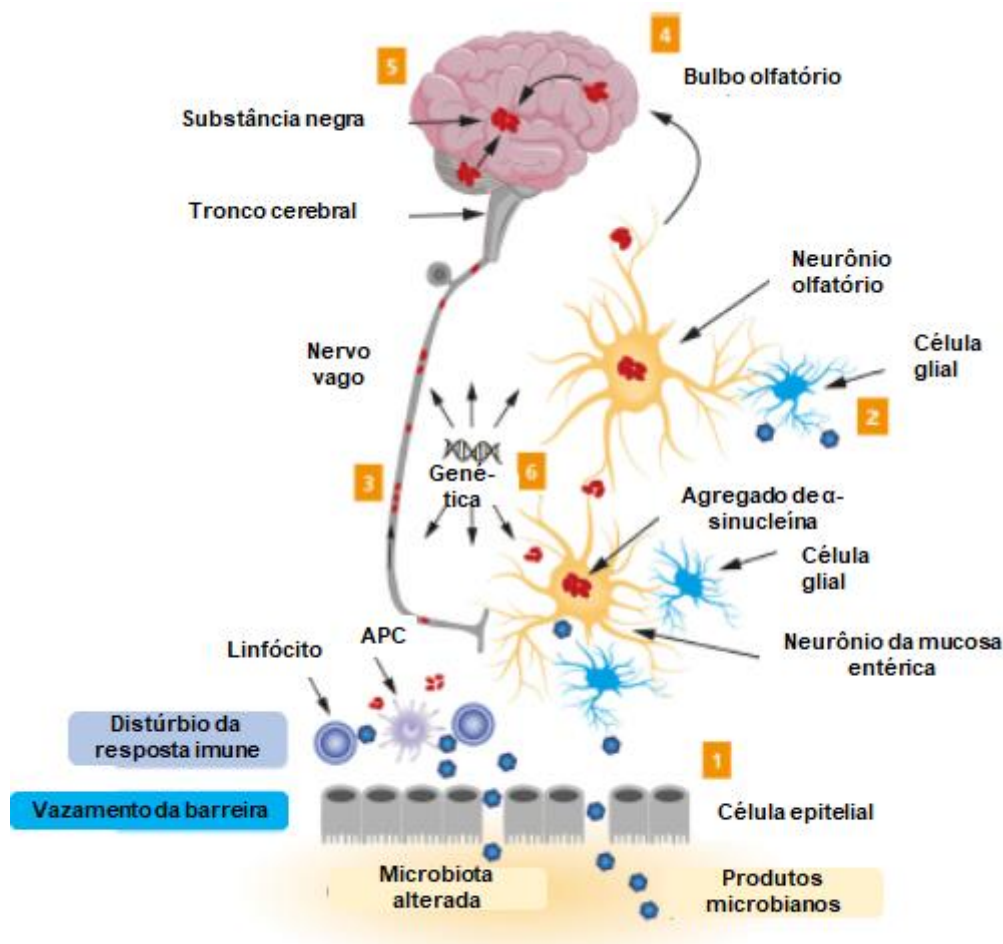


Figura 7: Representação esquemática da hipótese de Braak na Doença de Parkinson. Os produtos microbianos entram em contato com neurônios olfativos e/ou entéricos, que desencadeiam a agregação de α -sinucleína (1 e 2). A α -sinucleína agregada se espalha em direção ao sistema nervoso central através do bulbo olfativo e do nervo vago (3 e 4). Eventualmente, a α -sinucleína agregada chega à substância negra (5). É provável que fatores genéticos contribuam para a Doença de Parkinson, mas o mecanismo exato ainda precisa ser elucidado (6). APC: células apresentadoras de antígeno (do inglês: antigen-presenting cell). **Adaptado de RIETDIJK et al., 2017.**

Foi sugerido que a transmissão de célula a célula do tipo prion através do nervo vago pode exigir um envolvimento do sistema imunológico. A presença de patógenos exógenos no trato gastrointestinal pode levar à ativação de células imunes como macrófagos, neutrófilos e outras, as quais secretam mediadores inflamatórios, induzindo estresse oxidativo, afetando os tecidos circundantes e, conseqüentemente, iniciando a sinucleinopatia no SNE. Esses eventos podem influenciar a função intestinal, como evidenciado pelos sintomas pré-motores (GELDERS et al., 2018).

O estadiamento baseado na presença e distribuição da patologia de Lewy, e não na perda de células nervosas, também faz sentido por outro motivo: A

disseminação eficaz de neurônio a neurônio de α -SIN pressupõe a existência de um número suficiente de células nervosas intactas e circuitos intactos. A transferência de neurônio para neurônio de agregados patogênicos de α -SIN foi demonstrada pela primeira vez em humanos quando os enxertos neurais fetais desenvolveram a patologia de *Lewy* mais de uma década após a cirurgia e quando modelos experimentais tornaram possível detectar mecanismos de semeadura de agregados de α -SIN (BRAAK; TREDICI, 2017). Um grande subconjunto de 51-83% dos pacientes com DP seguem o estadiamento de Braak (RIETDIJK *et al.*, 2017).

1.2 EXOSSOMOS

1.2.1 Biogênese e função dos exossomos

Nas últimas décadas, a pesquisa sobre vesículas extracelulares (VEs) secretadas por células expandiu-se exponencialmente (PINHEIRO *et al.*, 2018). As VEs surgiram como um terceiro mecanismo de comunicação intercelular que envolve a transferência de vesículas, incluindo exossomos, entre os diferentes tipos de células. (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TOFARIS, 2017). Como seu conteúdo representa os estados intracelulares em transição, essas vesículas atraíram considerável atenção como biomarcadores em potencial do microambiente inacessível do cérebro vivo (TOFARIS, 2017).

As VEs são compostas por uma bicamada lipídica contendo proteínas transmembranares e proteínas anexas solúveis, além de conter diferentes tipos de RNA, incluindo RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA) e até metabólitos e lipídeos, esses conteúdos são coletivamente denominados conteúdos de carga, que são entregues as células circundantes ou transportados para locais distais (TOFARIS, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018, PORRO *et al.*, 2019). Estes mRNAs associados às VEs podem ser traduzidos em proteínas pelas células alvos. (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). No entanto, cada tipo de VEs possui uma assinatura detalhada da biomolécula. Dependendo de sua origem, tais vesículas carregam moléculas de superfície que permitem a captação por células receptoras, uma vez anexadas a uma célula alvo. As VEs induzem sinalização por meio da interação receptor-ligante ou são internalizadas por endocitose e/ou fagocitose ou até se fundem à membrana da célula alvo para entregar seu conteúdo ao citosol, modificando assim, o estado fisiológico da célula receptora (TOFARIS, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018; PORRO *et al.*, 2019).

Três classes principais de VEs secretadas pelas células foram relatadas e caracterizadas, com base em sua origem, mecanismos de liberação e propriedades: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos, ilustrados na figura 8 (PINHEIRO *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2020).

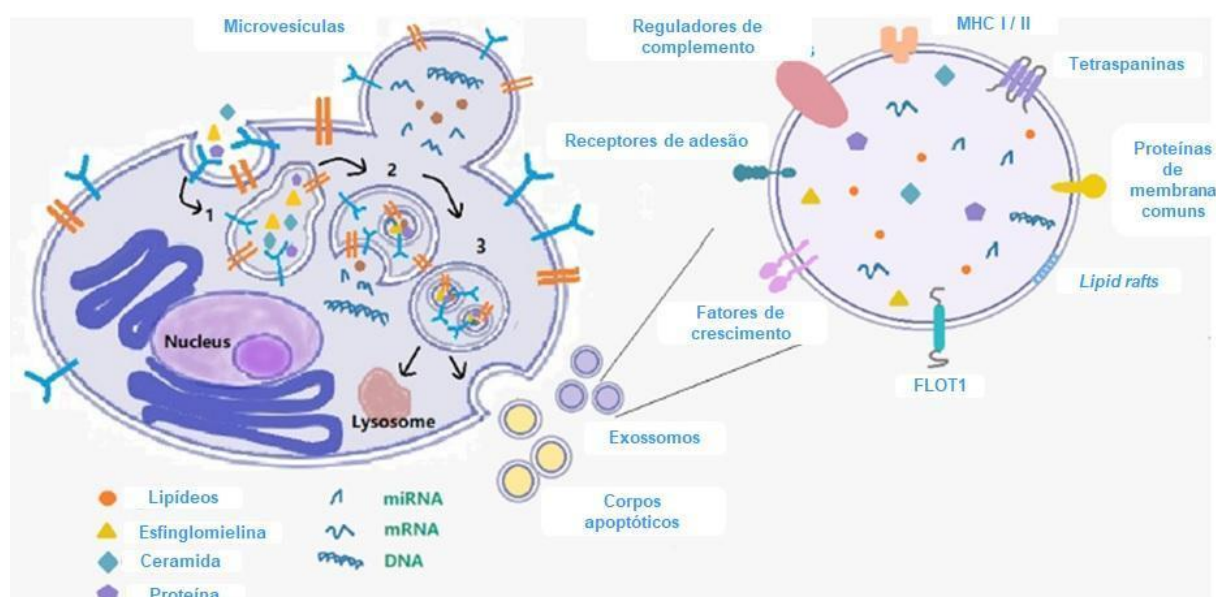


Figura 8: Tipos de vesículas extracelulares. Essa figura ilustra os três tipos de vesículas extracelulares: microvesículas, corpos apoptóticos e exossomos. Além dos tipos de carga dos exossomos e seus marcadores de superfície. **Adaptado de LIU *et al.*, 2019.**

Embora a liberação de corpos apoptóticos durante a apoptose seja conhecida há muito tempo, o fato de que células perfeitamente saudáveis também liberarem vesículas de sua membrana plasmática ainda não era conhecido (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Os corpos apoptóticos são definidos como VEs que variam de 50 nm a 5 µm de diâmetro, contendo DNA, RNA e proteínas. Durante a apoptose, o conteúdo liberado dos corpos apoptóticos é entregue aos macrófagos, resultando na absorção de células (YUAN; LI, 2019). As microvesículas são originárias da membrana plasmática e seu tamanho pode variar de 50 nm a 1 µm. Os exossomos são menores, com tamanhos na faixa de 40 a 120 nm, são liberados como consequência da fusão dos corpos multivesiculares (CMV) com a membrana plasmática (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; TOFARIS, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; YUAN; LI, 2019; YU *et al.*, 2020). Essas nanovesículas são secretadas

pela maioria dos tipos de células, incluindo neurônios, oligodendrócitos, células renais, células sanguíneas, células tumorais, dentre outros tipos celulares, desempenhando um papel fundamental na comunicação intercelular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020). Os exossomos são secretados no espaço intercelular, mas podem ser isolados de vários fluidos biológicos como saliva, líquido amniótico, plasma, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), leite materno, dentre outros, sugerindo um papel na troca de informações biológicas através de compartimentos corporais distantes (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; LIU *et al.*, 2019; YUAN; LI, 2019; YU *et al.*, 2020).

Estudos proteômicos iniciais mostram que os exossomos contêm um subconjunto específico de proteínas celulares, encontradas especificamente na superfície de todas essas nanovesículas, servindo como marcadores desse tipo de vesícula (TOFARIS, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Tais proteínas incluem as proteínas relacionadas a maturação endossômica e ao endossomo (como por exemplo, anexinas e flotilina), algumas proteínas que estão envolvidas na biogênese do CMV (por exemplo Alix e TGS101), além de integrinas, tetraspaninas, as proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90). Por outro lado, proteínas do núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi não são detectáveis nos exossomos, servindo como marcadores negativos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; TOFARIS, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Essas observações destacam a especificidade da formação dessas vesículas e mostram representação de um compartimento subcelular específico e não fragmentos celulares aleatórios (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Em comparação com a membrana plasmática os exossomos de uma variedade de células são altamente enriquecidos em *lipis-rafts*, incluindo colesterol, esfingolípídeos, ceramida e glicelfosfolípídeos contendo cadeias longas e saturadas de ácidos graxos. Os ácidos graxos nos exossomos são principalmente saturados ou monoinsaturados. Juntamente com a alta concentração de colesterol, isso pode ser responsável pela segregação lateral desses lipídeos em vesículas intraluminais (VILs)/exossomos durante a sua formação nos CMV (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

A biogênese dos exossomos está esquematizada na figura 9. A biogênese começa com a via do tráfico endossômico e se conecta intimamente com o sistema endossômico. O sistema endossômico contém vesículas endocíticas primárias, endossomos iniciais e CMV. O processo de formação dos exossomos pode ser dividido em três estágios e seu mecanismo molecular pode ser dividido em dois tipos, de acordo com a dependência ou independência do complexo de classificação endossômica necessário para o transporte (ESCRT, do inglês: *endosomal sorting complexes required for transport*) (YUAN; LI, 2019). A formação dos endossomos iniciais é identificada como o primeiro passo. As proteínas na membrana plasmática são transferidas para a superfície dos endossomos iniciais. Os endossomos iniciais estão intimamente localizados na membrana celular, e seus papéis funcionais são classificar as cargas para reciclagem de volta a membrana plasmática, seguido do direcionamento para o compartimento de reciclagem endocítica (positivo para Rab11) ou transferindo para os endossomos tardios, identificados por Rab7 e Rab9 (YUAN; LI, 2019). Os endossomos iniciais serão convertidos em endossomos tardios quando sua composição proteica mudar, após a maturação, começa o segundo estágio, onde a membrana limitante pode invaginar e formar as VILs, que se acumulam no lúmen do endossoma tardio. Em seguida, as vesículas VILs sequestram moléculas citoplasmáticas, levando ao acúmulo no endossoma tardio, que pode conter muitas VILs, originando a formação dos CMV (LIU *et al.*, 2019; YUAN; LI, 2019). A terceira etapa contém duas vias para o conteúdo nos CMV. Uma via leva a fusão subsequente do CMV com a membrana plasmática liberando as VILs no espaço extracelular, gerando exossomos, e a segunda, transporta uma parte dos CMV para a via de degradação lisossômica, onde os exossomos são removidos como detritos e reciclados para uso celular. Os mecanismos que definem para qual das duas vias direcionará os exossomos ainda são desconhecidos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; WU; ZHENG; ZHANG, 2017; LIU *et al.*, 2019; YUAN; LI, 2019; YU *et al.*, 2020). Comparados aos CMV degradativos (pobres em colesterol), os CMV enriquecidos com colesterol se fundem preferencialmente a membrana plasmática (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; YUAN; LI, 2019).

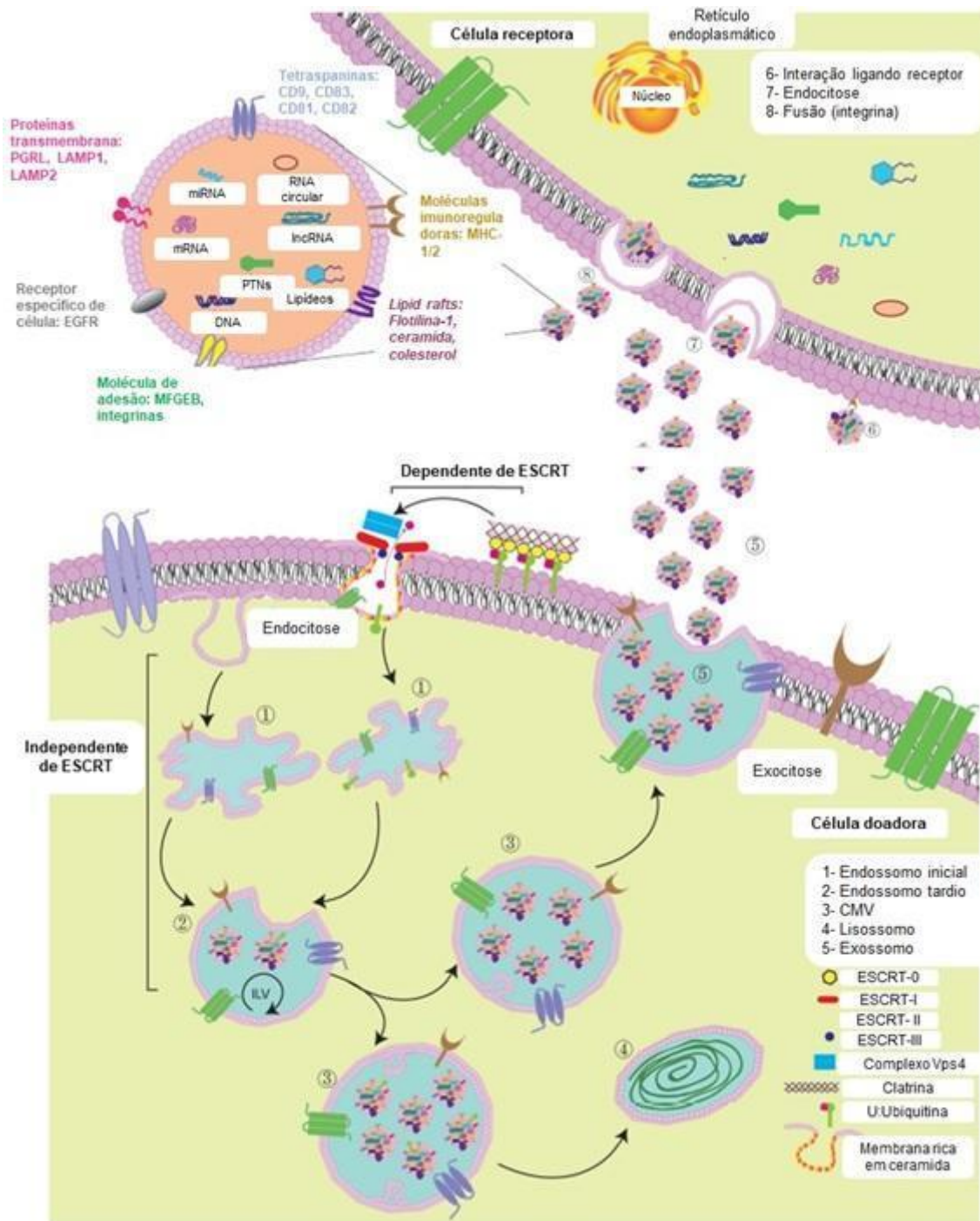


Figura 9: Representação esquemática da biogênese dos exossomos. O mecanismo molecular para biogênese do exossomo pode ser dividido em dois processos dependendo da (in)dependência da resposta do ESCRT. Quatro complexos de proteínas ESCRT distintos foram identificados na via clássica dependente da ESCRT, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II e ESCRT-III. Duas vias na geração de CMV auxiliam na liberação e no tráfego: (1) degradação lisossômica; (2) fusão com a membrana plasmática e liberação de exossomos. **Adaptado de YUAN; LI, 2019.**

Os exossomos secretados podem ser degradados por fagócitos ou podem se comunicar com células vizinhas para induzir condições patológicas (YU *et al.*, 2020).

As funções das VEs nos processos fisiológicos e patológicos dependem da capacidade de interação com as células receptoras para fornecer seu conteúdo de proteínas, lipídios e RNAs. As bases celulares e moleculares para o direcionamento de VEs ainda são indeterminadas, mas vários aspectos dependentes e condicionais das células-alvo estão começando a surgir. É provável que a especificidade da célula-alvo para ligação de exossomos (ou outras VEs) seja determinada por moléculas de adesão como integrinas, presentes nas VEs. Após a ligação às células receptoras, as VEs podem permanecer associadas de forma estável à membrana plasmática ou dissociar-se, fundir-se diretamente à membrana plasmática ou ser direcionados aos lisossomos para degradação. Quando endocitados, as VEs podem subsequentemente fundir-se com a membrana delimitadora endossômica ou ser direcionados aos lisossomos para degradação (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

1.2.2 Exossomos na Doença de Parkinson

O papel que os exossomos podem desempenhar no SNC é objeto de investigação ativa (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014). Estudos recentes sugeriram a importância dos exossomos para a comunicação célula-célula no SNC. A maioria dos tipos celulares presentes no SNC podem liberar exossomos, incluindo neurônios e células da glia (microglia e astrócitos). Estas nanovesículas estão envolvidas de maneira proeminente na transmissão de sinais recíprocos entre a glia e os neurônios, como pode ser observado a figura 10 (YUAN; LI, 2019). Verificou-se que os exossomos estão associados a uma variedade de proteínas, como a proteína precursora de β -amilóide e α -SIN, que estão envolvidas na DA e DP, respectivamente (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; PORRO *et al.*, 2019). Acredita-se que estas vesículas participem na disseminação da patogênese através da interação com as células receptoras (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), propondo que os exossomos desempenham um papel importante na progressão da DP (YU *et al.*, 2020).

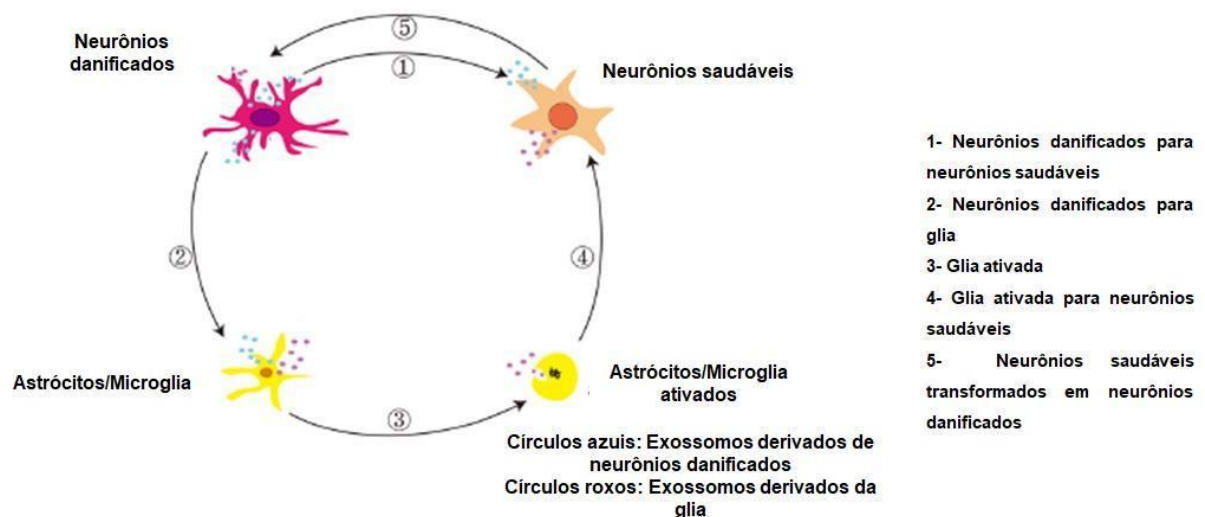


Figura 10: Exossomos como mediadores da comunicação intercelular neurônio-glia na progressão da doença de Parkinson. Exossomos que transportam monômeros α -SIN, oligômeros e fibrilas liberados por neurônios danificados, que depois se espalham para neurônios saudáveis, astrócitos e microglia. Exossomos da glia contendo α -SIN e fatores inflamatórios causam a propagação da resposta inflamatória, o que exacerba as disfunções neuronais e a progressão da DP. **Adaptado de YUAN; LI, 2019**

As VEs, tais como os exossomos, podem estar envolvidos na disseminação de proteínas tóxicas no sistema nervoso em diversas doenças neurológicas como a DP, DA, doenças de príons e esclerose múltipla. Em todas essas doenças os exossomos estão envolvidos na disseminação de proteínas tóxicas que são mutadas ou mal enoveladas, no caso da DP de agregados anormais de α -SIN, entre neurônios, microglia e astrócitos (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; YUAN; LI, 2019). O transporte defeituoso de proteínas para endossomos e lisossomos emergiu como uma via celular potencialmente unificadora na patogênese da DP. A liberação de exossomos está intimamente relacionada ao transporte intracelular de proteínas ao longo da via endossomal-lisossômica, de modo que, suas funções biológicas possam estar relacionadas e ser relevantes para a DP (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; TOFARIS, 2017; LIU *et al.*, 2019). Tais vesículas também podem representar meios de eliminação de proteínas mal enoveladas que contribuem para a progressão de distúrbios neurodegenerativos (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; TOFARIS, 2017).

Devido ao papel central da α -SIN na causa da DP, sua potencial associação com exossomos atraiu atenção (TOFARIS, 2017). Estudos demonstraram que estes podem transmitir a forma tóxica da proteína α -SIN entre as células e induzir apoptose,

que está envolvida no desenvolvimento patológico da doença (LIU *et al.*, 2019). Estudos iniciais em células SH-SY5Y que expressam α -SIN mostram que as formas monoméricas e oligoméricas da α -SIN são liberadas tanto livres no meio quanto dentro de exossomos, em um processo dependente de cálcio. Estudos subsequentes confirmaram esses achados e mostraram que a liberação exossômica de α -SIN e a captação pelas células receptoras aumentaram quando o lisossomo foi inibido. Quando comparados aos oligômeros livres de α -SIN derivados de meios condicionados, os oligômeros associados ao exossomo eram mais propensos a serem absorvidos pelas células receptoras e causar toxicidade (TOFARIS, 2017). Os exossomos isolados de células SH-SY5Y que super expressam α -SIN poderiam transferir essa proteína para células SH-SY5Y normais. Além de ter sido demonstrado que exossomos contendo α -SIN podem promover a morte celular das células neuronais receptoras, fornecendo suporte para a hipótese de que a propagação de α -SIN entre neurônios facilita a progressão da DP (YU *et al.*, 2020).

Alguns experimentos mostraram que a α -SIN é liberada diretamente no ambiente extracelular ou empacotada em exossomos pela via do endossomo (YU *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos subjacentes para a incorporação da α -SIN nos exossomos ou sua liberação, ainda não são claros (TOFARIS, 2017; PORRO *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020).

É amplamente aceito que os oligômeros α -SIN causam morte neuronal. A α -SIN nos exossomos pode não apenas servir como um biomarcador da DP, mas formas patogênicas da α -SIN podem se espalhar por exossomos e contribuir para a progressão e disseminação da patologia no cérebro (TOFARIS, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Danzer *et al.* (2012) identificaram a presença de α -SIN oligomérica nos exossomos e demonstraram que quando há uma associação dessa proteína às nanovesículas, é mais fácil ocorrer a absorção pelas células receptoras, sendo mais tóxicos do que quando esta é encontrada livre. Stuenkel *et al.* (2016) relataram que exossomos do LCR de pacientes com DP e DLB poderiam induzir a formação de oligômeros de α -SIN. Todos esses achados provam que a α -SIN exossômica está intimamente envolvida na transmissão de oligômeros entre as células (WU; ZHENG; ZHANG, 2017; YU *et al.*, 2020). Também foi relatado que certos lipídios exossômicos podem promover a agregação de proteínas amilóides neuronais como por exemplo a α -SIN, sugerindo que os exossomos não são apenas transportadores passivos de

moléculas, mas que, por meio de seu conteúdo lipídico e ambiente ácido, ativam alguns de seus componentes (TOFARIS, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017; PORRO *et al.*, 2019).

Além disso, células microgliais e monócitos isolados de camundongos adultos, mas não velhos, exibiu fagocitose aumentada de oligômeros de α -SIN exossômicos e diminuição da secreção de TNF α e citocinas pró-inflamatórias. Esses estudos sugerem que as células microgliais no cérebro vindo de idosos, podem potencializar a neurodegeneração por serem incapazes de eliminar os oligômeros de α -SIN ou por acelerar a secreção de exossomos que contém formas tóxicas de α -SIN ou outros fatores patogênicos. Todos esses achados sugerem que exossomos secretados por células da microglia ativas, podem ser fatores vitais na neurodegeneração e progressão da DP (TOFARIS, 2017; WU; ZHENG; ZHANG, 2017; YUAN; LI, 2019; YU *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que os astrócitos são responsáveis pela integridade estrutural sináptica, transmissão sináptica e função neuronal. Recentemente, foi relatado que os astrócitos no SNC secretam exossomos (YUAN; LI, 2019). Em resposta à neuroinflamação no SNC, os astrócitos liberam citocinas, quimiocinas e outras substâncias neurotóxicas. Os exossomos derivados da astrocitose aceleram os fatores inflamatórios a serem transmitidos entre a glia e os neurônios. Esse fato leva a dedução de que os exossomos também podem desempenhar um papel crucial na propagação patológica de α -SIN nas células neuronais e gliais (YUAN; LI, 2019).

Outros genes que são mutados na DP familiar foram ligados à biologia do exossomo. O *Irrk2* atua em diversos pontos da via endossômica e, portanto, tem potencial de modular a biogênese do exossomo (TSILIONI; PANAGIOTIDOU; THEOHARIDES, 2014; TOFARIS, 2017).

A constatação de que o tráfico endossômico é uma via crítica na DP forneceu uma justificativa científica para a relevância da biologia do exossomo para a patogênese da doença. A liberação exossômica de α -SIN representa menos de 2% do total dessa proteína extracelular, mas uma compreensão detalhada de como é empacotada nessas nanovesículas para liberação pode estar fundamentalmente ligada à defesa celular contra formas tóxicas da proteína ou mecanismos autônomos não celulares de progressão da doença (TOFARIS, 2017). Embora os níveis de α -SIN

contidos nos exossomos sejam baixos, estudos recentes sugerem que os exossomos fornecem um ambiente ideal para sua agregação e potencialmente promovem a propagação da patologia da DP (YU *et al.*, 2020).

1.2.3 Potencial terapêutico dos exossomos

Embora a DP possa ser diagnosticada em bases clínicas com certo grau de confiabilidade, a predição de sua taxa de progressão é o que mais importa para os pacientes, juntamente com o desenvolvimento de novas terapias para tratamento da doença. Atualmente, isso é desafiador, pois a doença é clinicamente heterogênea, sem um marcador objetivo e de incapacidade cumulativa (TOFARIS, 2017). O desenvolvimento de um método para diagnosticar a DP precocemente seria um avanço importante. Análises anteriores de constituintes de VEs relacionados à doença (incluindo exossomos) isolados do sangue ou do LCR de pacientes com DP sugerem que as VEs podem ser biomarcadores eficientes para essa patologia (YU *et al.*, 2020).

A maioria dos medicamentos, ~98%, testados para doenças do SNC falhou durante os ensaios clínicos, porque não podem atravessar a barreira hematoencefálica (BBB, do inglês: *blood-brain barrier*) (WU; ZHENG; ZHANG, 2017; YU *et al.*, 2020). No entanto, os exossomos são veículos importantes do SNC porque, graças ao seu tamanho nanométrico, podem viajar através das células endoteliais da BBB por endocitose mediada por receptores, liberando seu conteúdo nos fluidos biológicos (PORRO *et al.*, 2019). Sendo assim, essas nanovesículas se tornam possíveis de serem utilizadas como veículos de administração de medicamentos, uma vez que podem sofrer modificações em sua carga, gerando um tratamento personalizado e com isso diminuindo a progressão da doença e promovendo a regeneração neuronal. Essa sua capacidade de atravessar a BBB e a baixa atividade imunogênica tornam os exossomos sistemas ideais de administração de medicamentos para o tratamento da DP, como mostra a figura 11 (YU *et al.*, 2020).

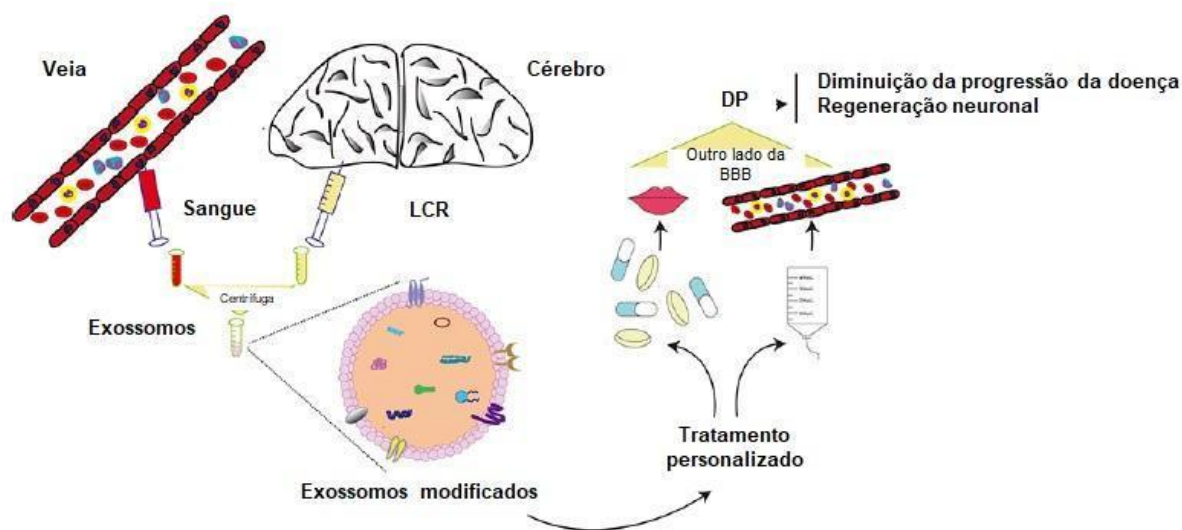


Figura 11: Exossomos como potenciais ferramentas biológicas para diagnóstico e terapia. LCR: líquido cefalorraquidiano; DP: Doença de Parkinson; BBB: barreira hematoencefálica. **Adaptado de YUAN; LI, 2019.**

Inúmeras propriedades dos exossomos os tornam excelentes candidatos para transportar biomarcadores. Suas cargas de proteínas e ácidos nucleicos específicos para o tipo de célula provavelmente refletem o núcleo dos processos intracelulares patogênicos. Além disso, os exossomos podem atravessar a BBB, de modo que os exossomos derivados do SNC possam atingir o sangue periférico e fornecer biomarcadores de proteínas de doenças do SNC (WU; ZHENG; ZHANG, 2017). Evidências crescentes foram comprovadas de que os exossomos isolados de vários tipos celulares podem ser modificados para atingir neurônios específicos e regiões específicas do cérebro, podendo ser terapêuticos para a DP e muitas outras doenças neurodegenerativas. Embora as vantagens dos exossomos para a terapia sejam aparentes, existem algumas limitações. Primeiro, não se pode obter os exossomos puros usando a tecnologia atual e, portanto, é importante construir um sistema mínimo de entrega de exossomos para conter as moléculas terapêuticas e pouco mais. Além disso, os efeitos adversos do uso de diferentes fontes de exossomos devem ser examinados (YU *et al.*, 2020).

1.3 PROTEÔMICA

A análise global de proteínas, consideradas as principais entidades funcionais da célula, sem dúvida, forma o principal nível de informação necessário para entender como as células funcionam (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Coletivamente, as proteínas catalisam e controlam essencialmente todos os processos celulares formando uma entidade altamente estruturada e conhecida como proteoma, cujas proteínas constituintes desempenham suas funções no tempo e locais específicos da célula, em associação física ou funcional com outras proteínas ou biomoléculas. Nas espécies, as proteínas constituem cerca de 50% da massa seca de uma célula. A extensa rede de proteoma da célula se adapta dinamicamente a perturbações externas ou internas e assim, define o estado funcional da célula e determina seus fenótipos (AEBERSOLD; MANN, 2016).

O termo proteômica surgiu pela primeira vez em 1995 e foi definido como a caracterização em larga escala de todo o complemento proteico de uma linhagem celular, tecido ou organismo (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Como área pós-genômica, a proteômica engloba esforços para identificar e quantificar todas as proteínas de um proteoma, incluindo expressão, localização celular, MPT e rotatividade em função do tempo, espaço e tipo de célula (ZHANG *et al.*, 2013). Hoje, são encontradas duas definições do termo. A primeira é a mais clássica, restringindo a análise em larga escala de produtos gênicos a estudos envolvendo apenas proteína. Já a segunda definição é mais abrangente, combina estudos de proteínas com análises que possuem uma leitura genética. No entanto, o objetivo da proteômica permanece o mesmo, obter uma visão global e integrada da biologia, estudando todas as proteínas de uma célula em vez de cada uma individualmente, além de criar um mapa tridimensional da célula, indicando onde as proteínas estão localizadas. Esses objetivos ambiciosos certamente exigirão o envolvimento de muitas áreas diferentes, como biologia molecular, bioquímica e bioinformática. (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

O progresso da proteômica foi impulsionado pelo desenvolvimento de novas tecnologias para separação de peptídeos/proteínas, análise por espectrometria de massa (EM), marcação de isótopos para quantificação e análise de dados de bioinformática (ZHANG *et al.*, 2013). As tecnologias dirigidas à proteômica poderiam desenvolver biomarcadores a partir de soro, plasma e LCR, os quais podem ser mais confiáveis, reproduzíveis e exigir menos esforço. (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). Além de ajudar a responder perguntas específicas, a proteômica pode transformar todos os experimentos em um estudo de descoberta global, que permite a detecção de novas e inesperadas moléculas e conexões, fornecendo novas informações biológicas. Esses desenvolvimentos são suportados por ferramentas de bioinformática acessíveis

ao público para processar e interpretar as grandes quantidades de dados que são geradas em projetos complexos (AEBERSOLD; MANN, 2016).

A EM emergiu como uma ferramenta essencial para análise em larga escala (ZHANG *et al.*, 2013). É uma ferramenta poderosa para análise molecular, evidenciada em parte pelo número crescente de pesquisadores que a utilizam para identificação, quantificação e caracterização de proteínas (AEBERSOLD; MANN, 2016; SAVARYN; TOBY; KELLEHER, 2016). Atualmente é estimado que proteínas na faixa femtomolar possam ser identificadas e quantificadas. Como a EM é uma técnica mais sensível, sendo capaz de tolerar misturas proteicas e passível de operações de alto rendimento, substituiu essencialmente o sequenciamento de Edman, se tornando a ferramenta de identificação de proteínas preferencialmente utilizada (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). As razões subjacentes ao sucesso da EM em proteômica incluem sua especificidade inerente de identificação, a natureza do fluxo de trabalho de proteômica e seu potencial para extrema sensibilidade que, em princípio, se estende ao íon único (AEBERSOLD; MANN, 2016).

A capacidade da identificação confiável de qualquer componente do proteoma, é um requisito tanto para investigações mecanicistas orientadas por hipóteses, quanto para estudos em grande escala das ciências ômicas (AEBERSOLD; MANN, 2016). Nas últimas décadas houve avanços significativos na resolução, precisão da massa, sensibilidade e taxa de varredura dos espectrômetros de massa para a análise de proteínas (ZHANG *et al.*, 2013). Um mapa abrangente e confiável de proteoma baseado em EM também é um pré-requisito para o desenvolvimento de técnicas direcionadas, bem como para estratégias de aquisição independente de dados (DIA, do inglês: *data independent acquisition*). Essa estratégia depende de informações de bibliotecas espectrais de alta qualidade pré-existent. Outro método utilizado para descoberta de proteoma é a aquisição dependente de dados (DDA, do inglês: *data dependent acquisition*). Além de uma rebuscada especificidade, outras vantagens da proteômica baseada em DDA incluem a imparcialidade e a ausência de hipóteses, isto é, o pesquisador não precisa conhecer a identidade das proteínas esperadas com antecedência. Nesse tipo de experimento, todas as proteínas podem ser interrogadas de uma só vez (AEBERSOLD; MANN, 2016).

A proteômica denominada *bottom-up*, na qual os peptídeos são gerados pela digestão enzimática de proteínas, tem sido experimental e computacionalmente mais tratável, sendo o fluxo de trabalho proteômico mais difundido, quando comparada a abordagem *top down* a qual utiliza as proteínas intactas. Uma das abordagens principais e muito utilizada na proteômica *bottom-up* é a abordagem *shotgun* por meio do DDA, com o objetivo de obter uma cobertura imparcial e completa do proteoma. A proteômica *shotgun* fornece medição indireta de proteínas intactas através de peptídeos derivados da digestão proteolítica de proteínas intactas (ZHANG *et al.*, 2013; AEBERSOLD; MANN, 2016).

Tendo em vista o grande volume de dados que um estudo proteômico pode gerar, estratégias de análise e interpretação dos dados são extremamente importantes. Neste sentido abordagens que utilizam a interpretação do ponto de vista da biologia de sistemas são as mais recomendadas. Atualmente existem diversos softwares que auxiliam a interpretação de um grande número de proteínas identificando vias de sinalizações comuns e com isso atribuindo um papel funcional ao resultado (PANIS *et al.*, 2016).

1.3.1 Proteômica na Doença de Parkinson

A proteômica tem sido constantemente usada para validar os fatos conhecidos e desvendar os desconhecidos das etiologias da DP. A compreensão da patogênese da DP tem sido difícil porque ela é possivelmente uma proteopatia cerebral adquirida ou determinada geneticamente, envolvendo um processamento anormal de diferentes proteínas neuronais, em vez de proteínas individuais (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). A pesquisa baseada em proteômica pode levar a um diagnóstico pré sintomático da DP, identificação de fatores de risco e novos alvos terapêuticos para os quais a intervenção farmacológica pode ser direcionada (SRIVASTAVA *et al.*, 2010).

As abordagens proteômicas usando sangue, LCR e cérebro humano *pós-mortem* e de animais, indicaram uma série de proteínas exibidas diferencialmente, além de pistas de eventos bioquímicos e moleculares que levam ao fenótipo da DP. No entanto, os perfis do proteoma ainda não podem substituir os exames clínicos convencionais para diagnóstico da doença (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). Uma das aplicações mais desafiadoras da proteômica é a identificação de biomarcadores de proteínas com valor prognóstico ou diagnóstico (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013).

O desenvolvimento de biomarcadores válidos, reprodutíveis e confiáveis a partir de proteínas, os quais podem ajudar os médicos a diagnosticar a DP em estágio inicial, antes do aparecimento dos SM, para um tratamento precoce, ainda são requisitos dos pesquisadores que trabalham nessa área (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). A expressão das proteínas no sangue muda rapidamente em resposta a qualquer fator externo ou condição patológica, e o sangue também contém proteínas derivadas de outros tecidos. Isso faz do sangue uma fonte rica de informações para analisar a progressão da doença (DIXIT; MEHTA; SINGH, 2019).

Após o sequenciamento do genoma humano e o início dos programas de proteoma humano, era esperado que o desenvolvimento de biomarcadores adequados para um diagnóstico precoce da DP se tornasse mais fácil, empregando estratégias proteômicas. Tanto abordagens proteômicas tradicionais que incluem a identificação de proteínas individuais e MPT por eletroforese em gel e EM, quanto às abordagens modernas, incluindo o perfil de proteínas séricas usando cromatografia e técnicas de EM, juntamente com técnicas de imuno-histoquímica, bioquímica e outras técnicas moleculares que têm sido amplamente utilizadas para desenvolver um biomarcador adequado para DP (SRIVASTAVA *et al.*, 2010).

É esperado que alterações do proteoma forneçam meios para monitorar a progressão ou gravidade da doença, no entanto, devido à complexa relação de genótipos e fenótipos em distúrbios neurodegenerativos, o desenvolvimento de biomarcadores úteis ainda está em fase preliminar (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). Além da alta sensibilidade e variação analítica mínima, a identificação de proteínas pela EM fornece várias vantagens técnicas para fluxos de trabalho dos biomarcadores de proteínas (CILENTO *et al.*, 2019). Espera-se que um biomarcador proteico ajude na detecção precoce da DP, essencialmente para um melhor gerenciamento e tratamento da doença (SRIVASTAVA *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população brasileira manteve a tendência de envelhecimento dos últimos anos e ganhou 4,8 milhões de idosos desde 2012, superando a marca dos 30,2 milhões em 2017, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua - Características dos Moradores e Domicílios, divulgada em 2018. Em 2012, a população com 60 anos

ou mais era de 25,4 milhões. Os 4,8 milhões de novos idosos em cinco anos correspondem a um crescimento de 18% desse grupo etário, que tem se tornado cada vez mais representativo no Brasil. Dados do CENSO 2010 divulgados pelo IBGE mostram que a população na faixa etária acima de 65 anos deve alcançar a margem de 58,4 milhões (26,7% do total), em 2060. No período, a expectativa média de vida do brasileiro deve aumentar dos atuais 75 anos para 81 anos (IBGE, 2010). Além disso, o Relatório Mundial de Saúde e Envelhecimento, afirma que o número de pessoas com mais de 60 anos no país deverá crescer muito mais rápido do que a média internacional (OMS, 2015). Devido ao envelhecimento populacional, podemos prever que haverá um aumento no número de casos de DP, uma vez que já foi descrito que a doença afeta mais de 1% dos indivíduos acima de 60 anos e cerca de 4% das pessoas com mais de 80 anos.

O diagnóstico clínico da DP é baseado na presença de características motoras parkinsonianas. Os critérios da *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* são usados na clínica e em pesquisas clínicas para diagnosticar a DP (KALIA; LANG, 2015). É difícil alcançar um diagnóstico definitivo de DP, especialmente em seu estágio inicial, quando a precisão não excede 26% para indivíduos não tratados ou claramente não responsivos e 53% para indivíduos responsivos à medicação (HORVATH *et al.*, 2017). Em geral, o diagnóstico depende da presença de perda neuronal de moderada a grave na SNpc com presença de CL nos neurônios sobreviventes da região e nenhuma evidência patológica de outras doenças que produzem Parkinsonismo (KALIA; LANG, 2015). No entanto, há uma longa latência entre o início dos processos patológicos e o aparecimento dos sintomas clínicos. Estes últimos geralmente não são evidentes até que cerca de 60-80% dos neurônios dopaminérgicos tenham sido perdidos, deixando opções muito limitadas para intervenções terapêuticas (HORVATH *et al.*, 2017). Estratégias para desenvolver biomarcadores para o diagnóstico da doença de Parkinson estão sendo investigadas, especialmente para permitir o diagnóstico no início do curso da doença, mesmo antes do início dos SM (KALIA; LANG, 2015). Além disso, 5 a 10% dos casos, a DP se apresenta como uma forma Mendeliana com herança autossômica dominante ou recessiva (ANTONY *et al.*, 2013; PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017), o que significa dizer que de 90 a 95% dos casos a DP é classificada como esporádica, ou seja, sem uma causa definida. Mais de 40 anos após sua introdução, a escala de H&Y

modificada continua sendo uma referência para classificação de pacientes em relação às fases evolutivas e gravidade global da DP (MARTINEZ-MARTIN, 2010).

Os biomarcadores para rastrear a progressão da doença são indicadores úteis das condições patológicas ou dos efeitos de intervenções terapêuticas na progressão da doença. O LCR é uma fonte geral de biomarcadores para distúrbios neurodegenerativos, porém não é ideal para o monitoramento de rotina devido à natureza invasiva da coleta de amostras por punção lombar. Portanto, os biomarcadores baseados no sangue são preferíveis para monitorar a progressão da DP em comparação com os baseados no LCR. Entretanto, atualmente não há biomarcadores sanguíneos conhecidos que se relacionam com o avanço da patologia (KITAMURA *et al.*, 2018). Em particular, a detecção de biomarcadores de proteínas no plasma sanguíneo como uma janela para o estado fisiológico de um indivíduo tem sido um objetivo importante da ciência de proteínas desde antes do advento da EM. A experiência adquirida na última década na análise de proteoma plasmático por EM demonstrou os enormes desafios dessa abordagem, que estão enraizados na complexidade do proteoma plasmático, em sua variabilidade inerente em uma população e na prevalência de fatores que afetam sua composição, incluindo idade, sexo e estilo de vida. No entanto, diversos estudos apontaram técnicas de EM altamente reprodutíveis que podem ser aplicadas às proteínas plasmáticas (AEBERSOLD; MANN, 2016).

Uma infinidade de diferentes tipos de informações não pode ser obtida apenas a partir do estudo de genes. Por exemplo, proteínas, não genes, são responsáveis pelos fenótipos das células. É impossível elucidar mecanismos de doenças, envelhecimento e efeitos do meio ambiente apenas estudando o genoma. Somente através do estudo de proteínas e modificações proteicas podem ser caracterizadas e os alvos dos medicamentos identificados (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). A proteômica é suficientemente avançada para garantir a caracterização profunda de uma grande variedade de sistemas biológicos. Juntamente com outras informações importantes, isso permite que os números ou concentrações de cópias de proteínas sejam determinados em uma escala de proteoma, o que ajuda a melhorar a compreensão da biologia subjacente (AEBERSOLD; MANN, 2016).

Em busca da caracterização do proteoma de uma determinada célula ou organismo, deve-se lembrar que o proteoma é dinâmico, ele refletirá o ambiente imediato em que é estudado. Em resposta a pistas internas ou externas, as proteínas podem ser modificadas por MPT, sofrer translocações dentro da célula ou ser sintetizadas/degradadas. Assim, o exame do proteoma de uma célula é como obter uma imagem instantânea do ambiente da proteína a qualquer momento. (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Por exemplo, os exossomos, os quais podem mediar a comunicação intercelular e refletir alterações intracelulares que ocorrem em resposta a condições patológicas, portanto, são potencialmente uma fonte eficaz de biomarcadores para rastrear o desenvolvimento da DP (KITAMURA *et al.*, 2018).

Esta dissertação de mestrado pretende caracterizar e comparar o conteúdo proteico dos exossomos isolado do plasma sanguíneo de paciente com DP, classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y em leve, moderado e avançado, e controles saudáveis, fazendo uso da abordagem proteômica *shotgun*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o perfil proteômico de exossomos enriquecidos de plasma de sangue periférico de pacientes com Doença de Parkinson.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e comparar o perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson de acordo com a escala de estadiamento Hoehn & Yahr e de controles saudáveis.
- Realizar análise funcional por bioinformática dos perfis de expressão proteica exclusivos dos pacientes com Doença de Parkinson para cada classificação de estadiamento clínico comparado com controles saudáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 13/09/2016 e a versão aprovada recebeu o número 58601716.4.0000.5257. Todo material foi coletado após a

assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos pacientes com DP e controles saudáveis (Anexo 1).

A coleta das amostras foi realizada pela responsável médica do projeto Dra Ana Lucia Zuma de Rosso, da Divisão de Neurologia do Setor de Distúrbios do Movimento do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCF-UFRJ) na presença das alunas do grupo da Prof^a. Dra Luciana Pizzatti (LABMOPS-IQ-UFRJ) parceiro do projeto, seguindo as recomendações de coleta de amostras de sangue da Sociedade Brasileira de patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML), utilizando dois tubos EDTA. Concomitantemente foi realizado a coleta dos dados sociodemográficos do prontuário médico com o auxílio de um formulário desenvolvido pela Dra Ana (Anexo 2). O formulário continha perguntas como hábitos da rotina do paciente, histórico familiar, data de início da doença, sinais e sintomas, medicamentos e comorbidades associadas. O estudo tem caráter observacional transversal do ponto de vista da análise proteômica.

Foram considerados elegíveis para o estudo os pacientes com DP que apresentavam, inicialmente, bradicinesia e pelo menos um dos sintomas característicos da doença (tremor em repouso, rigidez muscular e instabilidade postural), com distribuição inicialmente assimétrica da doença e boa resposta à levodopa. Os controles recrutados foram cuidadosamente elegidos, sendo indivíduos saudáveis, parceiros ou acompanhantes dos pacientes, com idades pareadas, que coabitam o mesmo espaço e realizam aproximadamente a mesma dieta. Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentem parentesco em qualquer nível com os pacientes, comorbidades declaradas (diabetes e/ou indivíduos com histórico de alterações vasculares) (Anexo 3).

Os pacientes foram classificados, pela medica responsável, de acordo com escala de estadiamento de H&Y modificada em leve (estágios 1, 1,5 ou 2), moderado (estágios 2,5 ou 3) ou avançado (estágios 4 ou 5), escala de SE a qual leva em conta a realização das atividades diárias (0-100%), de acordo com a idade de início da doença em precoce (<50 anos), normal (entre 50-65 anos) ou tardio (>65 anos) e pelos fenótipos clínicos em tremulantes (tremor como sintoma predominante), rígido-acinético (rigidez como sintoma predominante) ou misto (tremor e rigidez como sintomas predominante). Foram excluídos do estudo

pacientes com diagnóstico de DP genética e os que não possuíam informações necessárias para as classificações. Na tabela 4 pode ser observado o total de amostras e a coorte utilizada no estudo.

Tabela 4: Total de amostras utilizadas no trabalho e divisão em grupos clínicos de acordo com a escala de estadiamento de H&Y. Em vermelho, os pacientes classificados como grau leve (estágios 1; 1,5 ou 2), em laranja os pacientes classificados como grau moderado (estágios 2,5 ou 3), em verde os pacientes classificados em grau avançado (estágios 4 ou 5).

Coorte de pacientes selecionados para análise proteômica	
Classificação Clínica	Total de pacientes
LEVE - Estágios 1; 1,5 ou 2	44 Pacientes
MODERADO - Estágios 2,5 ou 3	41 Pacientes
AVANÇADO - Estágios 4 ou 5	12 Pacientes
Total de amostras utilizada no estudo: 97	

Devido ao grande volume de dados gerados no tipo de abordagem do presente trabalho e ao custo por amostra relacionado a análises individuais, utilizamos o desenho experimental analisando as amostras em *pool* de acordo com a classificação clínica. Portanto foram preparados *pools* denominados: *pool* controle, *pool* leve, *pool* moderado e *pool* avançado. A estratégia de *pool* baseada no agrupamento por fenótipos clínicos já foi extensamente utilizada por nosso grupo em outras publicações (PIZZATTI *et al.*, 2012; PANIS *et al.*, 2014; 2016; 2017; CORRÊA *et al.*, 2017; PIRES *et al.*, 2019).

4.2 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

4.2.1 Enriquecimento e caracterização dos exossomos

As amostras dos pacientes com DP e controles saudáveis após serem coletadas, foram centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm (rotação por minuto) para separar a porção plasmática da porção celular. O plasma foi retirado e armazenado em eppendorfs de 2 mL com adição de 12 µL de inibidor de protease

(*Complete™ Protease Inhibitor Cocktail*, - Roche) e armazenado a -80°C até sua utilização.

O enriquecimento dos exossomos do plasma utilizando o reagente *ExoQuick™* (System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, EUA) deu-se segundo instruções do fabricante. Inicialmente, 500 µL de plasma foram incubados por 30 minutos a 4°C com 120 µL de *ExoQuick™*. As amostras foram centrifugadas a 1500 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e então, foi adicionado aos *pellets* 200 µL de tampão de extração de proteínas (500 mM; MgCl₂ 5 mM; Hepes 100 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; Glicerol 35%) juntamente com 12 µL de inibidor de protease seguido do rompimento das vesículas através de técnicas manuais e vórtex. Os exossomos foram rompidos por congelamento e descongelamento após armazenamento a -80°C *overnight*. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 30 minutos a 4°C, o extrato proteico (sobrenadante) foi separado em um novo *ependorf* e foi feita a quantificação de proteínas no fluorímetro *Qubit* (Invitrogen), utilizando o kit de quantificação de proteínas *Qubit™ Protein Assay Kit* (Life technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Os extratos proteicos foram armazenados a -30°C.

A caracterização dos exossomos estudados na presente dissertação foi realizada pela aluna Letícia Giacomini em sua tese de doutorado. (Letícia Giacomini. Caracterização do Conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. 2018. Tese (Doutorado em Pós-graduação em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro). O mesmo procedimento de enriquecimento de exossomos foi utilizado. A integridade, composição e tamanho das vesículas foram analisados por *western blot* para proteínas marcadoras de exossomos (Alix, TSG101) e para marcadores negativos (Calnexina); microscopia eletrônica para análise da integridade das vesículas e análise do tráfego de nanopartículas (Zeta View) para confirmação do tamanho das vesículas.

4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.3.1 Preparo das amostras e digestão de proteínas

Mil microgramas de extrato proteico dos exossomos enriquecidos foram concentradas 16x em colunas *Amicon® Ultra 2 mL Centrifugal filters ultracel 3k* (Millipore) com 2 mL de tampão bicarbonato de amônio [50 mM], por centrifugação

a 4000 g por 45 minutos a 16°C. O concentrado de proteínas foi armazenado a -30°C.

Os extratos proteicos foram digeridos, em solução, 100 µg de proteínas de cada *pool* de amostra, de acordo com o descrito por PIZZATTI *et al.*, 2012. Todas as incubações desta etapa foram realizadas no *thermomixer* (*ThermoMixer® C - Eppendorf*). Para desnaturação de proteínas, foi utilizado 25 µL do reagente *RapiGest SF Surfactant* (*Waters*), as amostras foram incubadas a 80°C por 15 minutos. Para a etapa de redução das pontes dissulfeto das proteínas, foi utilizado 10 mM em cada amostra do reagente *Dithiothreitol* - DTT (*GE Healthcare*), as amostras foram incubadas por 30 minutos a 60°C. A alquilação foi realizada adicionando 40 mM em cada amostra de Iodoacetamida - IAA (*BioRad*), as amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A tripsinização foi realizada com tripsina (*Promega*) em uma proporção 1:100. Foi adicionado 1 µg de tripsina em cada amostra (50 µL de tripsina a 20 ng/µL). A digestão foi realizada no *thermomixer* (*ThermoMixer® C - Eppendorf*) a 37°C *overnight* a 1000 rpm. Após 21h de digestão a reação foi interrompida com a adição de ácido trifluoroacético (TFA, do inglês: *Trifluoroacetic acid*) 1%. As amostras foram então vortexadas e tiveram o pH checado (aproximadamente pH 2 ou 3). Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos para retirada do *RapiGest* precipitado antes da limpeza. O sobrenadante foi separado em um novo *eppendorf*.

4.3.2 Purificação e secagem dos peptídeos trípticos

Mini-colunas de fase reversa (C18) foram usadas para remoção de impurezas e concentração dos peptídeos. As colunas foram montadas inserindo um disco de membrana C18 no interior de uma ponteira de volume de 200 µL sem barreira (uma coluna por amostra). Posteriormente, adicionou-se 10 µL de resina *POROS™ R2* (*Thermo*). A resina foi adicionada diluída em acetonitrila (ACN) 100%, retirando e eliminando o líquido por pressão com o auxílio de uma seringa adaptada e acoplada a ponteira.

A seguir, foi adicionado 100 µL de ACN 100% para retirada de bolhas manualmente, eliminando o líquido com o auxílio da seringa acoplada. Após foi adicionado 100 µL de TFA 0,1% para equilibrar a coluna, eliminando o líquido

novamente com o auxílio da seringa. Esta etapa foi repetida três vezes. Posteriormente o volume total da amostra digerida foi aplicado na coluna, com o auxílio da seringa a amostra é eluída pela coluna, porém não é descartada, para que possa ser aplicada mais uma vez a fim de garantir a aderência dos peptídeos da amostra. Cada amostra é eluída duas vezes em suas respectivas colunas. A fração não ligada à coluna foi então armazenada a -30°C. Foram feitas três lavagens novamente com 100 µL de TFA 0,1%, descartando o líquido com auxílio da seringa. Os peptídeos de interesse aderidos à coluna foram eluídos em um novo *ependorf* em duas etapas finais. A primeira eluição foi realizada com 100µL de uma solução composta por 50% ACN/0,1% TFA. A segunda eluição foi realizada com 100µL de outra solução agora composta por 70% ACN/0,1% TFA, eluindo os peptídeos mais hidrofóbicos.

Após a finalização da etapa de limpeza, todas as amostras foram submetidas à secagem na centrífuga a vácuo (*Savant® DNA Speed Vac® Model 120 - Thermo*). Quando secas, as amostras foram retiradas da centrífuga e armazenadas a -30°C até o momento de sua injeção no espectrômetro de massas.

4.3.3 Espectrômetro de Massas

A análise por espectrometria de massas foi realizada no espectrômetro de massas de alta resolução *Q-Exactive plus (Thermo)* com analisador *Orbitrap*, acoplado ao cromatógrafo *easy-nanoLC1000 (Thermo)*.

As amostras foram ressuspensas em ácido fórmico (FA, do inglês: formic acid) 0,1% na concentração final de 2 µg/µL e foi injetado 8µg de amostra por injeção, utilizando triplicatas técnicas. As amostras foram analisadas em um sistema *easy-nanoLC1000* acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução *Q-Exactive Plus*. Os peptídeos foram carregados na coluna *trap (Easy column C18, 2cm x 100µm i. d. x 5µm, 120Å)* e a separação foi feita na coluna analítica (*ReprosilPur C18, 25cm x 75µm i. d. x 3µm*) utilizando os solventes A (5% ACN / 0,1% FA) e B (95% ACN / 0,1% FA), com um fluxo constante de 300 nL/min. O gradiente teve duração total de 180 minutos, tendo início com 2% de B aumentando gradualmente para 20% durante 133 minutos. O segundo passo teve duração de 5 minutos e aumento de 40% a 95% de B. Por fim o gradiente se manteve estável por 8 minutos, até completar os 180 minutos do método. A fonte de ionização utilizada

foi o *eletrospray* com voltagem de 2,7kV a 250°C. O *Q-Exactive Plus* foi operado no modo DDA com exclusão de 45 ms e espectros *full scan* adquiridos pelo analisador *Orbitrap* com resolução de 70.000, seguido da fragmentação dos 15 íons mais intensos com energia de colisão, *higher energy collision dissociation* (HCD), de 30 no *Orbitrap* e resolução de 17.500 em *scans MS/MS*. Espécies com carga +1 foram excluídas da análise MS/MS.

4.3.4 Análise dos dados brutos e identificação das proteínas

Ao fim da corrida os dados brutos de todas as replicatas das amostras de controles e de pacientes foram extraídos do espectrômetro de massas e inseridos no *software Proteome Discoverer 2.1* (*Thermo*) para o processamento dos dados brutos e identificação das proteínas.

O banco de dados de sequências humanas utilizados foi o *Uniprot*. A identificação de peptídeos foi realizada com o algoritmo *Sequest HT* confrontando com o banco de dados *Uniprot-Human_proteome* (versão jul 2019). As buscas foram realizadas com tolerância de massa de peptídeos de 10 ppm, tolerância de MS/MS de 0,05 Da, clivagem específica de tripsina, 2 locais de clivagem perdida no máximo (do inglês: *missed cleavages*). A carbamidometilação da cisteína foi incluída como modificação fixa e a oxidação de metionina e acetilação N-terminal da proteína como modificações dinâmicas. As taxas de *false discovery rate* (FDR) foram obtidas utilizando o *Percolator node*, selecionando identificações com *q-valor* igual ou inferior a 0,01. Como parâmetros para identificação dos peptídeos foi considerado o tamanho mínimo de seis aminoácidos por peptídeo, um peptídeo único por proteína com FDR de 0,01.

As proteínas identificadas após o processamento foram analisadas quali e quantitativamente. Para as análises qualitativas foi utilizada a ferramenta *Venn Diagram* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) e para análise quantitativa foi utilizado o *software Perseus Computational Platform*.

4.4 ANÁLISES IN SILICO

A análise *in silico* foi realizada utilizando o *software FunRich: Functional Enrichment Analysis Tool* (PATHAN *et al.*, 2015, 2017).

A base de dados utilizada na plataforma *FunRich* é uma compilação de diversos bancos de dados de anotação de proteínas e dados funcionais curados. Dentro desta base de dados para as anotações de ontologia (do inglês: *Gene ontology*) incluindo processos biológicos, componentes celulares e função molecular. É uma ferramenta de *software* autônoma usada principalmente para enriquecimento funcional e análise de redes de interação de genes e proteínas. Foram utilizadas as bases de dados: *Human Protein Reference Database (HPRD)*; *Entrez Gene* e *Uniprot*.

Para as interações proteína-proteína: *BioGRID*; *Intact* e *Human proteinpedia*. As informações de locação de expressão das proteínas foram obtidas a partir das bases *HumaN Protein Atlas*; *Human Proteome Browser*; *Human Proteome Map* e *Proteomics DB*.

4.5 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (HIDROPERÓXIDOS) PLASMÁTICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PLASMÁTICA (TRAP)

Foi realizada a avaliação da lipoperoxidação plasmática de alta sensibilidade induzida por terc-butil hidroperóxido. O composto terc-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil. Nas membranas biológicas, estes radicais atacam os lipídeos gerando lipoperóxidos os quais podem reagir com outros lipídeos, oxidando-os. Desta forma, o terc-butil inicia uma reação de lipoperoxidação em cadeia com outros lipídeos que pode ser detectada através da emissão fótons ocorrida durante a formação dos lipoperóxidos. Além disso, quanto mais antioxidantes a amostra testada apresentar, maior será o tempo para que esta reação seja iniciada (GONZALEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

Para avaliação da lipoperoxidação plasmática, foi adicionado 125 μL de amostra em 865 μL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 em NaCl 0,9% com incubação a 37° C por 5 minutos. Para disparo da reação adicionou-se uma alíquota de 10 μL da solução de t-butil. A leitura da reação foi realizada em luminômetro TD 20/20 *Turner Designers®* no protocolo de uma leitura por segundo, durante 60 minutos, onde foi avaliada a curva de emissão de fótons qualitativa, mensurada em unidades relativas de luz (URL).

O método TRAP (do inglês: *Total Radical Antioxidant Parameter*) avalia a capacidade antioxidante total de misturas complexas, podendo monitorar as condições antioxidantes do plasma humano. Esse ensaio é frequentemente utilizado para medidas da capacidade antioxidante no soro ou plasma, pois mensura antioxidantes não-enzimáticos (como, glutatona, ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno) (MAGALHÃES *et al.*, 2008). O ensaio se baseia na seguinte equação $C_{\text{Trolox}} = (X \cdot T_{\text{Trolox}}) / T_{\text{Plasma}}$ onde, C_{Trolox} corresponde a concentração de trolox; T_{Trolox} é a fase de inibição (fase *lag*) do trolox; X é a capacidade antioxidante do plasma em equivalente de trolox e T_{Plasma} é a fase de inibição na presença do plasma (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A TRAP foi determinada utilizando 2,2'azobis (ABAP) como gerador de radicais livres e luminol como amplificador da detecção da emissão de fótons por quimiluminescência, de acordo com o descrito por PANIS *et al.*, 2012.

As amostras de plasma sanguíneo dos três grupos de pacientes (leve, moderado e avançado) e do grupo controle saudável, foram diluídas em tampão glicina 0,1 M, pH 8,6 a 37°C. Como padrão de antioxidante de referência foi empregado vitamina E hidrossolúvel (Trolox) (2,5 mg em 5 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6 a 37°C).

Uma alíquota de 50 μ L de cada amostra foi adicionada à 1 mL de tampão glicina 0,1 M pH 8,6 e a 70 μ L da solução de luminol (3,98 mg em 250 μ L de KOH 1 M adicionados a 10 mL de tampão glicina, diluído 1:10 no momento da reação).

Em seguida adicionou-se 70 μ L da solução ABAP e iniciou-se a leitura da reação em luminômetro (*Glomax, Promega*). Os resultados obtidos da curva de inibição da oxidação do ABAP pela amostra e padrão em unidades relativas de luz foram analisados no *software OriginLab 9.0* e expressos em nM de Trolox.

As análises descritas foram conduzidas em triplicatas e as comparações estatísticas realizadas pelo teste ANOVA, utilizando teste *Tukey* como *pos-hoc*. Os dados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média.

Foi considerado significativo $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no *software GraphPad Prism* versão 7.0 (*GRAPHPAD software, San Diego, CA*), utilizando a ferramenta *on-line quick calcs*

(<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) para detecção de indivíduos *outliers*.

O índice de estresse foi calculado a partir da divisão do valor obtido na integral da lipoperoxidação pelo valor do tempo de indução do TRAP, e é expresso em unidades arbitrárias. Também pode ser obtido através da análise comparativa com grupos controle (razão pró/antioxidante) por meio da divisão do valor da razão do grupo controle dividido pela razão do grupo dos grupos clínicos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE PROTEÔMICA DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON E CONTROLES SAUDÁVEIS

5.1.1 Caracterização clínica e demográfica da coorte

As características clínicas e os dados demográficos foram coletados a partir dos formulários clínicos e questionários respondidos pelos 97 pacientes e 32 controles. Na tabela 5 estão representadas as características clínicas e os dados demográficos da coorte utilizada no presente trabalho.

Tabela 5. Informações clínicas e demográficas da coorte. A coluna da esquerda representa cada parâmetro analisado, enquanto as colunas da direita representam as classificações clínicas dos pacientes e controles dentro de cada respectivo parâmetro. N.A.: Não avaliado.

	Controle (n=32)	DP (n=97)	DP (n=97)		
			LEVE (n=44)	MODERADO (n=41)	AVANÇADO (n=12)
Idade no dia do exame	59,37±10,65	65,33±10,97	63,09±10,89	65,63±10,03	72,58±11,87
Idade de início da doença (anos)	N.A.	56,33±12,00	56,64±11,17	56,29±11,90	55,33±15,9
Tempo de doença até a data da coleta (em meses)	N.A.	110,58±78,67	78,11±51	117,13±67,50	207,83±111,53
Gênero (%masculino)	21,88	59,79	65,9	63,41	25
Consumo de cafeína (%não)	N.A.	11,34	13,64	7,32	16,67
					Continua

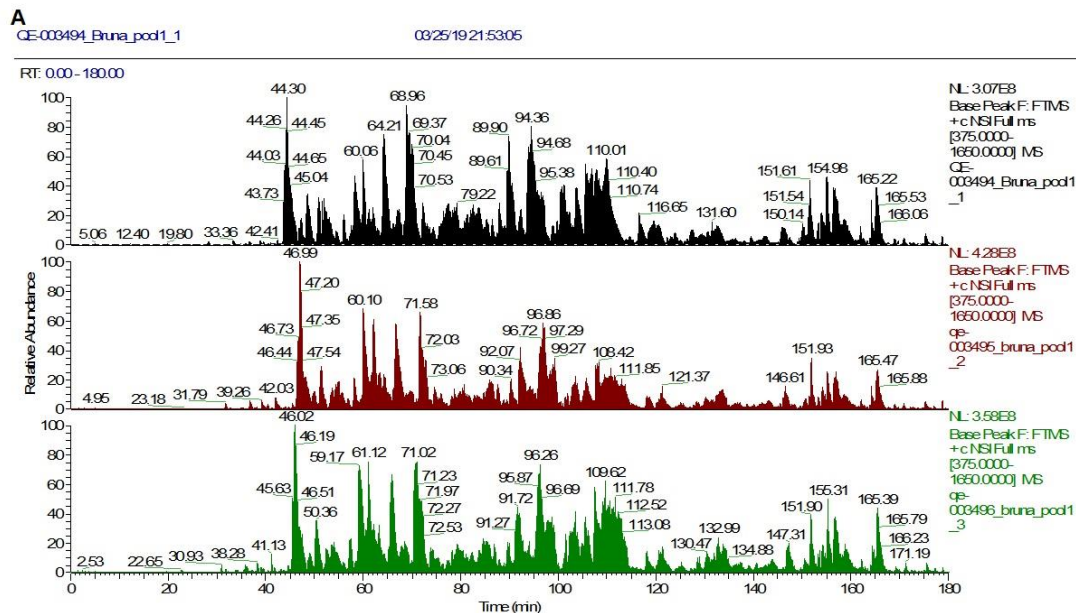
Tabagista (%não)	N.A.	53,6	45,45	53,66	Conclusão 83,33
Etilista (%não)	N.A.	42,27	40,9	39,02	58,33
Consumo de água do poço (%não)	N.A.	33	36,36	24,39	50
Contato com agrotóxico (%não)	N.A.	93,81	95,45	90,24	100
Histórico familiar (%sim)	N.A.	38,14	50	29,27	25
Escala Hoehn & Yahr modificada	N.A.	2,59±0,78	1,94±0,16	2,80±0,25	4,17±0,4
Escala Schwab & England (100-80% ^a ; 70-60% ^b ; 50-30% ^c ; 20-0% ^d)	N.A.	57,73 ^a ; 24,74 ^b ; 11,34 ^c ; 6,19 ^d	79,55 ^a ; 15,9 ^b ; 4,55 ^c	48,78 ^a ; 34,15 ^b ; 17,07 ^c	8,34 ^a ; 25 ^b ; 16,67 ^c ; 50 ^d
Mini Exame do Estado Mental	N.A.	24,87±5,58	27,28±3,02	24,33±5,74	18,4±8,36
Classificação clínica - Início precoce (%<50 anos)	N.A.	36,08	N.A.	N.A.	N.A.
Classificação clínica - Início normal (%50-65 anos)	N.A.	42,27	N.A.	N.A.	N.A.
Classificação clínica - Início tardio (%>65 anos)	N.A.	21,65	N.A.	N.A.	N.A.
Fenótipo Clínico – Tremor-dominante (TD) (%)	N.A.	8,33	N.A.	N.A.	N.A.
Fenótipo Clínico - Rígido Acinético (RA) (%)	N.A.	22,92	N.A.	N.A.	N.A.
Fenótipo Clínico - Misto (M) (%)	N.A.	68,75	N.A.	N.A.	N.A.

Pode-se concluir que a maioria dos pacientes é do sexo masculino (59,79%) e apresenta idade de início da doença dentro da faixa etária considerada normal para o

acometimento, entre os 50-65 anos (42,27%), sendo a classificação clínica de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada grau avançado apresentando um maior percentual (4,17±0,4), seguido do grau moderado (2,80±0,25) e por último o grau leve (1,94±0,16).

5.1.2 Análise Proteômica

A análise proteômica foi realizada a partir de *pools* preparados com as 97 amostras classificadas de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada (leve, moderado e avançado) e das 32 amostras de controles saudáveis. Na figura 12 podem ser observados os cromatogramas resultantes da análise LC-MS/MS das amostras analisadas em triplicatas técnicas, onde os cromatogramas em preto representam a primeira replicata da respectiva amostra, os cromatogramas em vermelho representam a segunda replicata técnica e os cromatogramas em verde representam a terceira replicata técnica da mesma. Com esse conjunto de dados foi possível observar a reprodutibilidade das corridas de cada réplica com distribuição de íons e suas respectivas intensidades ao longo das corridas.

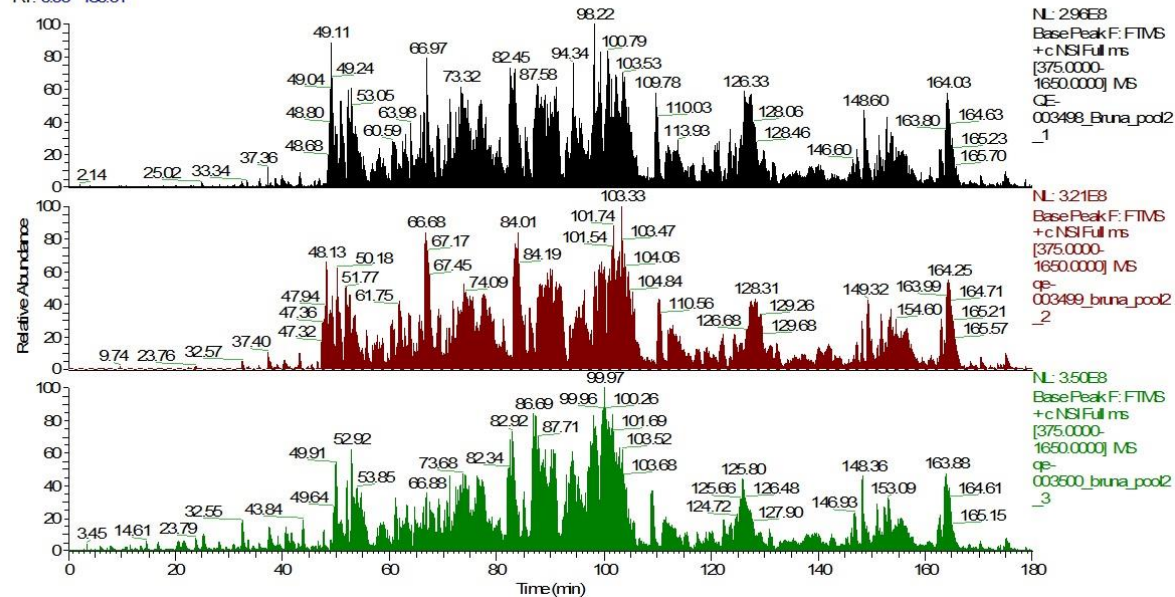


B

QE-003498_Bruna_pod2_1

03/26/19 09:38:45

RT: 0.00-180.01

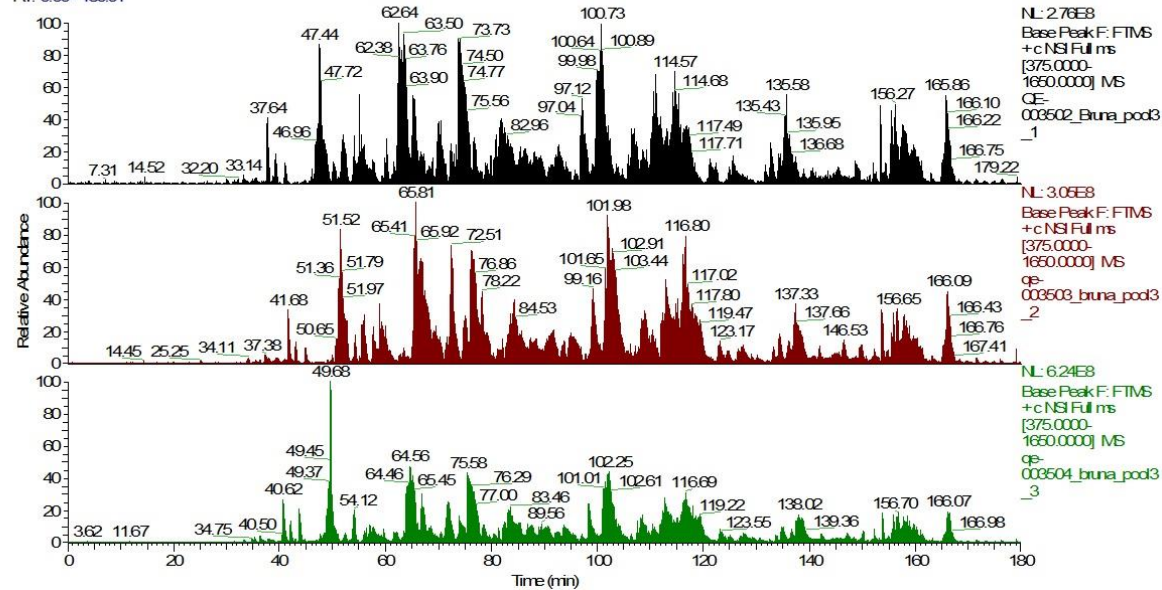


C

QE-003502_Bruna_pod3_1

03/26/19 21:29:39

RT: 0.00-180.01



D

QE-003538_Bruna_pod19_1

03/31/19 10:33:13

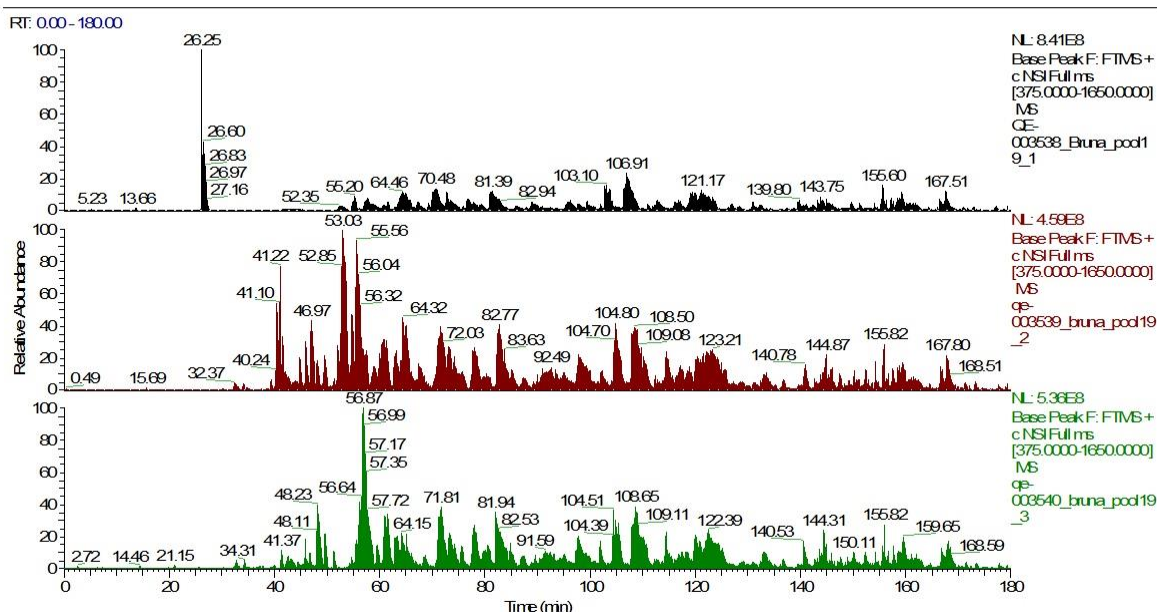


Figura 12: Cromatogramas. Cromatogramas em preto são referentes a primeira replicata, cromatogramas em vermelho são referentes a segunda replicata e cromatogramas em verde são referentes a terceira replicata. **(A)** Cromatograma referente as triplicatas do *pool* classificação leve. **(B)** Cromatograma referente as triplicatas do *pool* classificação moderado. **(C)** Cromatograma referente as triplicatas do *pool* classificação avançado. **(D)** Cromatograma referente as triplicatas do *pool* do grupo controle saudável.

Após o processamento dos dados brutos e busca contra o banco de dados Humano foi possível a identificação de forma redundante de 671 proteínas em todas as amostras dos grupos de pacientes com DP. Dentre essas, 225 proteínas são pertencentes ao grupo de estadiamento leve, 229 proteínas pertencentes ao grupo de estadiamento moderado e 217 proteínas pertencentes ao grupo de estadiamento avançado. Além destas, 213 proteínas foram identificadas no grupo de controles saudáveis. Utilizando como critério de filtro para seguir com as análises, foram selecionadas somente proteínas presentes em pelo menos 2 das replicatas técnicas. Após o uso deste filtro de restringência, foi possível a identificação de forma redundante de 592 proteínas no somatório das amostras dos grupos de pacientes com DP, sendo 204 proteínas pertencentes ao grupo leve, 196 ao grupo moderado e 192 ao grupo avançado. No grupo controle saudável foram identificadas 193 proteínas totais. De forma não redundante, foi obtida uma identificação total de 260 proteínas em todos os grupos pacientes e controles. Foram identificados perfis proteômicos descritivos de exossomos para cada grupo analisado.

Um dos objetivos do presente trabalho foi a caracterização de perfis proteômicos descritivos dos exossomos enriquecidos de plasma sanguíneo que pudessem apresentar proteínas exclusivamente expressas nos pacientes com classificações clínicas distintas e ausentes nos controles saudáveis. Para isso, as proteínas identificadas foram analisadas em diagrama de Venn, onde foi possível a identificação de proteínas exclusivas pertencentes a cada estadiamento clínico específico.

Na figura 13 é possível visualizar a identificação de 8 proteínas presentes exclusivamente no grupo leve, 9 proteínas presentes exclusivamente no grupo moderado, 7 proteínas presentes exclusivamente no grupo avançado e 9 proteínas presentes exclusivamente no grupo controle. Além das proteínas identificadas exclusivamente nos diferentes grupos do presente estudo, pode-se visualizar no diagrama, proteínas nas interseções dos grupos das diferentes classificações clínicas entre si e com o grupo controle.

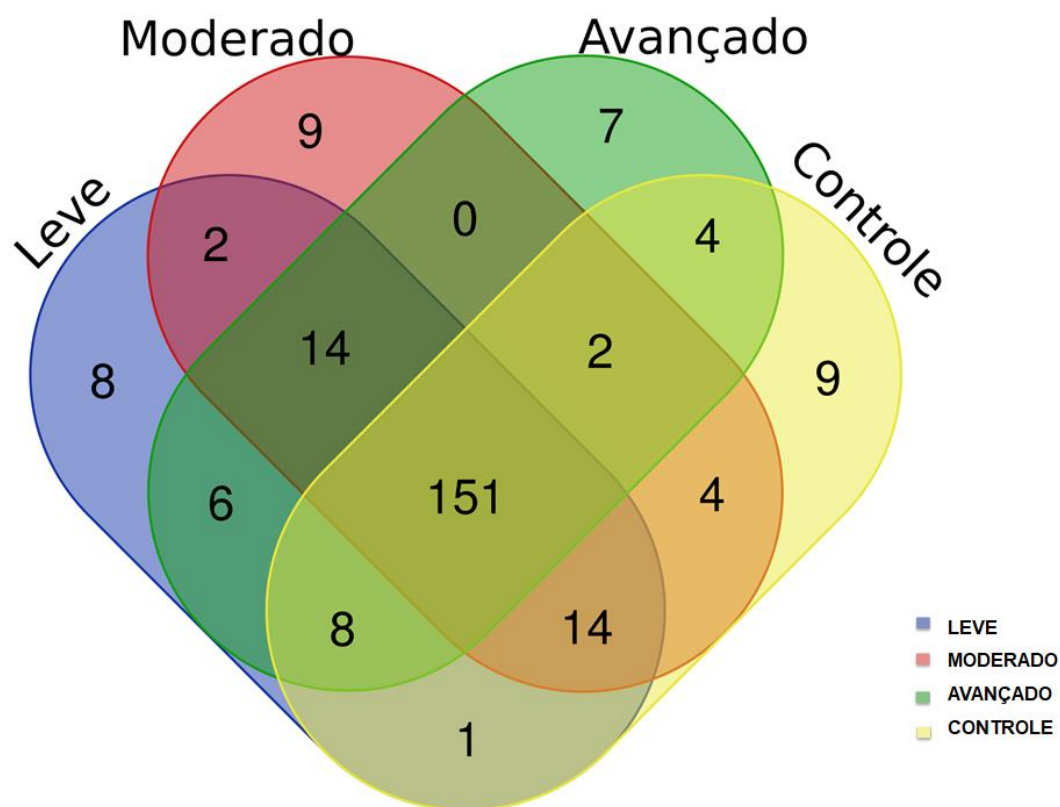


Figura 13. Diagrama de Venn da distribuição das proteínas identificadas em cada grupo de pacientes classificados clinicamente de acordo com a escala de estadiamento H&Y modificada e controles saudáveis. Em cores as classificações clínicas.

Na tabela 6, pode ser visualizado o nome e número de acesso das proteínas identificadas exclusivamente em cada grupo com diferente estadiamento clínico e dos controles saudáveis.

Tabela 6: Proteínas exclusivas H&Y e controles saudáveis. Proteínas identificadas exclusivamente em cada grupo de estadiamento clínico e controles saudáveis de acordo com o diagrama de venn. A coluna da esquerda representa a identificação de cada proteína no banco de dados *UniProt*, a coluna central representa a descrição/nome da proteína e a coluna da direita representa a respectiva classificação de cada proteína identificada.

Proteínas exclusivas - Diagrama de Venn		
Acesso <i>UniProt</i>	Proteína	Classificação
A0A0B4J1V2	Immunoglobulin heavy variable 2-26	Leve
		Continua

P36222	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>	Leve
P08123	<i>Collagen alpha-2(I) chain</i>	Leve
P49908	<i>Selenoprotein P</i>	Leve
P05109	<i>Protein S100-A8</i>	Leve
O00187	<i>Mannan-binding lectin serine protease 2</i>	Leve
Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	Leve
P01699	<i>Immunoglobulin lambda variable 1-44</i>	Leve
Q9BXR6	<i>Complement factor H-related protein 5</i>	Moderado
P49747	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	Moderado
P04278	<i>Sex hormone-binding globulin</i>	Moderado
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	Moderado
A0A075B6J9	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-18</i>	Moderado
P07737	<i>Profilin-1</i>	Moderado
P02741	<i>C-reactive protein</i>	Moderado
P00746	<i>Complement factor D</i>	Moderado
P51884	<i>Lumican</i>	Moderado
Q15485	<i>Ficolin-2</i>	Avançado
P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Avançado
Q06033	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	Avançado
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	Avançado

		Conclusão
P22891	<i>Vitamin K-dependent protein Z</i>	Avançado
Q92954	<i>Proteoglycan 4</i>	Avançado
P01344	<i>Insulin-like growth factor II</i>	Avançado
P21333	<i>Filamin-A</i>	Controle
A0A0J9YXX1	<i>Immunoglobulin heavy variable 5-10-1</i>	Controle
A0A075B6I9	<i>Immunoglobulin lambda variable 7-46</i>	Controle
Q96KN2	<i>Beta-Ala-His dipeptidase</i>	Controle
P61224	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>	Controle
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	Controle
P35542	<i>Serum amyloid A-4 protein</i>	Controle
P56199	<i>Integrin alpha-1</i>	Controle
P01705	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-23</i>	Controle

As proteínas identificadas exclusivamente em cada grupo de estadiamento foram investigadas com relação aos processos biológicos majoritários aos quais estão envolvidas utilizando a ferramenta *STRING*. Essa ferramenta é um banco de dados biológico que possui recursos de interação de proteína-proteína preditas e conhecidas. Esta base de dados é formada por dados experimentais de interação, métodos de previsão computacional e coleções de dados de expressão públicas.

Essa análise foi realizada com o intuito de identificar se somente com as proteínas exclusivas seria possível diferenciar funcionalmente os diferentes estágios de evolução da doença através dos processos biológicos representados pelas proteínas. Na tabela 7 é possível observar os resultados desta análise. No grupo com classificação clínica leve as 8 proteínas exclusivas correspondem a 12 processos biológicos relacionados com alterações no sistema imune, imunomodulação e

resposta ao estresse oxidativo. No grupo moderado as 9 proteínas exclusivas foram classificadas como pertencentes ao processo biológico de ativação alternativa do complemento, também relacionado a resposta imune inata. As 7 proteínas exclusivas identificadas no grupo avançado foram classificadas como pertencentes ao processo de transporte mediado por vesículas.

Tabela 7: Análise funcional de associações de processos biológicos. A coluna da esquerda representa a identificação da proteína no banco de dados e a coluna da direita representa o processo ao qual a respectiva proteína está associado. #ID representa o número de identificação da via no *Gene ontology* (GO)

Exclusivas do estadiamento leve	
#ID	Descrição do processo
GO:0002443	Imunidade mediada por leucócitos
GO:0045055	Regulação de exocitose
GO:0001775	Ativação celular
GO:0002376	Processos do Sistema imune
GO:0006950	Resposta ao estresse
GO:0006955	Resposta imune
GO:0043312	Degranulação de neutrófilos
GO:0001816	Produção de citocinas
GO:0016477	Migração celular
GO:0050776	Regulação da resposta imune
GO:0006959	Resposta imune humoral
GO:0050900	Migração de leucócitos
Exclusivas do estadiamento moderado	
#ID	Descrição do processo
GO:0006957	Ativação de via alternativa do complemento
Exclusivas do estadiamento avançado	
#ID	Descrição do processo
GO:0016192	Transporte mediado por vesículas

Do total de proteínas não redundantes identificadas (260 proteínas), 234 proteínas tiveram a área de seus picos correspondentes a cada proteína identificada,

calculada, seguindo para as análises quantitativas. Ou seja, 26 proteínas não apresentam área com qualidade ideal para o cálculo, não atendendo aos pré-requisitos do *software PERSEUS*.

Os valores numéricos das áreas foram submetidos a uma transformação com $\log_2(x)$ e as medianas calculadas para a normalização dos valores. Os valores resultantes foram considerados como abundância relativa de cada proteína e estão de acordo com estratégias de quantificação proteômica *label-free*, para instrumentos baseados em DDA, como o espectrômetro de massas de alta resolução Orbitrap utilizado no presente estudo. Na figura 14 é possível observar a distribuição normal dos dados de cada uma das replicatas e grupo estudado, possibilitando a realização da análise e comparação dos dados obtidos.

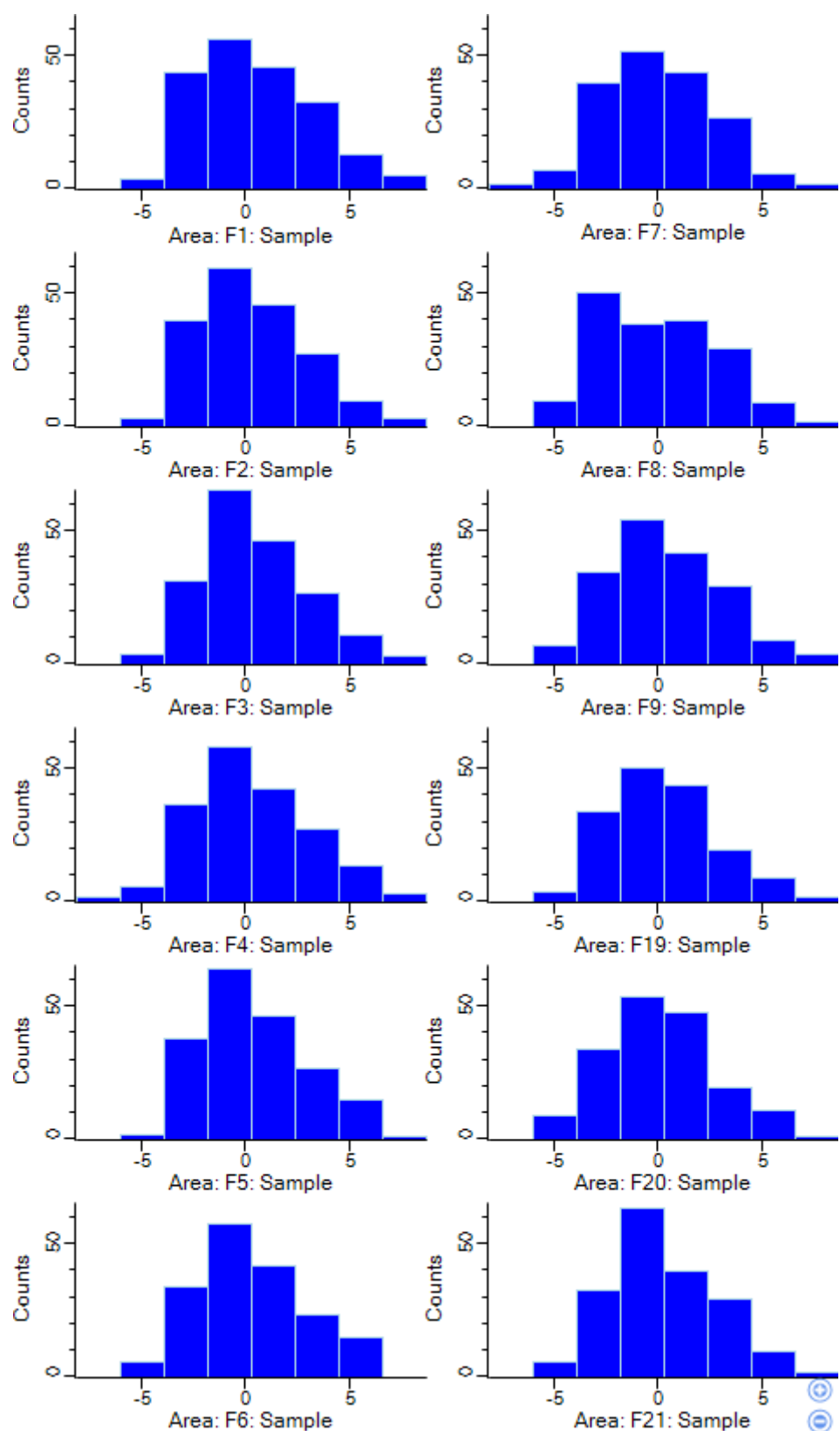


Figura 14: Histograma. Histogramas representando a normalidade dos dados obtidos. Área F1, F2, F3 referem-se às triplicatas do grupo leve. Área F4, F5, F6 referem-se às triplicatas do grupo moderado. Área F7, F8, F9 referem-se às triplicatas do grupo avançado. Área F19, F20, F21 referem-se às triplicatas do grupo controle saudável.

Na figura 15 são expostos gráficos de dispersão do tipo *Volcano*, onde, após a quantificação das proteínas, observamos as diferenças de expressão entre cada grupo clínico em relação ao controle. É possível observar as proteínas que exibem diferença de expressão estatisticamente significativa nas comparações com o grupo controle representadas pelas cores verde ou vermelha.

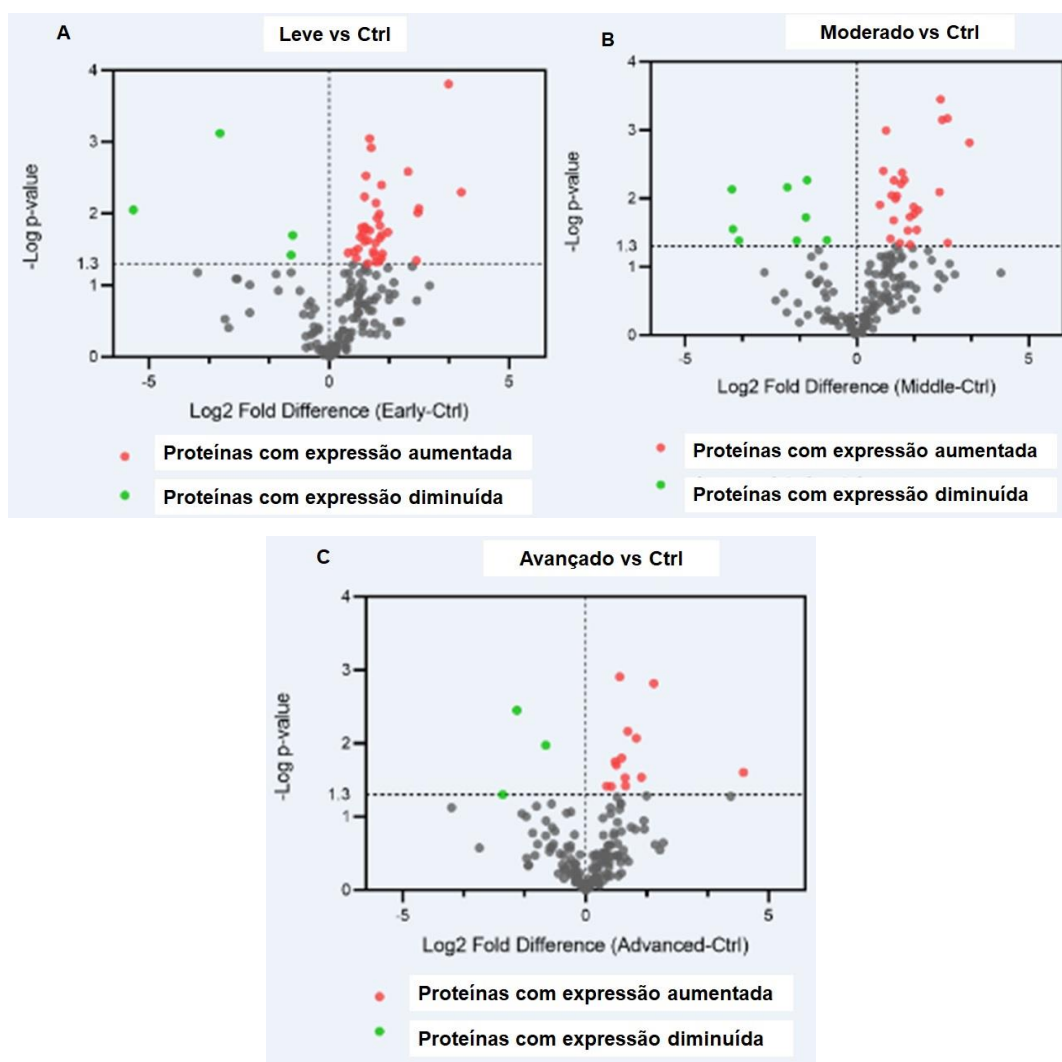


Figura 15: Gráfico de dispersão *Volcano* representando as proteínas diferencialmente expressas entre as classificações clínicas e controles. Em (A) grupo paciente com classificação leve *versus* grupo controle; em (B) grupo paciente com classificação moderado *versus* grupo controle e em (C) grupo paciente com classificação avançado *versus* grupo controle. $p < 0.05$ / $-\text{Log } p\text{-value} > 1.3$; FDR= 0.05.

Na figura 15-A é observada a comparação entre os grupos classificação clínica leve *versus* controles saudáveis. Foram identificadas um total de 42 proteínas diferencialmente expressas, destas, 38 proteínas apresentaram sua expressão aumentada (do inglês: *up-regulated*) e 4 proteínas apresentaram sua expressão

diminuída (do inglês: *down-regulated*). Já na figura 15-B é observada a comparação entre os grupos classificação clínica moderada *versus* controles saudáveis. Foram identificadas um total de 33 proteínas diferencialmente expressas, destas, 25 proteínas apresentaram sua expressão aumentada e 8 proteínas apresentaram sua expressão diminuída. Por último, na figura 15-C é observada a comparação entre os grupos classificação clínica avançado *versus* controles saudáveis. Foram identificadas um total de 16 proteínas diferencialmente expressas, destas, 13 proteínas apresentam sua expressão aumentada e 3 proteínas apresentaram sua expressão diminuída.

As proteínas consideradas diferencialmente expressas, com $-\log p\text{-valor} > 1.3$, apresentadas nos gráficos de dispersão do tipo *Volcano* (Figura 15), são descritas nas tabelas: 8, onde pode ser visualizada a comparação do grupo com classificação clínica leve *versus* grupo controle; 9, onde pode ser visualizada a comparação do grupo com classificação clínica moderado *versus* grupo controle; e 10, onde pode ser visualizada a comparação do grupo com classificação clínica avançado *versus* grupo controle. Além da descrição, é possível a visualização do número de acesso ao banco de dados *UniProt*, p-valor e a diferença de expressão (do inglês: *fold difference* ou *fold change*).

Estes dados representam o proteoma descritivo de exossomos enriquecidos do plasma de pacientes com DP. Além disso, representam a análise proteômica comparativa entre os grupos de evolução clínica.

Tabela 8: Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação LEVE (H&Y) em relação a controles saudáveis. A tabela apresenta número de acesso ao banco de dados *UniProt*, descrição/nome da proteína, $-\log P\text{-valor}$, diferença de expressão/*fold difference*.

Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP Leve (H&Y) em relação a controles saudáveis			
Proteínas com expressão aumentada			
Número de acesso ao banco <i>UniProt</i>	Descrição da Proteína	$-\log P\text{-valor}$	Diferença de expressão ($\log_2$ <i>Fold difference</i>)
A0A0B4J1V2	<i>Immunoglobulin heavy variable 2-26</i>	-	Exclusiva Continua

P36222	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>	-	Exclusiva
P08123	<i>Collagen alpha-2(I) chain</i>	-	Exclusiva
P49908	<i>Selenoprotein P</i>	-	Exclusiva
P05109	<i>Protein S100-A8</i>	-	Exclusiva
O00187	<i>Mannan-binding lectin serine protease 2</i>	-	Exclusiva
Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	-	Exclusiva
P01699	<i>Immunoglobulin lambda variable 1-44</i>	-	Exclusiva
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	2,29979	3,67294
P04275	<i>von Willebrand factor</i>	3,80864	3,31593
P0DJ19	<i>Serum amyloid A-2 protein</i>	2,07133	2,49082
A0A0C4DH55	<i>Immunoglobulin kappa variable 3D-7</i>	2,01327	2,46169
Q9NP78	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 9</i>	1,34386	2,42042
Q15848	<i>Adiponectin</i>	2,58521	2,18868
P15814	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1</i>	1,74308	1,62898
P07360	<i>Complement component C8 gamma chain</i>	1,44222	1,47941 Continua

P04003	<i>C4b-binding protein alpha chain</i>	1,70222	1,46415
P04004	<i>Vitronectin</i>	1,37699	1,45554
P02775	<i>Platelet basic protein</i>	2,39887	1,45532
P27169	<i>Serum paraoxonase/arylester ase 1</i>	1,65706	1,41316
P01857	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 1</i>	1,83004	1,41305
P36980	<i>Complement factor H- related protein 2</i>	1,99506	1,39913
P00736	<i>Complement C1r subcomponent</i>	1,33228	1,39152
P60709	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	1,93883	1,33561
P01008	<i>Antithrombin-III</i>	2,14726	1,30254
Q12805	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	1,32997	1,29392
P01834	<i>Immunoglobulin kappa constant</i>	1,59001	1,28979
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	1,4349	1,24503
Q16610	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	1,47314	1,23079
P22352	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	2,91976	1,16846
Q08380	<i>Galectin-3-binding protein</i>	3,04943	1,12268 Continua

P02747	<i>Complement C1q subcomponent subunit C</i>	1,76614	1,12086
P01861	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 4</i>	1,62848	1,06992
P01871	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	1,30156	1,06685
P10909	<i>Clusterin</i>	1,78248	1,02931
P69905	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	2,52754	1,02249
P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	1,8163	0,98947
P13671	<i>Complement component C6</i>	2,23489	0,981456
P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	1,61076	0,980718
P01011	<i>Alpha-1-antichymotrypsin</i>	1,72508	0,931483
P05155	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	1,80399	0,904038
P01859	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 2</i>	1,67608	0,867136
P31146	<i>Coronin-1A</i> <i>OS=Homo sapiens</i>	1,50949	0,803683
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	1,37889	0,757339
P02790	<i>Hemopexin</i>	1,46844	0,687043
P02649	<i>Apolipoprotein E</i>	1,45176	0,521366
			Continua

Proteínas com expressão diminuída			Conclusão
P21333	<i>Filamin-A</i>	-	Exclusiva
A0A0J9YXX1	<i>Immunoglobulin heavy variable 5-10-1</i>	-	Exclusiva
A0A075B6I9	<i>Immunoglobulin lambda variable 7-46</i>	-	Exclusiva
Q96KN2	<i>Beta-Ala-His dipeptidase</i>	-	Exclusiva
P61224	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>	-	Exclusiva
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	-	Exclusiva
P35542	<i>Serum amyloid A-4 protein</i>	-	Exclusiva
P56199	<i>Integrin alpha-1</i>	-	Exclusiva
P01705	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-23</i>	-	Exclusiva
P02655	<i>Apolipoprotein C-II</i>	1,69868	-1,01246
P02776	<i>Platelet factor 4</i>	1,42216	-1,05828
P02765	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	3,12092	-3,02883
Q03591	<i>Complement factor H-related protein 1</i>	2,05089	-5,43386

Tabela 9: Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação MODERADO (H&Y) em relação a controles saudáveis. A tabela apresenta número de acesso ao banco de dados *UniProt*, descrição/nome da proteína, $-\log P$ -valor, diferença de expressão/*fold difference*.

Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP MODERADO (H&Y) em relação a controles saudáveis			
Proteínas com expressão aumentada			
Número de acesso ao banco <i>UniProt</i>	Descrição da Proteína	$-\log P$ -valor	Diferença de expressão ($\log_2$ Fold difference)
Q9BXR6	<i>Complement factor H-related protein 5</i>	-	Exclusiva
P49747	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	-	Exclusiva
P04278	<i>Sex hormone-binding globulin</i>	-	Exclusiva
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	-	Exclusiva
A0A075B6J9	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-18</i>	-	Exclusiva
P07737	<i>Profilin-1</i>	-	Exclusiva
P02741	<i>C-reactive protein</i>	-	Exclusiva
P00746	<i>Complement factor D</i>	-	Exclusiva
P51884	<i>Lumican</i>	-	Exclusiva
Q15848	<i>Adiponectin</i>	2,81836	3,27828
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	1,35016	2,64624
P36980	<i>Complement factor H-related protein 2</i>	3,17249	2,63694 Continua

A0A0C4DH24	<i>Immunoglobulin kappa variable 6-21</i>	3,15061	2,48093
P01861	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 4</i>	3,45184	2,4384
A0A0B4J1U7	<i>Immunoglobulin heavy variable 6-1</i>	2,09486	2,40444
P07360	<i>Complement component C8 gamma chain</i>	1,832	1,78185
A0A075B6S2	<i>Immunoglobulin kappa variable 2D-29</i>	1,54037	1,74564
P01782	<i>Immunoglobulin heavy variable 3-9</i>	1,77645	1,66964
P03951	<i>Coagulation factor XI</i>	1,87673	1,65246
P01591	<i>Immunoglobulin J chain</i>	1,3251	1,55281
P01871	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	1,73292	1,54324
P04004	<i>Vitronectin</i>	1,53126	1,48068
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	2,27124	1,38359
P69905	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	2,3769	1,31599
P00734	<i>Prothrombin</i>	2,21567	1,2836
Q14624	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4</i>	1,34816	1,25005
P27169	<i>Serum paraoxonase/arylesterase 1</i>	2,03725	1,1662 Continua

P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	1,9935	1,12249
P01860	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 3</i>	2,26478	1,0813
P01024	<i>Complement C3</i>	1,68121	1,07154
P02749	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	2,04565	1,00951
P01008	<i>Antithrombin-III</i>	1,41294	0,978367
P04114	<i>Apolipoprotein B-100</i>	2,99401	0,850361
P00450	<i>Ceruloplasmin</i>	2,40473	0,772108
P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	1,90916	0,667822
Proteínas com expressão diminuída			
P21333	<i>Filamin-A</i>	-	Exclusiva
A0A0J9YXX1	<i>Immunoglobulin heavy variable 5-10-1</i>	-	Exclusiva
A0A075B6I9	<i>Immunoglobulin lambda variable 7-46</i>	-	Exclusiva
Q96KN2	<i>Beta-Ala-His dipeptidase</i>	-	Exclusiva
P61224	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>	-	Exclusiva
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	-	Exclusiva
P35542	<i>Serum amyloid A-4 protein</i>	-	Exclusiva
P56199	<i>Integrin alpha-1</i>	-	Exclusiva Continua

P01705	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-23</i>	-	Conclusão Exclusiva
P05452	Tetranectin	1,39072	-0,868684
P02655	Apolipoprotein C-II	2,26812	-1,44873
P02768	Serum albumin	1,72348	-1,48631
P01880	Immunoglobulin heavy constant delta	1,38552	-1,75066
Q03591	Complement factor H- related protein 1	2,16536	-2,02143
P01602	Immunoglobulin kappa variable 1-5	1,38574	-3,43219
P02765	Alpha-2-HS- glycoprotein	1,55286	-3,61145
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	2,13514	-3,63709

Tabela 10: Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP classificação AVANÇADO (H&Y) em relação a controles saudáveis. A tabela apresenta número de acesso ao banco de dados *UniProt*, descrição/nome da proteína, -logP-valor, diferença de expressão/*fold difference*.

Proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes com DP AVANÇADO (H&Y) em relação a controles saudáveis			
Proteínas com expressão aumentada			
Número de acesso ao banco <i>UniProt</i>	Descrição da Proteína	-log P-valor	Diferença de expressão (<i>log2 Fold difference</i>)
Q15485	<i>Ficolin-2</i>	-	Exclusiva Continua

P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	-	Exclusiva
Q06033	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>	-	Exclusiva
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	-	Exclusiva
P22891	<i>Vitamin K-dependent protein Z</i>	-	Exclusiva
Q92954	<i>Proteoglycan 4</i>	-	Exclusiva
P01344	<i>Insulin-like growth factor II</i>	-	Exclusiva
P06312	<i>Immunoglobulin kappa variable 4-1</i>	1,60406	4,30677
A0A075B6K5	<i>Immunoglobulin lambda variable 3-9</i>	2,81817	1,8655
P02652	<i>Apolipoprotein A-II</i>	1,5383	1,52009
A0A0B4J2D9	<i>Immunoglobulin kappa variable 1D-13</i>	2,07272	1,38095
P01861	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 4</i>	2,16569	1,15204
A0A075B6I0	<i>Immunoglobulin lambda variable 8-61</i>	1,42214	1,09313
P02743	<i>Serum amyloid P- component</i>	1,53137	1,07667
P01024	<i>Complement C3</i>	1,80167	0,98287
P02747	<i>Complement C1q subcomponent subunit C</i>	2,90758	0,928178 Continua

P00734	<i>Prothrombin</i>	1,70372	0,833915
P36980	<i>Complement factor H-related protein 2</i>	1,75216	0,808981
P10909	<i>Clusterin</i>	1,4104	0,697508
P13671	<i>Complement component C6</i>	1,41714	0,577078
Proteínas com expressão diminuída			
P21333	<i>Filamin-A</i>	-	Exclusiva
A0A0J9YXX1	<i>Immunoglobulin heavy variable 5-10-1</i>	-	Exclusiva
A0A075B6I9	<i>Immunoglobulin lambda variable 7-46</i>	-	Exclusiva
Q96KN2	<i>Beta-Ala-His dipeptidase</i>	-	Exclusiva
P61224	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>	-	Exclusiva
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	-	Exclusiva
P35542	<i>Serum amyloid A-4 protein</i>	-	Exclusiva
P56199	<i>Integrin alpha-1</i>	-	Exclusiva
P01705	<i>Immunoglobulin lambda variable 2-23</i>	-	Exclusiva
P04430	<i>Immunoglobulin kappa variable 1-16</i>	1,97598	-1,088
P02765	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	2,45325	-1,87524

P01718	<i>Immunoglobulin lambda variable 3-27</i>	1,3011	Conclusão -2,26266
--------	--	--------	-----------------------

5.2 ANÁLISE FUNCIONAL *IN SILICO*

Tendo em vista que dados oriundos de uma análise proteômica em larga escala são extremamente robustos e numerosos, análises funcionais utilizando estratégias de biologia de sistemas com diversas bases de dados, são extremamente necessárias para uma interpretação conjunta, além de agregar significado biológico e gerar hipóteses a serem confirmadas posteriormente em ensaios ortogonais. Além do objetivo de descrever o perfil proteômico de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com DP, a presente dissertação tem o objetivo de sugerir prováveis vias de sinalizações e processos biológicos presentes de forma majoritária nas amostras.

Neste sentido os dados foram analisados separadamente utilizando o *software FunRich* com as bases de dados descritas na seção 4.4. De acordo com os objetivos do projeto destacamos as vias de sinalização e os diversos processos biológicos majoritariamente representados em cada conjunto de dados.

A análise funcional realizada com as proteínas diferencialmente expressas em cada grupo clínicos *versus* controles saudáveis, teve como objetivo interpretar o perfil proteômico específico em exossomos de cada grupo (leve, moderado e avançado) e assim sugerir putativos processos biomarcadores a serem melhor investigados futuramente.

Tendo em vista que o presente estudo proteômico foi realizado em exossomos, foi feita uma análise de conteúdo de componentes celulares utilizando os bancos de dados de proteínas identificadas em compartimentos celulares distintos e em exossomos. Na figura 16 é possível observar que majoritariamente as proteínas identificadas no estudo apresentam origem descrita exossomal, observada de forma uniforme entre os diferentes grupos clínicos.

Além de proteínas identificadas preferencialmente em exossomos, foi possível identificar proteínas descritas como oriundas de outros componentes celulares mostrando que o conteúdo dos exossomos enriquecidos no estudo em amostras de pacientes é rico e está de acordo com dados da literatura de descrição de conteúdo proteico. Proteínas presentes preferencialmente em compartimentos celulares como mitocôndria, membrana plasmática, retículo e proteínas citoplasmáticas podem ser secretadas através de exossomos e pode representar, até certo ponto, o perfil proteômico da célula de origem. Esse dado é extremamente interessante e rico, podendo contribuir para base de dados de proteínas exossomais de pacientes com DP, como por exemplo, Exocarta (<http://www.exocarta.org/>).

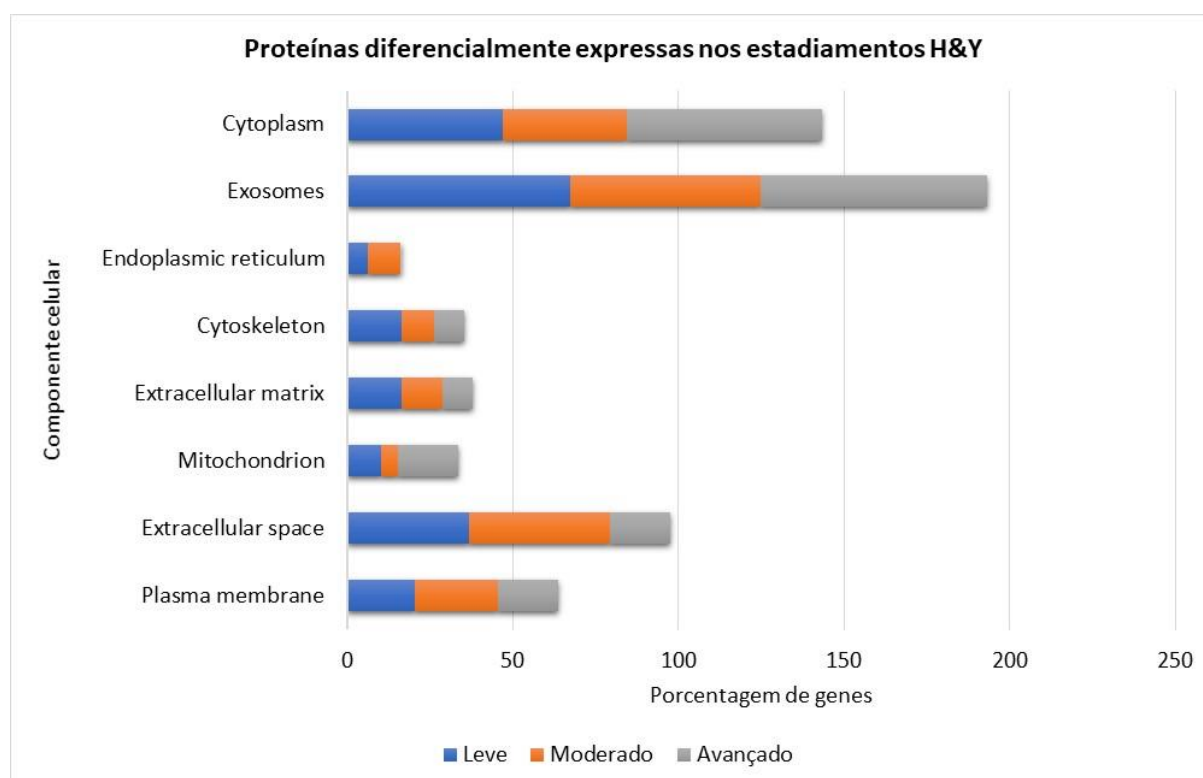


Figura 16. Análise de origem celular das proteínas diferencialmente expressas nos grupos clínicos estudados. As bases de dados utilizadas para a obtenção da localização de expressão foram *Proteoma Map*; *ProteomicsDB a Human Proteinpedia* e *Exocarta* (<http://www.exocarta.org/>).

Os principais processos biológicos que são representados pelas proteínas diferencialmente expressas em cada grupo quando comparado aos controles podem ser visualizados na figura 17. Esta análise foi realizada com a totalidade dos dados quantificados (*volcano plot*) adicionados as proteínas exclusivas.

Tendo em vista que as proteínas diferencialmente expressas podem ser classificadas em mais de um processo biológico é relevante ressaltar que os processos expostos na figura abaixo são os que incluem os maiores números de proteínas.

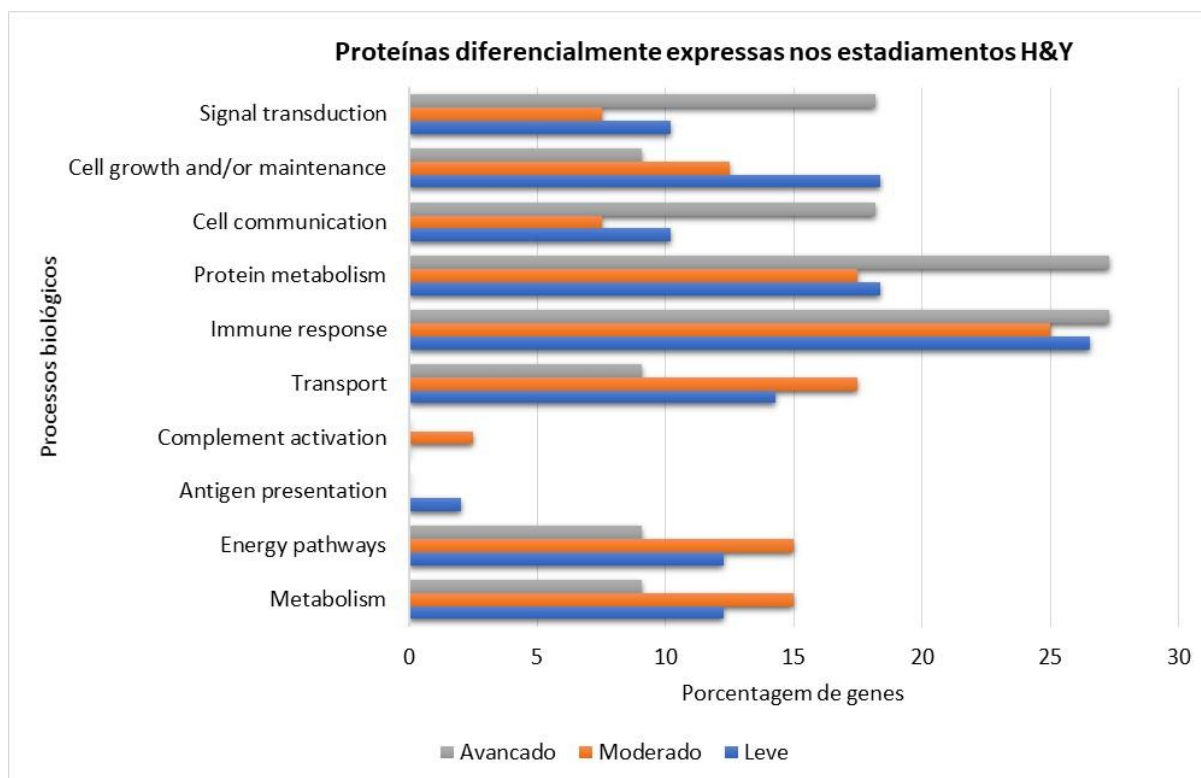


Figura 17. Processos biológicos representados pelas proteínas diferencialmente expressas identificadas em exossomos. Em cores, as classificações clínicas analisadas. As bases de dados utilizadas para classificação dos processos biológicos foram: *human Protein Reference Database (HPRD)*; *Entrez Gene*; *Uniprot*; *Proteoma Map*; *ProteomicsDB* e *Human Proteinpedia* alimentadas na ferramenta de análise funcional *FunRich: Functional enrichment analysis Tool*.

Foram identificados presentes em exossomos de pacientes com DP dez processos majoritários relacionados a: sinalização celular, proliferação e comunicação; metabolismo de proteínas; resposta imune; transporte; ativação do sistema complemento; apresentação de antígenos e processos metabólicos e de vias energéticas. Dentre os processos descritos na figura 17 o processo de resposta imune e metabolismo de proteínas são os dois com maior número de proteínas representadas e, portanto, mais abundantes no perfil proteômico identificado em exossomos. O que faz sentido, tendo em vista que o estudo se trata de exossomos enriquecidos diretamente do plasma sanguíneo. Entretanto é importante notar que as proteínas que alimentaram a análise de bioinformática foram proteínas

diferencialmente expressas em relação as amostras controles. Portanto pode-se sugerir que o perfil proteômico de exossomos de pacientes com DP possui os processos biológicos descritos acima alterados em relação ao perfil de indivíduos saudáveis.

Além dos processos biológicos mais abundantes representados pelos perfis proteômicos identificados, foram analisadas a quais vias de sinalização as proteínas pertencem de forma conjunta e não somente individual. Com o intuito de visualizar as vias de sinalização majoritárias para cada grupo de estadiamento, foram realizadas análises funcionais individuais para o grupo leve, para o moderado e para o avançado.

As ferramentas de análise funcional foram alimentadas com as proteínas diferencialmente expressas (aumentadas e diminuídas em relação ao controle) separadamente. Com isso foi possível visualizar um maior número de vias de sinalização representadas pelas proteínas que compõem o perfil de cada estágio evolutivo da doença em exossomos. Nas figuras 18; 19 e 20 estão descritas as vias de sinalização para os grupos clínicos leve, moderado e avançado.

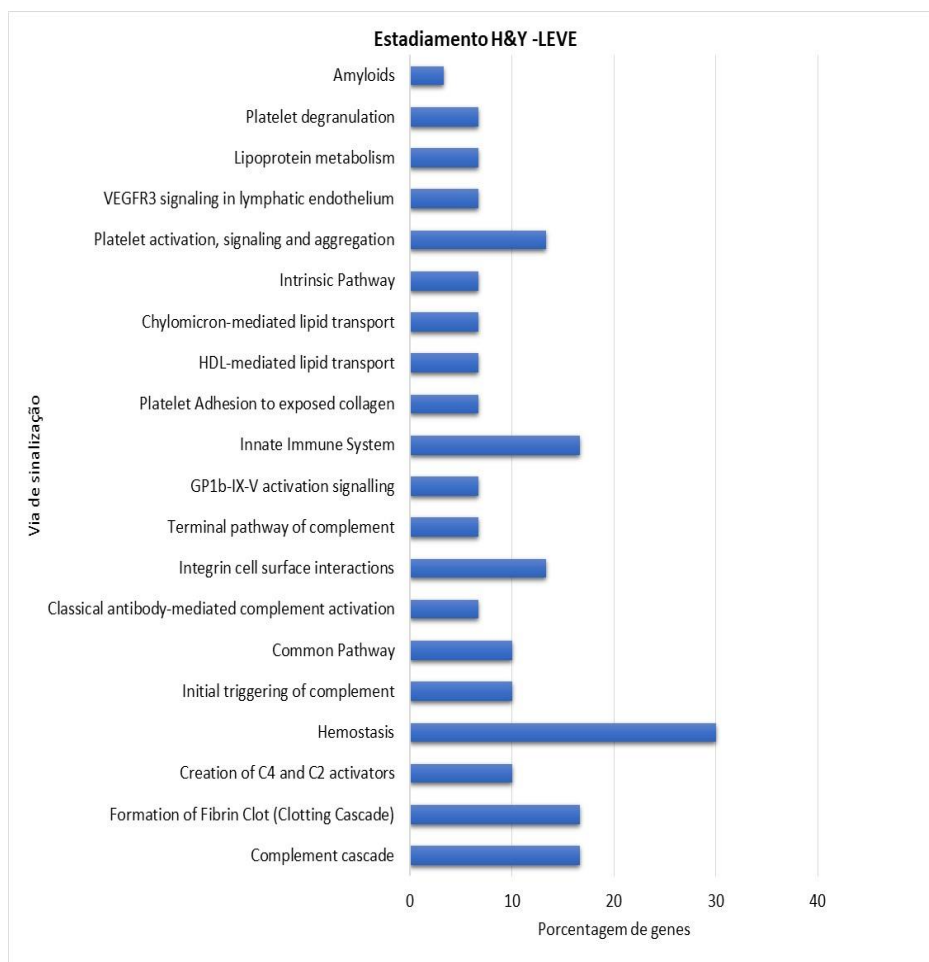


Figura 18. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Leve. No eixo y pode ser observado as vias de sinalização e no eixo x a percentagem de genes para cada via.

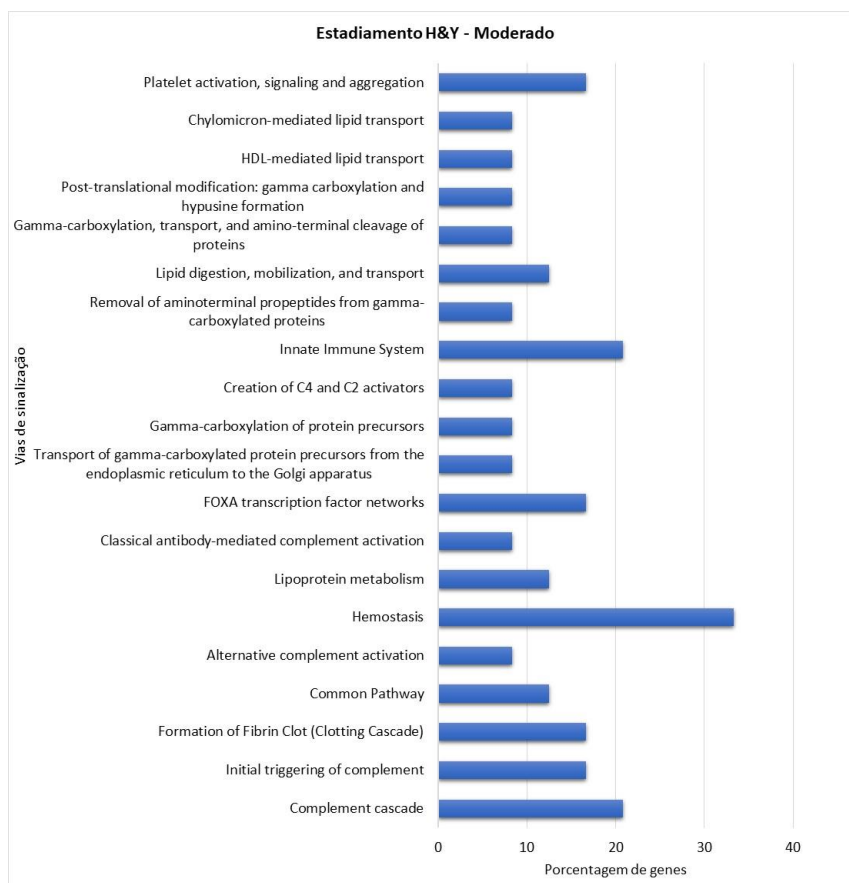


Figura 19. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Moderado. No eixo y pode ser observado as vias de sinalização e no eixo x a percentagem de genes para cada via.

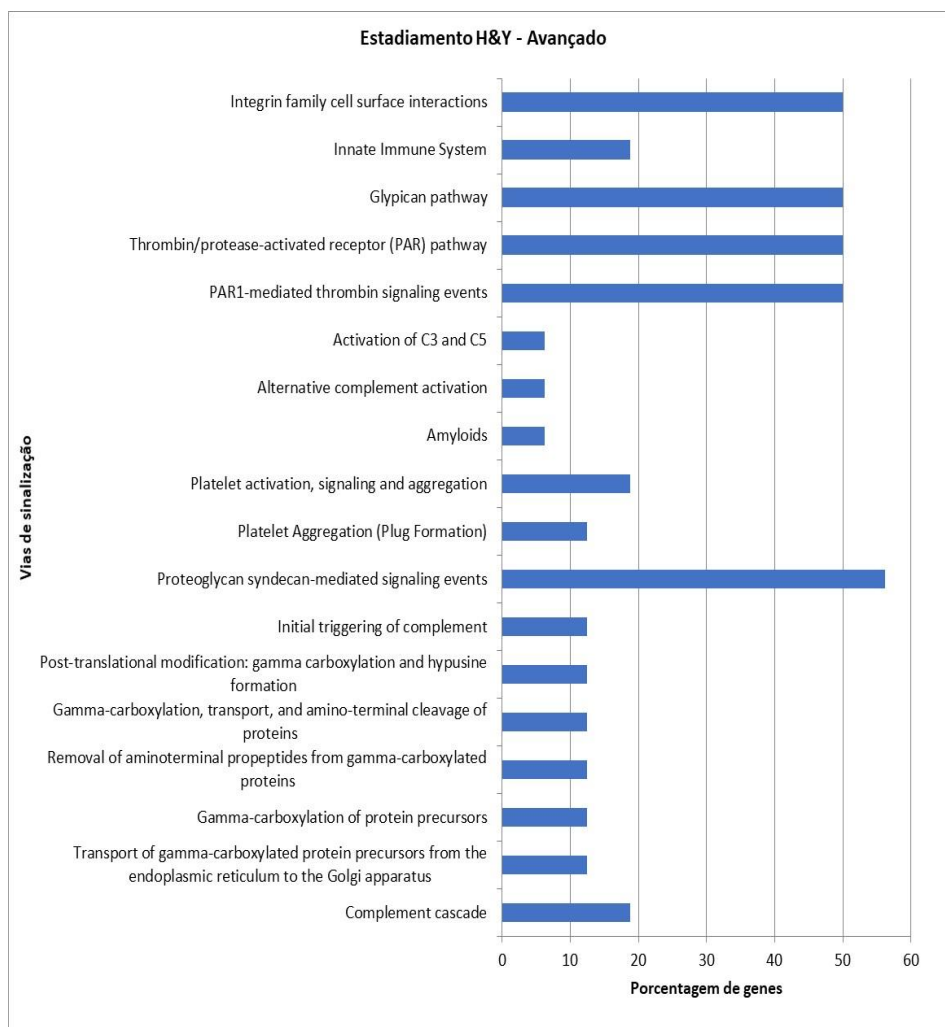


Figura 20. Vias de sinalização majoritariamente representadas pelas proteínas diferencialmente expressas em exossomos de pacientes do grupo Avançado. No eixo y pode ser observado as vias de sinalização e no eixo x a percentagem de genes para cada via.

As vias de sinalização representadas pelas proteínas diferencialmente expressas (com expressão aumentada e expressão diminuída) com significância estatística encontradas foram: 20 no grupo leve; 20 no grupo moderado e 18 no grupo avançado.

Como é possível observar nas figuras acima os três grupos clínicos compartilham vias de sinalização relacionadas à ativação plaquetária; ativação do sistema complemento e sua cascata e sistema imune inato. Os grupos leve e moderado compartilham vias relacionadas ao metabolismo lipídico; os grupos moderado e avançado compartilham vias relacionadas a MPT do tipo gama-carboxilação que podem estar envolvidas em cascatas de coagulação. No grupo leve

foi possível sugerir a participação da via de sinalização mediada por VEGFR3 em endotélio linfático e a via de interação de superfície mediada por integrinas. Nos grupos com classificação clínica moderado e avançado foram destacadas as vias de sinalização mediadas pelo fator de transcrição FOXA e Glipican respectivamente. Por fim foi destacada no grupo avançado e no leve a via de sinalização denominada amilóides pelo banco de dados utilizado na análise.

Após as análises funcionais dos grupos clínicos individuais foi realizada uma análise funcional utilizando as ferramentas de bioinformática descritas com todas as proteínas super expressas nos três grupos clínicos (leve, moderado e avançado) após as respectivas comparações com os controles. A mesma estratégia foi utilizada para as proteínas com expressão diminuída. Na figura 21 é possível observar os diagramas de Venn para as proteínas aumentadas e diminuídas.

Dentre as proteínas com expressão aumentada, 3 proteínas estão presentes em todos os pacientes: *serum amyloid P-component*, *immunoglobulin heavy constant gamma 4* e *Complement factor H-related protein 2*. Enquanto isso, 10 proteínas com expressão diminuída foram encontradas em todos os pacientes com DP, ou seja, apresentaram expressão aumentada no grupo dos controles saudáveis: *alpha-2-HS-glycoprotein*, *integrin alpha-1*, *peroxiredoxin-1*, *immunoglobulin lambda variable 2-23*, *ras-related protein Rap-1b*, *immunoglobulin lambda 7-46*, *filamin-A*, *beta-ala-his dipeptidase*, *immunoglobulin heavy variable 5-10-1* e *serum amyloid A-4 protein* (Figura 21).

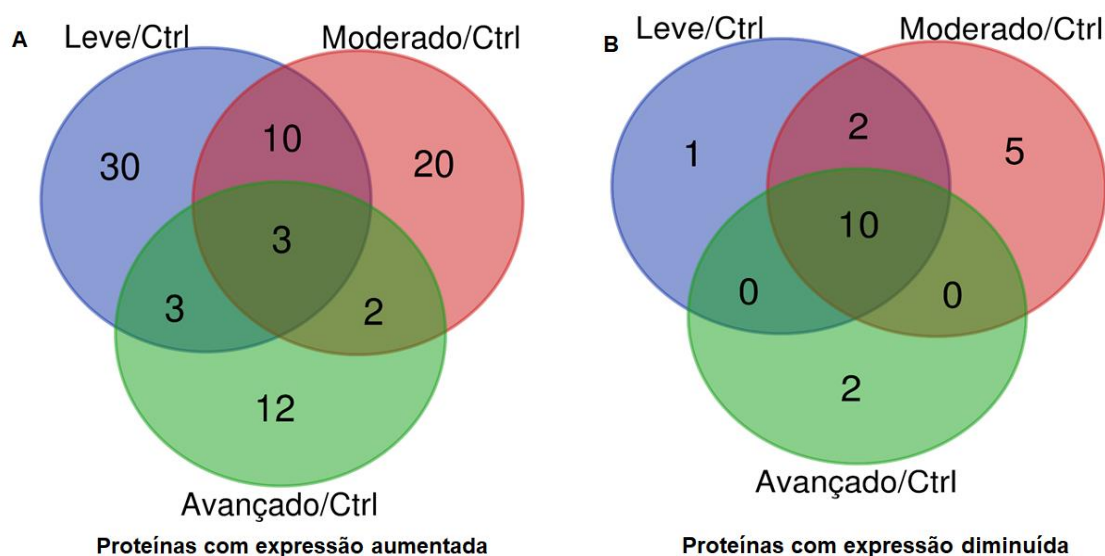


Figura 21: Resumo das proteínas diferencialmente expressas estatisticamente significativas encontradas em exossomos enriquecidos de plasma sanguíneo de pacientes com DP e controles saudáveis. (A) Número de proteínas com expressão aumentada (B) Número de proteínas com expressão diminuída. Comparação entre as classificações clínicas leve, moderado e avançado com os controles saudáveis.

Com o intuito de identificar as vias de sinalização predominantemente aumentadas e diminuídas em todos os pacientes independentemente de grupo de estadiamento clínico, uma análise de enriquecimento foi realizada. A tabela 11 descreve os resultados do diagrama de Venn da figura 21 e apresenta as vias de sinalização representadas pelos perfis proteômicos presentes em todos os grupos após comparação com os controles saudáveis. As vias estão descritas em *itálico* com o intuito de preservar a correção da nomenclatura utilizada pelo banco de dados.

Tabela 11: Vias de sinalização enriquecidas representadas pelos perfis proteômicos em todos os grupos clínicos após comparação com controles saudáveis. Coluna da esquerda refere-se a diferença de expressão, coluna central refere-se ao total de proteínas e coluna da direita refere-se as vias de sinalização enriquecidas para respectiva situação.

Expressão	Total	Vias de sinalização enriquecidas
Expressão aumentada e diminuídas	4	<i>HDL-mediated lipid transport</i>
		<i>Lipid digestion, mobilization, and transport</i>
		<i>Initial triggering of complemento</i>
		<i>Lipoprotein metabolism</i>
Expressão aumentada	14	<i>Chaperonin-mediated protein folding</i>
		<i>Alternative complement activation</i>
		<i>FOXA1 transcription factor network</i>
		<i>Platelet sensitization by LDL</i>
		<i>Neurotransmitter Release Cycle</i>
		<i>Golgi Associated Vesicle Biogenesis</i>
		<i>Nongenotropic Androgen signaling</i>
		<i>Post-translational modification: gamma carboxylation and hypusine formation</i>
		<i>Transport of gamma-carboxylated protein precursors from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus</i>
		<i>glutathione redox reactions I</i>
		<i>LDL-mediated lipid transport</i>
		<i>Chylomicron-mediated lipid transport</i>
		<i>Lysosome Vesicle Biogenesis</i>
		<i>GABA synthesis, release, reuptake and degradation</i>
Expressão diminuída	13	<i>Classical antibody-mediated complement activation</i>
		<i>Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade)</i>
		<i>Cell surface interactions at the vascular wall</i>
		<i>CXCR3-mediated signaling events</i>
		<i>Recycling of bile acids and salts</i>
		<i>Transport of organic anions</i>
		<i>SLC-mediated transmembrane transport</i>
		<i>Bile acid and bile salt metabolism</i>
		<i>Innate Immune System</i>
		<i>Transport of vitamins, nucleosides, and related molecules</i>
		<i>Metabolism of lipids and lipoproteins</i>
		<i>FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks</i>
		<i>Immune System</i>

De forma mais abrangente é possível observar que as proteínas diferencialmente expressas em exossomos se agrupam ou podem ser classificadas funcionalmente como proteínas que participam do sistema imune inato, metabolismo e transporte de lipídeos, MPT, reações redox envolvendo estresse oxidativo, alterações de liberação de neurotransmissores, biogênese de vesículas e a via de sinalização envolvendo o a família gênica FOXA de fatores de transcrição.

Além da análise funcional abrangente que tem como objetivo apresentar as vias e processos nos quais as proteínas identificadas estão presentes foi realizada com as proteínas super expressas uma análise *in silico* de interação utilizando a base de dados *String*. Com essa análise foi possível observar que as proteínas super expressas em todos os grupos estão de certa forma relacionadas e participam em conjunto do transporte mediado por vesículas; degranulação plaquetária; regulação de exocitose e da regulação e resposta ao estresse. Na figura 22 é possível observar que uma mesma proteína pode interagir com outras proteínas em mais de um processo biológico. A análise de interação com o conjunto de proteínas com expressão diminuída não apresentou interação significativamente estatística devido ao número reduzido.

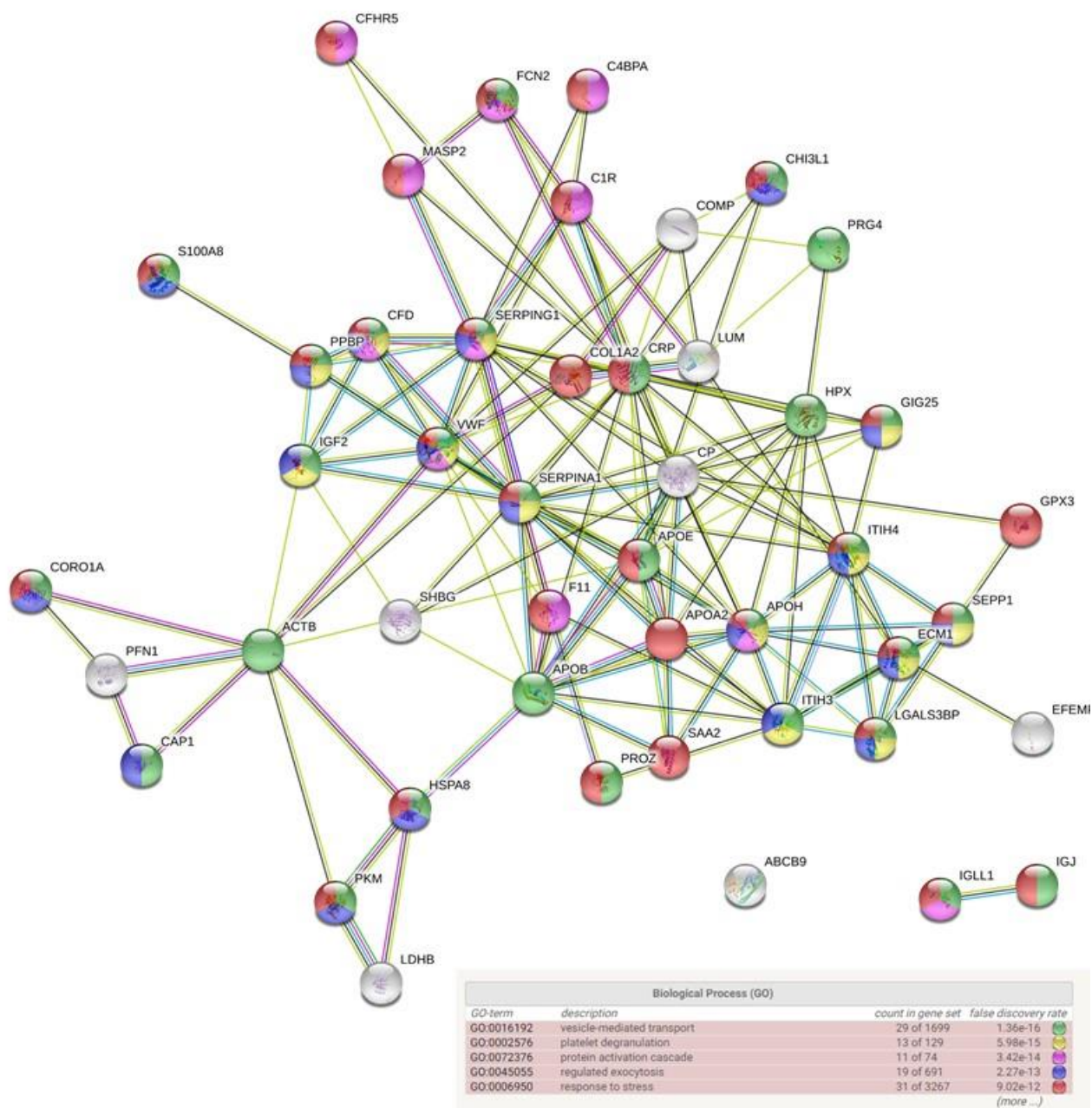


Figura 22: Rede de interação das proteínas super expressas identificadas em todos os grupos classificados clinicamente. A análise foi realizada utilizando *String Protein Data Base*. Círculos verdes são referentes aos processos de transporte mediado por vesícula; círculos amarelos são referentes aos processos de degranulação plaquetária; círculos roxos são referentes aos processos de cascata de ativação de proteína; círculos azuis são referentes aos processos de regulação de excitose; círculos vermelhos são referentes aos processos de resposta ao estresse.

5.3 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EXOSSOMOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON

Tendo em vista que foram identificadas proteínas com expressão aumentada no interior dos exossomos de pacientes com DP relacionadas a resposta ao estresse

oxidativo e vias de sinalização que são influenciadas por variações deste fenômeno, foi avaliado os níveis de hidroperóxidos e os níveis de antioxidantes presentes no interior de exossomos como estratégia de validação da análise funcional realizada e também para aprofundamento dos conhecimentos a respeito dos exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com classificações clínicas distintas.

Apesar de ser um tema sabidamente relacionado com doenças neurodegenerativas, com relação a escala de estadiamento de H&Y modificada nos graus leve, moderado e avançado não existem estudos que avaliem a capacidade antioxidante e níveis de hidroperóxidos sistêmico em exossomos de pacientes na faixa etária predominante de acometimento da doença, entre 50-65 anos.

Portanto, de acordo com o descrito na seção 4.5, os exossomos foram rompidos e os níveis de hidroperóxidos, também chamado lipoperoxidação, foram quantificados. Na figura 23 estão descritos os dados para cada um dos grupos com diferentes classificações clínicas e controles pareados por idade. Foram observados níveis de hidroperóxidos aumentados nos exossomos dos pacientes do grupo leve (241364 ± 12455 URL) em comparação ao grupo controle (194876 ± 2404 URL) e ao grupo moderado (181961 ± 11314 URL).

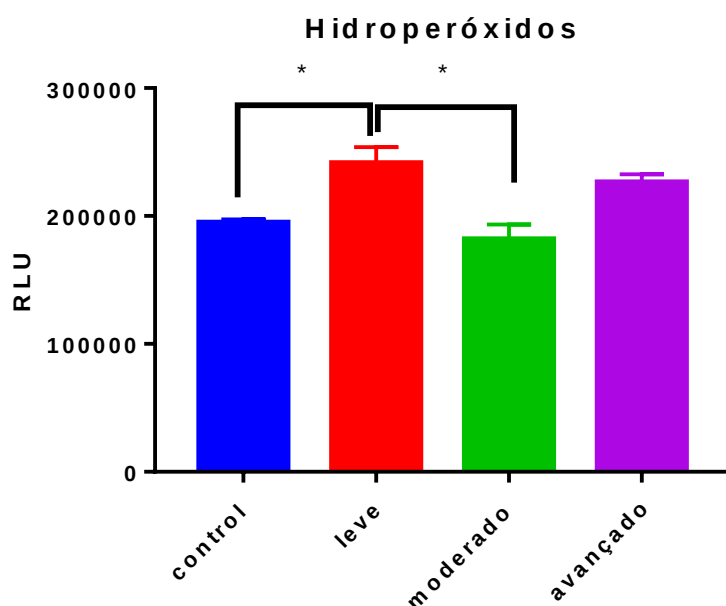


Figura 23: Quantificação de hidroperóxidos em exossomos de pacientes com DP e controles pareados por idade. As análises foram realizadas em triplicatas seguido de teste estatístico ANOVA, utilizando teste Tukey como pos-hoc. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Além dos níveis de hidroperóxidos, também chamada, de lipoperoxidação foram avaliados os níveis de antioxidantes presentes nos exossomos através da medição da capacidade antioxidante plasmática (TRAP).

Como mostra a figura 24, houve depleção dos níveis de antioxidantes em todas as amostras de exossomos de pacientes com DP em relação ao grupo controle saudáveis ($19479 \pm 322,1$ nM trolox para controles, $165,02 \pm 1126$ nM trolox para grupo leve, 15631 ± 622 nM trolox para grupo moderado e 15486 ± 384 nM trolox para grupo avançado, $p = 0,0114$, ANOVA).

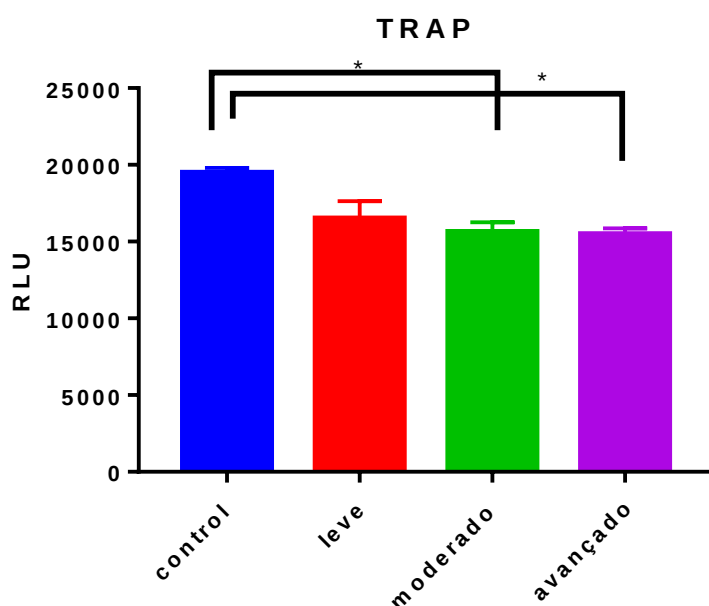


Figura 24: Perfil antioxidante de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com DP classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis. * Indica diferença estatística no teste de One-Way ANOVA e teste de Tukey como pos-hoc ($p < 0,05$). RLU = *relative light unities*.

Os dados mostram que as variações de estresse oxidativo observadas nos exossomos parecem acompanhar aquelas observadas de um modo geral em pacientes portadores de DP, onde se observa aumento dos níveis pró-oxidantes em comparação com indivíduos saudáveis e consumos das defesas antioxidantes.

Foi avaliado o índice de estresse, que engloba a relação entre os níveis de pro-oxidantes *versus* antioxidantes de cada grupo, na figura 25 pode ser observado que existe aumento do índice de estresse nos exossomos de pacientes dos grupos leve ($14,5 \pm 0,7$ URL/nM trolox) e moderado ($11,22 \pm 0,51$ URL/nM trolox) em comparação ao grupo controle saudável ($10,24 \pm 0,16$ URL/nM trolox, $p < 0,0001$, ANOVA). Este índice foi obtido através do cálculo da razão da quantificação de hidroperóxidos pelo perfil antioxidante. Destaca-se ainda os níveis de hidroperóxidos significativamente maior no grupo leve quando comparado às amostras do grupo moderado ($p = 0,0068$).

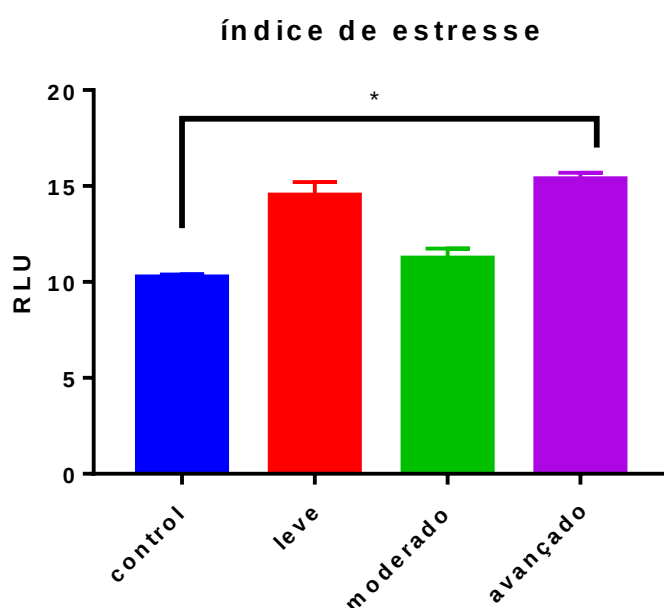


Figura 25: Índice de estresse oxidativo presente em amostras de exossomos enriquecidos do plasma sanguíneo de pacientes com DP classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis. * Indica diferença estatística no teste de One-Way ANOVA e teste de Tukey como pos-hoc ($p < 0,05$). RLU = *relative light unities*.

Os exossomos dos pacientes dos grupos leve e avançado apresentam um índice de estresse elevado em relação ao controle, sugerindo que os níveis de estresse oxidativo dos exossomos estejam relacionados ao perfil de evolução clínica da doença.

6 DISCUSSÃO

A presente dissertação teve como objetivo desenvolver um estudo de caso-controle para explorar o perfil proteômico de exossomos enriquecidos de plasma sanguíneo de pacientes com DP em diferentes estágios e indivíduos controles saudáveis. A hipótese levantada de acordo com a literatura foi que exossomos exibiriam composições bioquímicas distintas durante o desenvolvimento da DP, uma vez que, embora desempenhem um papel importante na comunicação intercelular e influenciem processos fisiológicos e patológicos, sua função na DP ainda permanece incerta. O resultado identificou proteínas diferencialmente expressas entre os grupos clínicos de evolução em relação aos controles e também o perfil comum a todos os pacientes com DP.

Na literatura, dentre os estudos proteômicos relacionados a DP, apenas três trabalhos se destacam por analisarem a composição proteica dos exossomos em diferentes estágios da doença, utilizando abordagens de espectrometria de massas de alta resolução, eletroforese bidimensional, digestão em solução (por exemplo, FASP), bem como diferentes formas de isolamento dos exossomos do fluido corporal, como ultracentrifugação diferencial e cromatografia de exclusão por tamanho (TOMLINSON *et al.*, 2015; KITAMURA *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2019). No entanto, o presente trabalho se destaca e se torna inédito diante dos demais, pois além de utilizar métodos robustos para análise proteômica, utiliza uma coorte de pacientes com DP e controles saudáveis maior do que as utilizadas anteriormente, além de abordar a classificação clínica de acordo com a escala de H&Y modificada incluindo todos os estágios presentes e uma seleção de controles criteriosa pareada por idade. Além disso na presente dissertação foi realizada de forma inédita a quantificação da lipoperoxidação e capacidade antioxidante dos exossomos plasmáticos.

Neste estudo, foram reunidas amostras em *pool* de exossomos enriquecidos de plasma sanguíneo de pacientes com DP em diferentes estágios da escala de estadiamento de H&Y modificada e controles saudáveis, para que todas as diferenças de expressão contidas nas amostras pudessem ser incluídas e consideradas como pertencentes do grupo analisado. Essa estratégia tem sido extensivamente utilizada pelo nosso grupo em estudos proteômicos (PIZZATTI *et al.*, 2012; PANIS *et al.*, 2014; 2016; 2017; CORRÊA *et al.*, 2017; PIRES *et al.*, 2019). Os resultados demonstraram que a abordagem proteômica *label-free* detectou com sucesso as proteínas diferencialmente expressas nos estágios leve, moderado e avançado da patologia.

Para isolar exossomos do plasma humano, a ultracentrifugação é o método mais comum, considerado o padrão ouro, entretanto os métodos baseados em ultracentrifugação apresentam a desvantagem da contaminação por albumina (MOMEN-HERAVI *et al.*, 2012; KITAMURA *et al.*, 2018). Estudos que compararam a eficiência de enriquecimento de exossomos demonstraram que o *kit* comercial *ExoQuickTM*, utilizado na presente dissertação apresentou maior eficiência de enriquecimento do que as técnicas de ultracentrifugação (TANG *et al.*, 2017; DING *et al.*, 2018). Embora a ultracentrifugação tenha demonstrado maior pureza proteica dos exossomos, nem sempre é aplicável a amostras clínicas dado o grande volume de material de partida necessário e a baixa eficiência de extração do método, uma vez

que a quantidade de sangue coletado dos pacientes pode ser limitada (TANG *et al.*, 2017). Além disso, em amostras de sangue existe uma grande variedade de populações de exossomos provenientes de células distintas e nesse sentido o método de enriquecimento escolhido no presente trabalho permitiu um enriquecimento mais abrangente. Os resultados anteriores do nosso grupo demonstraram marcação negativa para calnexina nas amostras de exossomos, indicando a não contaminação com retículo endoplasmático durante a purificação com exossomos, além disso as proteínas Alix e TSG101, características de exossomos, estavam presentes em todas as preparações de exossomos, indicando que o método de enriquecimento utilizado se mostrou eficaz, além disso, previamente, para a otimização do método de enriquecimento de exossomos, também foi realizada microscopia eletrônica e análise de tráfego de nanovesículas (Letícia Giacomini. Caracterização do Conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. 2018. Tese (Doutorado em Pós-graduação em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Foram identificadas proteínas exclusivas para cada um dos diferentes grupos abordados neste trabalho. Processos biológicos distintos foram observados para estas proteínas, como por exemplo, processos relacionados a alterações no sistema imune, imunomodulação, resposta ao estresse oxidativo, ativação alternativa do complemento, transporte mediado por vesículas, dentre outros.

A *selenoprotein P* (SEPP1) proteína identificada exclusivamente e com sua expressão aumentada no grupo com classificação clínica leve, pode ser responsável por algumas propriedades extracelulares de defesa antioxidante, uma vez que já foi descrito que as selenoproteínas possuem importantes funções antioxidantes e redox, e os membros da família das selenoproteínas são conhecidos por reduzir o estresse oxidativo (BELLINGER *et al.*, 2012). Especialmente as funções antioxidantes e redox das selenoproteínas são descritas para mediar os efeitos neuroprotetores no SNC (MAASS *et al.*, 2020). Existem receptores específicos de tecido de SEPP1 na BBB que permitem que o cérebro seja classificado como o mais alto na hierarquia de tecidos de selênio (Se), ele expressa todas as selenoproteínas. SEPP1 representa 73% do total de Se no plasma e é o principal portador de Se no cérebro (ZHANG *et al.*, 2019). Na DP, diversos estudos sugerem uma contribuição do Se para o desenvolvimento da doença. SEPP1 é descrito para representar a proteína de ligação ao Se mais importante. Um estudo *pós-mortem* recente demonstrou a concentração

de SEPP1 no centro dos CL, mostrando sua co-localização com expressão de α -SIN no mesencéfalo de pacientes com Parkinsonismo (MAASS *et al.*, 2020). A co-localização de SEPP1 com α -SIN e sua concentração nos CL, sugere uma interação durante o desenvolvimento da DP, uma vez que já foi visto que esta proteína pode interagir especificamente com agregados de proteínas mal enoveladas, tendo em vista a descoberta anterior de SEPP1 dentro dos núcleos de placas β amilóides e co-localizando com emaranhados neurofibrilares contendo tau (BELLINGER *et al.*, 2012). De uma perspectiva bioquímica, o aumento do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial geralmente ocorrem durante a patogênese da DP. Sendo assim, uma ligação entre as selenoproteínas, como por exemplo a SEPP1 e a DP pode ser pensada, considerando que a maioria das selenoproteínas é demonstrada ou prevista como oxiredutase. Além disso, como o dano oxidativo e instabilidade no genoma são defeitos comuns na DP, as selenoproteínas capazes de regulação redox e ligação ao DNA são mediadores plausíveis desses distúrbios neurodegenerativos (ZHANG *et al.*, 2019). Um aumento na concentração de SEPP1 pode sugerir um aumento na resposta a condições patológicas, como estresse oxidativo, uma vez que os resultados apresentados na seção 5.3 mostraram um maior índice de estresse oxidativo nas amostras dos pacientes comparados com os controles saudáveis, bem como, também foi observado uma maior concentração de hidroperóxidos no grupo de pacientes classificados como grau leve em relação aos controles e uma diminuição da capacidade antioxidante nos grupos classificados clinicamente quando comparados aos controles. Com isso, o desenvolvimento de estudos para quantificação específica desta proteína seriam uma abordagem interessante, visando um biomarcador para a DP.

Chitinase-3-like protein 1 (YKL40), outra proteína encontrada exclusivamente e com expressão aumentada no grupo de pacientes com classificação clínica leve, acredita-se que esta desempenhe um papel no processo de inflamação e remodelamento dos tecidos. YKL40 é uma glicoproteína super regulada em condições inflamatórias, sendo expressas no cérebro principalmente em microglia e astrócitos (HALL *et al.*, 2016). Seus níveis foram relatados como elevados em distúrbios neurológicos agudos, como lesão cerebral traumática e acidente vascular cerebral, bem como em distúrbios crônicos, como esclerose lateral amiotrófica (ELA) e esclerose múltipla, também já foram relatados concentrações elevadas de YKL40 no

LCR de pacientes com DA pré clínica leve e em indivíduos com comprometimento cognitivo leve (WENNSTRÖM *et al.*, 2015). Diversas citocinas estimulam a síntese de YKL40 no processo de inflamação, tumorigênese e fibrose tecidual (DICHEV; KAZAKOVA & SARAFIAN, 2020). Estudos apontam que a concentração de YKL40 aumenta significativamente com o decorrer da DP e que está associado a um declínio cognitivo mais rápido. Foi demonstrado que a ativação microglial se correlaciona positivamente com a gravidade dos SM e isso está de acordo com os dados atuais que mostram que níveis crescentes de YKL40 estão associados a uma piora da função cognitiva na DP (HALL *et al.*, 2016). Foi relatado que as concentrações de YKL40 são menores nos distúrbios degenerativos denominados sinucleinopatias em comparação aos denominados taupatias (OLSSON *et al.*, 2013; DICHEV; KAZAKOVA & SARAFIAN; 2020). Num estudo prospectivo, foi observado um aumento nas concentrações de YKL40 no LCR em todos os pacientes com DP após 2 anos de acompanhamento em comparação com os níveis basais (HALL *et al.*, 2016; DICHEV; KAZAKOVA & SARAFIAN; 2020). Há uma suspeita de que os níveis dessa glicoproteína correspondam à ativação glial e à quantidade de células envolvidas no processo degenerativo (DICHEV; KAZAKOVA & SARAFIAN; 2020). Consequentemente, o YKL40 pode ser um marcador possível em ensaios terapêuticos, não apenas sua concentração, mas também sua dinâmica durante o curso da doença.

C-reactive protein (CRP) foi identificada exclusivamente e com expressão aumentada no grupo com classificação clínica moderado. CRP é uma proteína de fase aguda medida para monitorar a gravidade da doença em condições inflamatórias agudas e crônicas. Na idade avançada, concentrações elevadas de CRP circulante predizem independentemente morbidade, limitações funcionais e mortalidade. Sua concentração plasmática é aumentada durante resposta de fase aguda a lesão tecidual, infecção ou outros estímulos inflamatórios, mostrando seu envolvimento relacionado à defesa do hospedeiro. Algumas pesquisas sugerem que níveis elevados de CRP estão intensamente associados ao processo inflamatório. Estudos também demonstraram uma ligação entre a CRP e doenças inflamatórias e neurodegenerativas crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, acidente vascular cerebral, DA e DP (QIU *et al.*, 2019). Alta concentração de CRP já foi associada à velocidade lenta da marcha e pode prever mobilidade, incapacidade e

declínio acelerado da velocidade de caminhada em adultos mais velhos (SANTOS-GARCÍA *et al.* 2019). Já foi descrito anteriormente, que a DP está associada ao aumento nos níveis de CRP tanto no sangue periférico quanto no LCR. No entanto, ainda não está claro se as elevações nos níveis de CRP contribuem para a neurodegeneração ou ocorrem como resultado de uma resposta inflamatória desencadeada pela DP (PICCA *et al.*, 2020).

Níveis elevados de CRP podem ser um dado de fase aguda inespecífico ou atuar como um marcador do envelhecimento biológico (SOUSA *et al.*, 2016). Outro estudo com pacientes com DP, mostrou uma associação dos níveis basais de CRP no plasma com a deterioração motora e prognóstico motor predito em pacientes independente do sexo, idade, gravidade da DP, demência e agentes anti-parkinsonianos, sugerindo que inflamações sistêmicas subclínicas podem acelerar a neurodegeneração na DP (UMEMURA *et al.*, 2015; LUAN; YAO, 2018). Pacientes com DP mais grave, classificados de acordo com a escala de estadiamento de H&Y, apresentaram níveis significativamente mais altos de CRP do que aqueles em estágio inicial e indivíduos não parkinsonianos. Além disso, foi visto que CRP pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da DP e elevações no nível plasmático da CRP se correlacionam com um risco aumentado de desenvolvimento da doença (LUAN; YAO, 2018). Evidências recentes podem indicar que a inflamação sistêmica contribui para a exacerbação da doença neurodegenerativa crônica (LANSEK & DANOUDIS, 2016; SANTOS-GARCÍA *et al.*, 2019).

Uma revisão sistemática e meta-análise foi realizada a partir de estudos referentes a análises dos níveis séricos, plasmáticos sanguíneos e LCR de CRP em pacientes com DP na intenção de esclarecer seu potencial risco. Foi revelado que os níveis desta proteína do sangue e LCR foram significativamente elevados em pacientes com a doença quando comparados com controles saudáveis, indicando que a CRP pode ser um fator de risco para DP ou DP pode levar a uma resposta inflamatória (QIU *et al.*, 2019). Além disso, a CRP consegue ultrapassar a BBB em pequenas quantidades. No entanto, concentrações acima de um certo limiar prejudicam as funções da BBB, aumentando a permeabilidade paracelular.

O aumento de proteínas inflamatórias no SNC resulta em um aumento nos níveis de proteínas inflamatórias periféricas passando pela BBB, devido ao aumento

da permeabilidade causada por neuroinflamação ou estimulação da produção de proteínas inflamatórias periféricas. Nesse caso, a concentração periférica de proteínas inflamatórias pode refletir as alterações neuroinflamatórias no SNC (BARAN *et al.*, 2018). Embora atualmente não exista uma demonstração formal do mecanismo de ação da CRP na patogênese da DP, há um aumento contínuo de dados experimentais.

Profilin-1 (PFN1) é outra proteína identificada exclusivamente e com expressão aumentada no grupo moderado. É crucial para a conversão de actina monomérica em actina filamentosa, pois sequestra monômeros de actina citosólica e catalisa a montagem de monômeros em actina filamentosa. Além de ser necessária para o desenvolvimento inicial do cérebro (DEL POGGETTO *et al.*, 2018; NEKOU EI *et al.*, 2019; PEREIRA; TELLINI; MESQUITA, 2019). O PFN1 está envolvido em muitos processos celulares através da interação com diversos parceiros de ligação, incluindo proteínas estruturais em neurônios, fatores de crescimento, partículas ribonucleares e proteínas envolvidas em cascatas de sinalização. Essa proteína também desempenha papéis importantes no tráfego de membranas, processamento e transcrição de RNA, sinalização GTPase, e crescimento e diferenciação neuronal (PEREIRA; TELLINI; MESQUITA, 2019).

Nos neurônios, a PFN1 é essencial para o desenvolvimento neuronal, formação e manutenção do citoesqueleto neuronal, formação e atividades sinápticas, bem como a dinâmica morfológica e o crescimento dos dendritos e axônios. Embora essa proteína tenha sido descoberta há muito tempo e tenha sido extensivamente estudada, seu potencial papel na doença nos neurônios motores gerou interesse em sua biologia (KIAEI *et al.*, 2018).

Sabe-se que as mutações em PFN1 causam distúrbios da proteostase, os quais são evidenciados pela presença de marcadores biológicos como por exemplo, formação de inclusões citoplasmáticas de proteínas (TANAKA *et al.*, 2016). É conhecido que mutações em seu gene levam a desestabilização do estado nativo da proteína, resultando em perturbações estruturais que levam à agregação de proteínas (LIM; KANG; SONG, 2017; PEREIRA; TELLINI; MESQUITA, 2019). Sendo possível que tais distúrbios também contribuam para eventos na DP, tendo em vista que a patologia também é marcada por alterações de enovelamento e agregação de α -SIN.

O mecanismo de PFN1 e suas mutações, são muito estudados para compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia da ELA. (KIAEI *et al.*, 2018).

Análise proteômica da região da substância negra do cérebro humano demonstrou a regulação positiva de PFN1 em pacientes com DP em comparação com indivíduos controle, esse resultado fornece evidências de função mitocondrial e antioxidante interrompida na DP (DIXIT *et al.*, 2019).

A proteína *Heat Shock cognate 71 kDa protein* (HSC70) foi uma das proteínas identificadas exclusivamente e com expressão aumentada no grupo de pacientes com classificação avançado. Esta proteína é uma chaperona molecular que está implicada em uma ampla gama de processos, incluindo proteção do proteoma ao estresse oxidativo, enovelamento e transporte de polipeptídeo recém-sintetizados, ativação da proteólise de proteínas mal enoveladas e formação e dissociação de complexos proteicos. Desempenha um papel fundamental no sistema de controle de qualidade das proteínas, assegurando o enovelamento correto das proteínas, o re-enovelamento de proteínas mal enoveladas e controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação (BURTE *et al.*, 2011; GRÜNBLATT *et al.*, 2018). HSC70 também tem um papel fundamental no transporte de proteínas específicas para as mitocôndrias. Na última década, essa proteína foi associada a alguns distúrbios caracterizados pelo desenovelamento de proteínas, como DA, DP e doença de Huntington (TAYLOR *et al.*, 2018). HSC70 foi vista em estudo com imunohistoquímica presentes em CL na substância negra, CL corticais e também em CL do tronco cerebral. Ou seja, esta proteína foi identificada colocalizando com α -SIN não apenas no córtex temporal, mas também em outras regiões neocorticais. Embora se saiba pouco sobre essa proteína na patogênese da DP, ela tem sido reconhecida como uma chaperona molecular chave que facilita a degradação de diversas proteínas, incluindo a SOD1 mutante, em uma via dependente de UPS. HSC70 tem sido implicada na fusão e endocitose de membrana, diferenciação neuronal, estresse oxidativo e apoptose (LEVERENZ *et al.*, 2007). BANKS *et al.* (2020) em seu trabalho, corrobora pesquisas anteriores que apontavam uma interação entre a α -SIN e HSC70, segundo os autores, essa proteína se liga a α -SIN solúvel e fibrilar na ausência de nucleotídeos e inibe a formação de fibrilas *in vitro*, levando ao aumento da viabilidade celular. Outros estudos obtiveram os mesmos resultados, demonstrando que HSC70 liga proteínas citosólicas contendo o motivo KFERQ, induzindo seu transporte seletivo para as VILs. Pode-se afirmar que

esta proteína também apresenta um papel na triagem de carga para os exossomos, ela medeia a associação entre os constituintes citosólicos e proteínas da membrana exossômica (PUSPITA *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2020). Tais fatos podem apontar um potencial alvo para orientação dos estudos terapêuticos visando a patologia da DP.

Filamin-A (FLNA) proteína identificada exclusivamente e com expressão aumentada no grupo controles saudáveis, devemos levar em conta que então podemos dizer que ela está ausente ou em quantidades ínfimas que não foi possível ser detectada em nenhum dos nossos grupos de pacientes com DP. FLNA é uma fosfoproteína *cross-linking* de actina expressa ubiquamente que é um importante determinante estrutural do citoesqueleto submembranoso das células animais (ZANG; HUANG; BORDEY, 2016; LIN *et al.*, 2001). A dimerização de FLNA é necessária para o *cross-linking* de actina, um recurso essencial para manter a integridade do citoplasma cortical. Os receptores de dopamina são o primeiro grupo de receptores acoplados à proteína-G para os quais foi descrita uma interação com FLNA. Os estudos de co-localização, juntamente com a interação bioquímica definida, sugerem fortemente a probabilidade de uma interação fisiológica entre FLNA e receptores de dopamina no cérebro de mamíferos (LIN *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado em neurônios de ratos, que FLNA interage com receptores dopaminérgicos D2 e D3. Foi relatado que pacientes com DP que apresentam psicose exibem sinais anormais de ressonância magnética no lobo frontal, giro cingulado e hipocampo, em contrapartida, em ratos adultos, os neurônios expressam fortemente FLNA nessas regiões. Os receptores D2 e de FLNA co-localizam em neurônios e astrócitos do estriato (DEGOS *et al.*, 2016). Os receptores de dopamina D2 estão presentes nas membranas astrocíticas dentro do córtex pré-frontal. A FLNA também interage com os receptores de dopamina D3, que estão presentes principalmente no córtex frontal. Sendo assim, foi especulado no trabalho de DEGOS *et al.* (2016) que o paciente Parkinsoniano PINK1 o qual estava sendo analisado, possa ser o resultado da interação alterada de FLNA com o sistema dopaminérgico. Como FLNA é necessário para direcionar ou estabilizar corretamente os receptores dopaminérgicos na membrana plasmática, mutações no gene ou diferenças em sua expressão, podem alterar o funcionamento do sistema dopaminérgico e, em seguida, influenciar o fenótipo de pacientes Parkinsonianos.

Assim como FLNA, a *peroxiredoxin 1* (PRX1) também foi identificada exclusivamente e com regulação aumentada no grupo de controles saudáveis. A família PRX, composta por seis proteínas antioxidantes (PRX1, 2, 3, 4, 5 e 6) é uma das famílias de proteínas reguladoras redox que mantêm o meio redutor intracelular, sua principal função é proteção do acúmulo de radicais livres (JIAN *et al.*, 2017). A expressão de PRX1 é glial. Foi relatada além de uma expressão proeminente de PRX1 glial, algumas populações neuronais como, camada granular do bulbo olfativo, alguns neurônios corticais, alguns núcleos hipotalâmicos, motores, camada granular do cerebelo e neurônios motores. Além disso foi descoberto que algumas das proteínas da família PRX, incluindo PRX1, estão localizadas em astrócitos (GOEMAERE; KNOOPS, 2002). A modulação das vias de sinalização p38-MAPK e caspase-3 está sendo definida como o mecanismo molecular pelo qual PRX1 exerce um papel protetor em modelos experimentais de DP, apoiando-o como um importante regulador da via de morte celular (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

Além das proteínas destacadas, outras também foram identificadas exclusivamente nos grupos do presente trabalho. No grupo leve identificamos *mannan-binding lectin serine protease 2* (MASP2), proteína importante relacionada a ativação das vias do sistema complemento. É uma das proteases iniciais da via da lectina (DABÓ; KOCSIS; GÁL, 2018); *Collagen alpha-1 (I) chain* (COL1A2) é um constituinte estrutural da matriz extracelular relacionado com a coagulação do sangue, regulação da resposta imune dentre outros; *Protein S100-A8* (S100A8) é uma proteína de ligação ao cálcio e ao zinco que desempenha um papel importante na regulação de processos inflamatórios e na resposta imune. Neste estudo, esta proteína foi identificada exclusivamente no grupo leve, no entanto, JIANG *et al.* (2019) identificou a proteína S100 como única em suas análises do grupo que considerou com classificação clínica avançado, utilizou todos os pacientes com pontuação maior que 3 na escala de H&Y modificada. Um estudo referente a isquemia-hipóxia demonstrou que S100A8 regula processos inflamatórios e imunológicos e pode melhorar os danos nos tecidos causados por ERO, além de estar envolvida na sinalização de cálcio (KYNG *et al.*, 2018); e *Adenylyl cyclase-associated protein 1* (CAP1) está envolvida na via AMPc. CAP1 consiste em 4 domínios envolvidos na ligação à actina, desempenham um papel em sua renovação (FAN *et al.*, 2016). Pouco se sabe sobre

o envolvimento desta proteína em doenças neurodegenerativa e no SNC, mais estudos sobre seu mecanismo de ação precisam ser realizados.

No grupo moderado além das proteínas destacadas, foram identificadas também, *lumican* (LUM), um proteoglicano de sulfato de queratano distribuído em matrizes colágenas intersticiais por todo o corpo, pode regular a organização das fibrilas de colágeno e o crescimento circunferencial, a transparência da córnea e a migração de células epiteliais e reparo de tecidos (DAOUD *et al.*, 2011); *Pyruvate kinase PKM* (PKM), proteína relacionada ao metabolismo energético. Foi demonstrado que PKM pode ser um coativador transcricional do Nrf2, que coopera com a função metabólica para desviar o fluxo de glicose para a via da pentose fosfato e, assim, gera GSH suficiente para a desintoxicação das ERO (WEI *et al.*, 2020). Nrf2 é considerado um regulador mestre da resposta antioxidante do organismo, sendo um mecanismo de importância para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular, além disso, ao interagir com outras vias, Nrf2 possui um papel importante na regulação do metabolismo, atuando no metabolismo dos lipídeos, manutenção da glicemia, resposta inflamatória, dentre outros (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017). PKM medeia a produção de GSH induzida por receptores D2 de dopamina, os quais são expressos seletivamente em astrócitos, indicando que a dimerização do PKM é uma abordagem ideal para restaurar a síntese de GSH e evitar efeitos colaterais induzidos por efeitos nas funções dos neurônios, tornando-o um alvo potencial para o tratamento da DP, segundo WEI *et al.* (2020); *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), componente da matriz extracelular pentamérica grande, membro da família de genes da trombospondina, apresentando propriedades adesivas conhecidas por mediar interações célula-célula e célula-matriz (POSEY *et al.*, 2019); *Complement factor H-related protein 5* (CFHR5), proteína que também está relacionada ao sistema complemento. O fator H é um regulador negativo essencial da ativação do complemento C3 da via alternativa do sistema (ZHU *et al.*, 2018). CFHR5 é produzido no fígado, circula no plasma e funciona como uma proteína reguladora do complemento. No entanto, seu mecanismo preciso na regulação do complemento ainda é desconhecido (ZHAI *et al.*, 2016); *Sex hormone-binding globulin* (SHBG), funciona como uma proteína transportadora de andrógenos. Regula a taxa de depuração metabólica plasmática dos hormônios esteroides, controlando sua concentração plasmática. Muller *et al.* (2010) levantaram a hipótese de que SHBG

modula o risco de demência, uma vez que achados de estudos observacionais transversais demonstraram que pacientes com DA apresentavam níveis mais altos dessa proteína e que esses indivíduos obtiveram pontuações mais baixas nos testes cognitivos. Alternativamente, o aumento de SHBG tem sido associado ao aumento da idade, o que pode indicar que o SHBG é um marcador para o envelhecimento acelerado; *Complement factor D* (CFD), enzima limitadora da taxa de ativação na via alternativa do complemento expressa principalmente por adipócitos e macrófagos, também conhecido como adipsina, hormônio semelhante a citocina, produzida principalmente por adipócitos que podem afetar processos imunológicos em todo o corpo. Essas adipocitocinas também parecem apresentar um papel em alguns distúrbios autoimunes (KORMAN *et al.*, 2017; MARTÍNEZ *et al.*, 2017). Maiores concentrações desta proteína são encontradas no LCR em estudos de pacientes com ELA em comparação com indivíduos controles, uma vez que o CFD pode atravessar a BBB (MARTÍNEZ *et al.*, 2017). Adipocitocinas podem estar associadas a neuroinflamação.

Já no grupo avançado, além da proteína destacada, nós identificamos também *proteoglycan 4* (PRG4), glicoproteína semelhante à mucina que foi identificada e caracterizada no líquido sinovial. É expressa e secretada pelas células que revestem as articulações, sinoviócitos e condrócitos. Esta proteína interage com as células do sistema imunológico que efetivamente revestem essas células, para que não respondam aos níveis antecedentes de citocinas pró-inflamatórias. Evidências demonstram o envolvimento de PRG4 com doenças inflamatórias de maneira adicional a suas propriedades de lubrificação. A eliminação do PRG4 das células imunológicas, permite a propagação da resposta inflamatória. A perda dessa proteína pode levar ao atrito, que por sua vez leva a uma resposta pró-inflamatória, são mecanismos distintos e aditivos (DAS *et al.*, 2018); *Vitamin K-dependent protein Z* (PROZ), esse gene codifica uma glicoproteína dependente da vitamina K sintetizada no fígado e secretada no plasma (MCQUILLAN *et al.*, 2003). É um membro da família de fatores de coagulação plasmática dependentes de vitamina K (LICHY *et al.*, 2003). Estudos apontam uma associação de concentrações elevadas de proteína Z em subtipos etiológicos do acidente vascular cerebral isquêmico. No entanto, ainda precisa ser esclarecido se seus níveis elevados estão elevados como consequência do acidente vascular cerebral ou se seriam a causa, ou ainda, se podem ser

importante na patogênese da aterotrombose (MCQUILLAN *et al.*, 2003); *Ficolin-2* (FCN2), proteína que pode funcionar relacionada a imunidade inata, através da ativação da via da lectina, do sistema complemento (BLASIO *et al.*, 2019). Foi demonstrado uma associação de FCN2 com a patologia da DA, através da associação de proteína com A β 42 no LCR, mas não a Tau também no LCR de pacientes de uma coorte de demência de Amsterdã, que sugere que essa associação seja motivada por uma interação com a patologia amilóide (WESTWOOD *et al.*, 2018). Já foi mencionado que FCN2 pode se ligar a componentes pentraxinas, CRP, pentraxina 3 e amilóide P sérico (KILPATRICK; CHALMERS, 2012), algumas dessas identificadas no presente estudo; *Insuline-like growth factor II* (IGF2), é um regulador do crescimento e metabolismo celular. Deficiência dos mecanismos de sinalização de IGF cerebral mediam a disfunção metabólica cerebral. Essa proteína está relacionada com estresse oxidativo, perda neuronal e plasticidade neuronal prejudicada. Foi demonstrado que IGF2 pode ter algum papel em distúrbios motores, incluindo variantes de doenças dos neurônios motores. Níveis reduzidos do receptor de IGF2 ocorrem na DA e DP, particularmente nos estágios finais das doenças. A diminuição desses receptores leva a déficits motores e de fala (LIOU *et al.*, 2019); *L-lactate dehydrogenase B chain* (LDHB), lactato desidrogenase, uma enzima tetramérica que compreende duas subunidades (LDHA, LDHB), é uma enzima importante que catalisa a transformação reversível do piruvato em lactato. A regulação positiva da lactato desidrogenase garante um metabolismo anaeróbio/glicolítico eficiente para células tumorais e reduz a dependência de oxigênio (CHEN *et al.*, 2006). Foi observado que a disfunção mitocondrial no cérebro leva a uma mudança metabólica da respiração aeróbica para o metabolismo glicolítico, resultando em alterações na expressão dos genes da lactato desidrogenase (LDHA, LDHB). O metabolismo do lactato cerebral e sua compartimentalização em astrócitos, neurônios e em outros lugares não são totalmente compreendidos. Foi sugerido que o lactato constitui uma fonte alternativa de energia que o cérebro utiliza em situações exaustivas. Além disso, o aumento da razão de expressão do gene LDHA/LDHB é causador dos altos níveis de lactato no cérebro, podendo prever o envelhecimento (ROSSA *et al.*, 2010); *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3* (ITIH3), apresenta capacidade de se ligar ao ácido hialurônico, estabilizando a matriz extracelular. Foi demonstrado que ITIH3 está envolvido em processos de adesão e organização estrutural, além de codificar um

inibidor de serina protease envolvido na estabilização da matriz extracelular (FABBRIA *et al.*, 2017).

No grupo dos controles saudáveis, além das proteínas destacadas, também foram identificadas, *Integrin alpha-1* (ITGA1) esta proteína heterodimeriza com a subunidade $\beta 1$ para formar um receptor de superfície celular para colágeno e laminina. As subunidades de ITGA1 são apenas fracamente expressas durante a indução de crescimento de neurites, no entanto, aumento em estágios posteriores, durante a extensão e estabilização das mesmas (DEMIRAY *et al.*, 2018); *Serum amyloid A-4* (SAA4), nos seres humanos, a proteína amilóide sérica, é uma das principais proteínas de fase aguda. Apesar de ter sido extensivamente estudada, seu papel preciso ainda não é completamente entendido. SAA4 é constitutivamente presente no sangue, diferindo de SAA1 e SAA2, que são induzidas principalmente quando ocorre inflamação, apresentando funções pró e anti-inflamatórias. Esta última foi identificada com expressão aumentada no grupo de classificação clínica leve. SAA4 não é induzível por estímulos inflamatórios, sendo assim, a expressão de SAA4 não é identificada super expressa em tecidos doentes ou em células estimuladas por mediadores inflamatórios, como acontece com os demais membros desta família de proteínas (DE BUCK *et al.*, 2016). Pouco se sabe ainda sobre o papel de SAA4; *Beta-Ala-His dipeptidase* (CNDP1) é uma proteína sérica, um dipeptídeo encontrado em concentrações altas no músculo esquelético, coração e cérebro, possui uma variedade de propriedades antioxidantes ou citoprotetoras, incluindo a eliminação de radicais livres, a formação de complexos com metais de transição e efeitos antiglicantes. Foi relatado que essa proteína prolonga a vida útil de células cultivadas, aumenta a sobrevivência de roedores, sugerindo que possa atuar como uma substância anti envelhecimento que ocorre naturalmente (ZSCHOCKE *et al.*, 2006); *Ras-related protein Rap-1b* (RAP1B), este gene codifica um membro da superfamília da proteína de ligação ao GTP do tipo RAS que possui atividade intrínseca de GTPase. Os membros dessa família regulam diversos processos celulares incluindo adesão, crescimento e diferenciação celular. Esta proteína localiza-se nas membranas celulares e demonstrou regular a sinalização celular mediada por integrina (YANG *et al.*, 2015).

Entretanto, nem todas as proteínas com diferença de expressão foram identificadas como exclusivas em algum dos grupos, como é o caso da *alpha-2-HS-*

glycoprotein (AHSG) que foi encontrada com sua expressão diminuída em relação a todos os grupos clínicos (leve, moderado e avançado) e consequentemente com sua expressão aumentada no grupo controle. AHSG é uma glicoproteína sérica sintetizada pelos hepatócitos, inibidor de protease da cisteína secretada no fígado para inibir a calcificação vascular, impedindo a precipitação mineral espontânea na vasculatura (MORI; EMOTO; INABA, 2011; SMITH *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2019). Está envolvida em diversos processos, incluindo endocitose, desenvolvimento cerebral e formação de tecido ósseo. Apresenta ações anti-inflamatórias sob lesões e infecções agudas, uma vez que tem seus níveis reduzidos a partir de inflamação aguda e outros tipos de estresse, sendo regulado por mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α (MORI; EMOTO; INABA, 2011; SHI *et al.*, 2019). Um estudo mostrou que o nível plasmático baixo de AHSG estava relacionado ao comprometimento cognitivo dos pacientes com DA leve a moderada, acompanhado pela maior concentração de TNF- α , o que em parte pode ser explicado pela presença de inflamação subclínica. Como reagente de fase aguda negativo, a síntese hepática de AHSG é suprimida pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (SMITH *et al.*, 2011). Ainda não está claro se a AHSG é realmente neuroprotetora ou se essa proteção é apenas mediada por funções anti-inflamatórias.

Serum amyloid P-component (APCS) foi identificada com sua expressão aumentada em todos os grupos com classificação clínica abordados neste estudo. É uma glicoproteína pertencente à família de proteínas pentraxina, a qual possui uma organização pentamérica característica. Sabe-se que muitos tipos de depósitos amilóides contêm APCS, o que pode representar cerca de 14% da massa seca do depósito. Esta proteína foi identificada pela primeira vez como constituinte pentagonal de amilóide patológico *in vivo* (CHEN; LIN; WANG, 2011). APCS se liga a fibrilas amilóides derivadas de precursores, incluindo *serum amyloid A*, proteína também identificada no presente trabalho, cadeia leve de imunoglobulina e apolipoproteína A1 (BEHRENS *et al.*, 2019). Uma imunorreação de APCS foi demonstrada em emaranhados neurofibrilares da DA, DP e outras doenças neurodegenerativas. Supõe-se que seu papel principal na amiloidogênese seja melhorar a formação e deposição de fibrilas ao se ligar a sua superfície num mecanismo dependente de cálcio, estabiliza agregados amilóides, impedindo a clivagem proteolítica e portanto, inibindo a remoção de fibrilas através de mecanismos normais de eliminação de

proteínas (CHEN; LIN; WANG, 2011; OZAWA *et al.*, 2016). É sugerido que o extravasamento da BBB possa se relacionar com a elevação dos níveis de APCS plasmática em pacientes com DP, sendo uma das principais causas desse extravasamento a inflamação crônica. Isso implica que a inflamação crônica desempenha um papel importante na patogênese da doença, o que pode induzir simultaneamente um nível mais alto de APCS e danos à BBB (CHEN; LIN; WANG, 2011). Além do seu papel nos depósitos amilóides, essa proteína é diretamente neurotóxica para os neurônios, ela se liga, é internalizada, trafega para o núcleo onde se liga a cromatina e leva a morte celular apoptótica (AL-SHAWI *et al.*, 2016).

Clusterin (CLU) foi identificada com sua expressão aumentada em nossos grupos com classificação clínica leve e avançado, além de também ter sido identificada nos artigos de KITAMURA *et al.* (2018), no entanto com sua expressão reduzida em comparação com o grupo controle e JIANG *et al.* (2019), onde teve sua identificação e expressão aumentada progressivamente do grupo DP leve para avançado. A diferença encontrada em relação a sua expressão com KITAMURA *et al.* pode ser dada pelo fato da utilização da técnica de eletroforese bidimensional juntamente com análise por MALDI-TOF/TOF no estudo, podendo ocorrer eventualmente uma perda relativamente substancial de amostra durante o processo de análise. CLU, conhecida anteriormente por apolipoproteína J, é uma chaperona molecular vital implicada no enovelamento correto de proteínas secretadas e responsável pela liberação de peptídeos acumulados. Além disso, também exerce um papel na modulação da inflamação e apoptose, as quais são alterações patológicas comuns na demência. Diversos polimorfismos preditos para esse gene são associados a patologia da DA (YANG *et al.*, 2019). É secretada pelos astrócitos e pode inibir a cascata do complemento na formação do complexo de ataque à membrana. Esta proteína pode ter papéis complexos nos processos neurodegenerativos. Além de sua atividade como inibidor do complexo de ataque à membrana, esta glicoproteína multifuncional pode promover a agregação celular e servir como chaperona na prevenção da agregação de proteínas desnaturadas (GREWAL; MORGAN; FINCH, 1999). CLU plasmática parece estar relacionada ao risco de demência e atrofia cerebral. Níveis alterados de CLU podem ser prejudiciais na DP, promovendo a agregação e reduzindo a depuração de proteínas que iriam expor os neurônios à proteotoxicidade intracelular. Uma outra possibilidade está

relacionada a perda do efeito protetor da CLU contra danos induzindo estresse oxidativo, o que pode aumentar a vulnerabilidade dos neurônios a insultos, como depleção de dopamina ou agregação de proteínas (SAMPEDRO *et al.*, 2020). Um estudo recente identificou CLU por MS como uma proteína abundante em exossomos neuronais de soro de pacientes com DP e outras proteinopatias, sugerindo que a abundância diferencial dessa proteína poderia ser útil para distinguir pacientes com DP de síndromes Parkinsonianas atípicas relacionadas a tau (JIANG *et al.*, 2020).

Adiponectin (APN) foi identificada com sua expressão aumentada nos grupos com classificação clínica leve e moderada. É secretada pelas células adiposas, aumenta a sensibilidade à insulina, possui propriedades antiaterogênicas e regula os níveis de glicose e a quebra de ácidos graxos. Esses efeitos são mediados por receptores APN 1 e 2 e por T-caderina, estando associados a diferentes vias de sinalização incluindo AMPK e são amplamente expressos no cérebro humano, sugerindo que APN pode estar intrinsecamente relacionada à função neurológica e consequentemente a patologia neurológica. Além disso, alguns estudos relataram a relação entre o nível de APN e distúrbios neurológicos, como DA, esclerose múltipla e doença de Huntington (YANG *et al.*, 2015; KATAOKA; SUGIE, 2020). Foi demonstrado por imunocoloração de APN no cérebro humano que essa proteína foi imunopositiva em CL positivos para α -SIN fosforilada em cérebro de indivíduos com DP ou demência com CL (SEKIYAMA *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado níveis elevados desta proteína em amostras de DP comparadas com controle e também uma forte correlação positiva entre os níveis de APN e colesterol HDL em pacientes com DP. Nesse mesmo estudo, os níveis séricos de HDL de pacientes com DP foram significativamente maiores do que os de pacientes com paralisia supra nuclear ou controles. Essa observação pode ser atribuída à forte correlação positiva entre os níveis de APN e HDL nos pacientes com DP. Além de ter sido sugerido que APN desempenhe um papel na composição dos *lipid rafts* (KATAOKA; SUGIE, 2020). Esta proteína também modula a inflamação, reduzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . Outro estudo demonstrou que seus níveis séricos em pacientes com DP foram semelhantes aos níveis encontrados em indivíduos jovens saudáveis e com peso normal pareados pelo índice de massa corporal (IMC), encontrando também uma correlação entre os níveis séricos desta proteína com o colesterol HDL, o que é consistente com as suas propriedades antiaterogênicas

conhecidas. Foi estabelecido que na população em geral, a síntese de adiponectina é estimulada quando a quantidade de tecido adiposo diminui, ao contrário das demais adipocinas (CASSANI *et al.*, 2011). Em indivíduos com DP, a perda de peso é comumente observada e pode envolver principalmente os tecidos adiposos (KATAOKA; SUGIE, 2020). No entanto, análises mais precisas quanto a concentração de APN em pacientes com DP e controles saudáveis precisam ser realizadas para uma melhor compreensão do papel desta proteína da patologia da doença.

Glutathione peroxidase 3 (GPX3) foi identificada com sua expressão aumentada no grupo com classificação clínica leve, ela pertence à família de oito enzimas (GPX1-8) importantes para reduzir o peróxido de hidrogênio na água. São enzimas selenocisteínas que usam GSH como agente redutor e requerem Se para sua função antioxidante. Sua super expressão diminui a quantidade de perda de neurônios, reduz o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica em condições neurotóxicas (SMEYNE; SMEYNE, 2013). Juntamente com a SEPP1, encontrada exclusivamente no grupo com classificação clínica leve e também possuindo sua regulação aumentada em relação ao grupo controle, a GPX3 é responsável por mais de 97% de todo o Se plasmático em camundongos. Sua alta concentração no plasma pode apontar para um papel no transporte ou na homeostase do Se (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Já foi relatado que GPX3 foi altamente expressa no componente nigral medial da DP. Numa análise integrada, foi constatado a regulação de GPX3 na DP. GPX3 foi enriquecida nos processos metabólicos da via da glutathione, processos catabólicos por peróxido de hidrogênio, resposta ao estresse oxidativo, ligação à glutathione e atividade da glutathione peroxidase, todos associados ao estresse oxidativo (JIANG *et al.*, 2019). Diversos estudos na literatura verificaram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP (HASSANZADEH; RAHIMMI, 2018; JIANG *et al.*, 2019). A regulação positiva da GPX3 em condições inflamatórias era geralmente considerada como resultado do estresse oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Em conjunto, o GPX3 pode estar implicado no desenvolvimento de DP.

Serum paraoxonase / arylesterase (PON1) teve sua expressão aumentada nos grupos com classificação clínica leve e moderado. É uma glicoproteína, sintetizada no fígado e associada ao HDL. Possui atividade de paraoxanase (decomposição do

paraoxon) e atividade da arilesterase (decompõem o fenilacetato). Estudos demonstram que PON1 possui dois polimorfismos importantes na região de codificação (leucina/metionina na posição 55 - M55L e glutamina/arginina na posição 192 - Q192R), podendo influenciar sua atividade e concentração, gerando suscetibilidade variável a diferentes doenças, incluindo os distúrbios neurodegenerativos. Esta proteína tem papel protetor na toxicidade dos organofosforados e tem capacidade antioxidante que são importantes na prevenção de alguns distúrbios incluindo doenças cardiovasculares, DP e DA (KIRBAS *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2019). Além de sua função no metabolismo de organofosfato, como componente do HDL, onde suas atividades paraoxonase e arilesterase são responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes exercidas pelo HDL, PON1 atua de maneira antioxidante e antiaterosclerótica, impedindo a oxidação do LDL (KIRBAS *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2017). Qual dessas funções contribuem para o declínio cognitivo da DP ou se ambas contribuem ainda é incerto (PAUL *et al.*, 2017). A peroxidação lipídica leva a aldeídos tóxicos que são altamente reativos e podem ser hidrolisados por PON1. O papel significativo na defesa do LDL e HDL da oxidação pode ser devido a hidrólise de produtos de peróxido lipídico (KIRBAS *et al.*, 2014). Em resumo, A PON1 é uma enzima com características antioxidantes e associada às proteínas APOA1 e CLU do HDL e é capaz de metabolizar lipídios peroxidados e inibe o acúmulo de peróxidos lipídicos no HDL e no LDL (DEVECI; KARAPEHLIVAN, 2018). Em relação ao aumento ou diminuição da concentração dessa proteína em fluidos biológicos de pacientes com DP e controles saudáveis ainda é muito controverso na literatura. Mais estudos precisam ser feitos para uma maior confiabilidade dos resultados.

Além das proteínas destacadas diversas outras proteínas com atividade antioxidante, pró e anti-inflamatórias, relacionadas ao UPS, muitas proteínas que participam da regulação das vias do sistema complemento dentre outras foram identificadas neste estudo.

A ativação do sistema complemento imune inato envolve diversas proteínas, receptores e reguladores associados à membrana que interagem em forma de cascata para gerar produtos biologicamente ativos os quais normalmente protegem o hospedeiro contra patógenos. Pensa-se que o sistema complemento desempenhe um papel secundário importante na patologia imunomediada em doenças neurológicas.

As proteínas precursoras do complemento são sintetizadas predominantemente pelos hepatócitos e depois liberadas na corrente sanguínea, iniciadas para ativação pelas vias clássica, alternativa ou da lectina (BRENNAN *et al.*, 2016). Sabe-se que as sinapses são marcadas durante o desenvolvimento pós-natal normal pela via clássica do complemento para a eliminação sináptica normal. O recrutamento microglial participa da remoção de sinapses indesejadas e redundantes, através da regulação positiva da via do complemento. C1q é a proteína inicial da via do complemento e é necessária para a fagocitose de células mortas, detritos e patógenos. Recentemente essa proteína e a via do complemento também foram implicados na remoção sináptica durante a neurodegeneração. Sinapses e axônios podem ser alvos precoces da neurodegeneração induzida por inflamação nas α -sinucleinopatias através da via do complemento (ROCHA *et al.*, 2015). Esse sistema ainda é muito pouco compreendido, mas parece estar vinculado a patogênese de diversos distúrbios, incluindo DP. No entanto, uma análise mais focada e específica deve ser feita em relação a ela para uma melhor compreensão de seu mecanismo de atuação.

A inflamação é um mecanismo de autodefesa que envolve sistemas imunológicos inativos e adaptativos contra estímulos prejudiciais, mas pode causar danos quando persistir por mais tempo do que o necessário, pois contribui para o estresse oxidativo da lesão tecidual, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e fibrose (DAS *et al.*, 2018). Evidências crescentes indicam que a inflamação cerebral contribui para a patogênese de muitos distúrbios neuroimunes e neuropsiquiátricos (TSILIONI *et al.*, 2014). Além disso a literatura confirma a presença de neuroinflamação no desenvolvimento da patologia da DP, o que está de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, uma vez que, como foi apresentado acima, as amostras dos diferentes grupos apresentam proteínas relacionados com o sistema inflamatório e sua regulação, tendo sua expressão aumentada ou diminuída dependendo da interação. Além disso, foi observado vias de sinalização relacionadas ao sistema imune inato, vias de ativação do sistema complemento, dentre outras.

O funcionamento aberrante do sistema imunológico também proposto como um componente crítico da suscetibilidade a progressão da DP, tem recebido crescente atenção da década passada. As alterações imunológicas observadas têm sido difíceis

de decifrar, mas o envolvimento do sistema imunológico na DP é apoiado por vários estudos clínicos e pré-clínicos (JANKOVIC *et al.*, 2015).

O cérebro humano durante muito tempo tem sido considerado como uma região imuno privilegiada devido a existência da BBB. No entanto, a identificação da vascularização linfática meníngea, desafiou a visão tradicional do cérebro como imune privilegiado, e as evidências sugerem que os antígenos do SNC podem interagir com linfócitos e células apresentadoras de antígenos via o sistema linfático meníngeo (LOUVEAU *et al.*, 2018). Estes achados sugerem que respostas imunes inatas e adaptativas poderiam estar envolvidas no SNC nas doenças neurodegenerativas.

A contribuição de neuroinflamação na patologia poderia explicar a morte neuronal seletiva na DP. A neuroinflamação induz o acúmulo de citocinas e ERO no cérebro ativando os neurônios dopaminérgicos da SNpc que são particularmente suscetíveis (TANSEY; GOLDBERG, 2010). Além disso, efeitos neuroinflamatórios podem ser mais pronunciados na SNPC, pois esta região cerebral exibe a maior densidade de microglia (YANG *et al.*, 2013).

A literatura confirma fortemente o papel do estresse oxidativo e da inflamação no desenvolvimento e progressão da DP. Nos casos de disfunção mitocondrial, observa-se aumento da produção de ERO, que podem ter consequências prejudiciais, como dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica ou oxidação de proteínas. As ERO também têm um papel fisiológico como moléculas de sinalização, como níveis anormais interrompendo, portanto, as cascatas de sinalização fisiológica (ANTONY *et al.*, 2013). O sistema antioxidante no corpo é dividido em dois tipos enzimático e solúvel. Enzimático como PON1, GPX, catalase, superóxido dismutase e solúvel como vitamina A, C, E e bilirrubina (MOTA *et al.*, 2019). Vale ressaltar que os cientistas quase unanimemente assumiram o estresse oxidativo como a razão mais importante para o envelhecimento. Por outro lado, a neuroinflamação é uma das graves complicações da DP, geralmente desenvolvida devido a agregação de proteínas e mortes de células dopaminérgicas (HASSANZADEH; RAHIMMI, 2018).

Descobertas sugerem um papel do metabolismo lipídico e do colesterol não apenas na demência vascular e na DA, mas também na patogênese da DP. Diversos estudos de caso-controle e coorte implicaram níveis mais baixos de colesterol e risco aumentado de DP, no entanto, o mecanismo é desconhecido. Curiosamente, estudos

in vitro mostram a α -SIN, intimamente associado a *lipid rafts* enriquecidas com colesterol nas membranas celulares, e a oligomerização de α -SIN pode ser regulada por ácidos graxos. Além disso, a concentração de coenzima Q10, um aceptor de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e um poderoso antioxidante, é altamente dependente de colesterol. Dada a importância do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na patogênese da DP, é possível que o colesterol, e a PON1, por sua vez, estejam influenciando a progressão dos sintomas motores através da coenzima Q10 ou dos oligômeros de α -SIN (PAUL *et al.*, 2017).

Os dados do presente estudo mostraram que as variações de estresse oxidativo observadas dos exossomos das amostras parecem acompanhar aquelas observadas de modo geral em pacientes acometidos com DP, onde se observa aumento dos níveis pró-antioxidantes em comparação com indivíduos saudáveis e consumos das defesas antioxidantes. Além disso, ao avaliar o índice de estresse oxidativo, que engloba a relação entre os níveis pró-antioxidantes *versus* antioxidantes de cada grupo analisado, foi observado que os exossomos dos grupos com classificação clínica leve e avançado apresentaram um aumento no índice de estresse oxidativo em relação ao grupo dos controles saudáveis, sugerindo que os níveis de estresse oxidativo dos exossomos estejam relacionados ao perfil de evolução clínica da doença. Uma vez que, estudos sugerem que essas nanovesículas apresentam um papel importante na geração do estresse oxidativo na DP, especialmente nas vesículas derivadas da mitocôndria. O estresse mitocondrial tem sido apontado como um dos eventos chaves na patogênese da DP (LARSEN; HANSS; KRUGER, 2018), e que a geração de exossomos oriundos de mitocôndrias presentes no SNC poderia ser uma fonte de proteínas ligadas à doença, como PINK1 e PARKIN, e de mediadores inflamatórios (MCLELLAND *et al.*, 2014).

Enquanto a principal função dos neurônios, a comunicação com neurônios vizinhos, requer atividade sináptica, a função sináptica exige um controle rígido dos processos intracelulares, como envelhecimento dos neurotransmissores, homeostase energética e tamponamento de cálcio (ANTONY *et al.*, 2013). Disfunção sináptica pode ser um dos primeiros eventos na patogênese da DP, pois evidências acumuladas sugerem que a disfunção sináptica no estriado é tipicamente mais grave que a da substância negra e ocorre em pacientes com DP pré-clínica (LEVERENZ *et al.*, 2007). O dano físico ao tecido neuronal e vários fatores genéticos e ambientais,

principalmente o envelhecimento, aumentam a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e o danos às proteínas, reduzem a autofagia basal e provêm a disfunção na BBB (BRENNAN *et al.*, 2016).

A função dos exossomos parece ser muito mais do que apenas um mecanismo secretor de conteúdo celular. É um meio sofisticado de processar moléculas específicas, e o papel versátil dos exossomos abre novas perspectivas para a compreensão e tratamento de doenças neurológicas (TSILIONI *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, foi possível identificar os perfis proteômicos específicos de exossomos para cada grupo clínicos de pacientes com DP. Foram identificadas 785 proteínas, de forma redundante, no total de todas as amostras de pacientes e controles saudáveis. Foi possível identificar processos biológicos correspondentes as proteínas identificadas exclusivamente nos diferentes grupos. Para o grupo leve, foram identificadas alterações no sistema imune, imunomodulação e resposta ao estresse oxidativo. Já no grupo moderado, foram identificados processos relacionados a ativação alternativa do complemento. Quanto ao grupo avançado, as proteínas exclusivas foram classificadas como pertencentes ao processo de transporte mediado por vesículas. Na análise quantitativa foram identificadas 42 proteínas diferencialmente expressas na comparação entre o grupo com classificação clínica leve *versus* grupo controle. Na comparação entre o grupo moderado *versus* controle foram identificadas 33 proteínas diferencialmente expressas. Enquanto que na comparação entre o grupo avançado *versus* grupo controle 16 proteínas foram encontradas com diferença de expressão.

Foi realizada uma análise de conteúdo de componentes celulares, uma vez que o presente estudo proteômico foi realizado em exossomos e foi possível observar que majoritariamente as proteínas identificadas apresentavam origem descrita exossomal. Além disso, foram realizadas análises funcionais para as proteínas exclusivas e diferencialmente expressas entre os diferentes grupos estudados, identificando processos biológicos e vias de sinalização relacionadas a resposta imune inata, estresse oxidativo, resposta inflamatória, transporte mediado por vesículas, processos metabólicos, dentre outras.

Este trabalho contribui para a literatura com dados proteômicos de exossomos inéditos relacionados as diferentes classificações clínicas, trazendo uma nova perspectiva na possível identificação de processos biomarcadores sanguíneos prognósticos na DP. Além disso, foi possível o estudo mais detalhado do conteúdo de estresse oxidativo encontrado em exossomos presentes na patologia da DP.

8. REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**. Vol. 537, No. 7620, pp. 347-355. Sep 2016.

ALTELAAR, A. F.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: Towards an integrative view of proteome dynamics. **Nat Rev Genet**. Vol. 14, No. 1, pp. 35-48. Jan 2013.

AMADORI, K.; STEINER, T. Parkinson's syndromes in geriatric patients: Epidemiological, clinical and therapeutic characteristics. **Der Nervenarzt**. Vol. 90, No. 12, pp. 1279-1291. Dec; 2019.

ANTONY, P. M. A., DIEDERICH, N. J., KRÜGER, R.; BALLING, R. The hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS Journal**. Vol. 280, No. 23, pp. 5981–5993. DEC. 2013.

BANKS, S. M.; MEDEIROS, A. T.; MCQUILLAN, M.; BUSCH, D. J.; IBARRARAN-VINIEGRA, A. S.; SOUSA, R.; LAFER, E. M.; MORGAN, J. R. Hsc70 ameliorates the vesicle recycling defects caused by excess α -synuclein at synapses. **eNeuro**. Vol. 7, No. 1; pp. 1-18. Jan 2020.

BENGOA-VERGNIORY, N.; ROBERTS, R.; WADE-MARTINS, R.; ALEGRE-ABARRATEGUI, J. Alpha-synuclein oligomers: a new hope. **Acta Neuropathol**. Vol 134, No. 6, pp. 819-838. Aug 2017.

BEN-JOSEPH, A.; MARSHALL, C.R.; LEES, A.J.; NOYCE, A.J. Ethnic Variation in the Manifestation of Parkinson's Disease: A Narrative Review. **J Parkinsons Dis**. 16. Dec 2019.

BOERGER, M.; FUNKE, S.; LEHA, A.; ROSER, A-E.; WUESTEMANN, A-K.; MAAS, F.; BÄHR, M.; GRUS, F.; LINGOS, P. Proteomic analysis of tear fluid reveals disease-specific patterns in patients with Parkinson's disease – A pilot study. Vol. 2019, No. 63, pp. 3-9. Mar 2019.

BOVOLENTA, T.M.; FELÍCIO A.C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (São Paulo)**. Vol. 14, No. 3, pp. 7-9. Jul-Sep 2016.

BRAAK, H. TREDICI, K. D., RÜB, U., DE VOS, R. A. I., STEUR, E. N. H. J., BRAAK E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiolog of Aging**. Vol. 24, No.2, pp. 197-211. Mar-apr. 2003.

BRAAK, H., TREDICI, K. D. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's Disease: Separating the Wheat from the Chaff. **Journal of Parkinson's Disease**. Vol. 7, No.S1, pp. S71-S85. Mar 2017.

BRENNAN, F. H.; LEE, J. D.; RUITENBERG, M. J.; WOODRUFF, T. M. Therapeutic targeting of complemente to modify disease course and improve outcomes in neurological conditions. **Seminars in Immunology**. Vol. 28, No. 3, pp. 292-308. Jun 2016.

CACABELOS, R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. **Int J Mol Sci**. Vol. 18, No. 3, pp.1-28. Mar 2017.

CASSANI, E.; CANCELLO, R.; CAVANNA, F.; MAESTRINI, S.; DI BLASIO, A. M.; LIUZZI, A.; PEZZOLI, G.; BARICHELLA, M. Serum adiponectin levels in advanced-stage Parkinson's disease patients. **Parkinsons Dis**. Vol. 2011, Art. 624764, pp. 1-6. Jan 2011.

CILENTO, E. M.; JIN, L.; STEWART, T.; SHI, M.; SHENG, L.; ZHANG, J. Mass spectrometry: A plataform for biomarker discovery and validation for Alzheimer's and Parkinson's disease. **J Neurochem**. Vol. 151, No. 4, pp. 397-416. Nov 2019.

CORREA, S.; PANIS, C.; BINATO, R.; HERRERA, A. C.; PIZZATTI, L. ABDELHAY, E. Identifying potential markers in breast câncer subtypes using plasma label-free proteomics. **J proteomics**. Vol. 151, pp. 33-42. Jan 2017.

DANZER, K. M.; KRANICH, L. R.; RUF, W. P.; CAGSAL-GETKIN, O. WINSLOW, A. R.; ZHU, L.; VANDERBURG, C. R.; MCLEAN P.J. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha-synuclein oligomers. **Mol neurodegener**. 24;7;42. Aug 2012.

DEVECI, H. A.; KARAPEHLIVAN, M. Chlorpyrifos-induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Vol. 144, pp. 36-41. Jan 2018.

DICHEV, V.; KAZAKOVA, M.; SARAFIAN, V. YKL-40 and neuron-specific enolase in neurodegeneration and neuroinflammation. **Ver Neurosci**. Vol. 31, No. 5, pp. 539-553. Jul 2020.

DING, M.; WANG, C.; LU, X.; ZHANG, C.; ZHOU, Z.; CHEN, X.; ZHANG, C. Y.; ZEN, K.; ZHANG, C. Comparasion of comercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. **Analyt Bioanalyt Chem**. Vol. 410, pp. 3805-3814. Jan 2018.

DIXIT, A.; MEHTA, R.; SINGH, A. K. Proteomics in human Parkinson's disease: Present scenario and future directions. **Cellular and Molecular Neurobiology**. Vol. 39, pp. 901-915. Jun 2019.

DOTY, R.L. Olfactory Dysfunction in Parkinson Disease. **Nat. Rev. Neurol**. Vol. 8, pp. 329-339. June 2012.

GALLEGOS, S.; PACHECO, C.; PETERS, C.; OPAZO, C. M.; AGUAYO, L. G. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. **Front Neurosci**. Vol. 9, No. 59, pp.1-11. Mar 2015.

GELDERS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN DER PERREN, A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **Journal of Immunology Research**. Vol. 2018, ID 4784268 pp. 1-12. Apr 2018.

GOETZ, C. G.; POEWE, W.; RASCOL, O.; SAMPAIO, C.; STEBBINS, G. T.; COUNSELL, C.; GILADI, N. HOLLOWAY, R. G.; MORRE, C. G.; WENNING, G.

K.; YAHR, M. D.; SEIDL, L. Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations. **Movement Disorders**. Vol. 19, No. 9, pp.1020-1028. Jun 2004.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free redic. Biol. Med.** Vol. 10, pp. 93-100. 1991

GOULART, F.; PEREIRA, L. X. Main scales for Parkinson's disease assessment: use in physical therapy. **Fisiot. e Pesquisa**. Vol. 11, No. 1. Jan-Apr 2005.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol. 66, No. 1, pp. 39-63. Mar 2002.

GRÜNBLATT, E.; RUDER, J.; MONORANU, C. M.; RIEDERER, P.; YODIM, M. B.; MANDEL, S. A. Differential alterations in metabolism and proteolysis-related proteins in human Parkinson's disease substantia nigra. **Neurotoxicity Research**. Vol. 33, No. 3, pp. 560-568. Apr 2018.

HANEY, M. J.; KLYACHKO, N. L.; ZHAO, Y.; GUPTA, R.; PLOTNIKOVA, E. G.; HE, Z.; PASTEL, T.; PIROYAN, A.; SOKOLOLSKY, M.; KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. **J. Control Release**. Mar 2015.

HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M.; LANSBURY Jr., P. T. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. **Biochemistry**. Vol. 38, No. 28, pp. 8972-8980. 1999.

HASSANZADEH, K.; RAHIMMI, A. Oxidative stress and neuroinflammation in the story of Parkinson's disease: Could targeting these pathways write a good ending?. **J Cell Physiol**. Vol. 234, No. 1, pp. 23-32. Jan 2018.

HORVATH, I.; IASHCHISHYN, I. A.; FORSGREN, L.; MOROZOVA-ROCHE, L. A. Immunochemical detection of α -synuclein autoantibodies in Parkinson's disease: Correlation between plasma and cerebrospinal fluid levels. **ACS Chem. Neurosci**. Vol. 8, pp. 1170-1176. Mar 2017.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric Food Chem**. Vol. 53, No. 6, pp. 1841-1856. Feb 2005.

HUGHES, A. J., DANIEL, S. E., KILFORD, L., LEES, A. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases. **J. Neurol Neurosurg Psychiatry**. Vol. 55, No. 3, pp. 181-4. Mar 1992.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE - Disponível em: censo2010.ibge.gov.br/ Acesso em 5 de maio de 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE- Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>. Acesso em: 05 maio de 2020.

JANKOVIC, J. Pathogenesis-targeted therapeutic strategies in Parkinson's disease. **Mov Disord**. Vol. 34, No. 1, pp. 41-44. Jan 2019.

- JIANG, C.; HOPFNER, F.; KATSIKOUDI, A.; HEIN, R.; CATLI, C.; EVETTS, S.; HUANG, Y.; WANG, H.; RYDER, J. W.; KUHLENBAEUMER, G.; DEUSCHL, G.; PADOVANI, A.; BERG, D.; BORRONI, B.; HU, M. T.; DAVIS, J. J.; TOFARIS, G. K. Serum neuronal exosomes predict and differentiate Parkinson's disease from atypical parkinsonism. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. Vol. 91, No. 7, pp. 720-729. Jul 2020.
- JIANG, F.; WU, Q.; SUN, S.; BI, G.; GUO, L. Identification of potential diagnostic biomarkers for Parkinson's disease. **FEBS Open Bio**. Vol. 9, No. 8, pp. 1460-1468. Aug 2019.
- JIANG, R.; RONG, C.; KE, R.; MENG, S.; YAN, X.; KE, H.; WU, S. Differential proteomic analysis of serum exosomes reveals alterations in progression of Parkinson disease. **Medicine (Baltimore)**. Vol. 98, No. 41, pp. 1-9. Oct 2019.
- KALIA, L.V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**. Vol. 386, No. 9996, pp. 896-912. Aug 2015.
- KATAOKA, H.; SUGIE, K. Serum adiponectin levels between patients with Parkinson's disease and those with PSP. **Neurol Sci**. Vol. 41, No. 5, pp. 1125-1131. Mai 2020.
- KIAEI, M.; BALASUBRAMANIAM, M.; KUMAR, V. G.; REIS, R. S.; MORADI, M.; VARUGHESE, K. ALS- causing mutations in profilin-1 alter its conformational dynamics: A computational approach to explain propensity for aggregation. **Sci Rep**. Vol. 8, No. 1, pp. 1-10. Aug 2018.
- KIRBAS, A.; KIRBAS, S.; CURE, M. C.; TUFEKCI, A. Paraoxonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with idiopathic Parkinson's disease. **J Clin Neurosci**. Vol. 21, No. 3, pp. 451-5. Mar 2014.
- KITAMURA, Y.; KIJIMA, M.; KUROSAWA, T.; SASAKI, R.; ICHIHARA, S.; HIRAKU, Y.; TOMIMOTO, H.; MURATA, M.; OIKAWA, S. Proteomic profiling of exosomal proteins for blood-based biomarkers in Parkinson's disease. **Neuroscience**. Vol. 392, pp. 121-128. Nov 2018.
- KITAMURA, Y.; KOJIMA, M.; KUROSAWA, T.; SASAKI, R.; ICHIRARA, S.; HIRAKU, Y.; TOMIMOTO, H.; MURATA, M.; OIKAWA, S. Proteomic profiling of exosomal proteins for blood-based biomarkers in Parkinson's disease. **Neuroscience**. Vol. 392, pp. 121-128. Nov 2018.
- KOEHLER, N. K. U., STRANSKY, E., MEYER, M., GAERTNER, S. SHING, M., SCHANAIDT, M., et al. Alpha-Synuclein Levels in Blood Plasma Decline with Healthy Aging. **PLOS ONE**. Vol. 10, No 4, pp. 1-16. Apr 2015.
- KURTISHI, A.; ROSEN, B.; PATIL, K. S.; ALVES, G. W.; MOLLER, S. G. Cellular proteostasis in neurodegeneration. **Mol Neurobiol**. Vol. 56, No. 5, pp. 3676-3689. Mai 2019.
- LANSEK, R.; DANOUDIS, M. Freezing of gait in Parkinson's disease: Its pathophysiology and pragmatic approaches to management. **Mov Disord Clin Pract**. Vol. 4, No. 3, pp. 290-297.

- LARSEN, S. B.; HANSS, Z.; KRÜGER. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Tissue Res.** Vol. 372, No. 1, pp. 21-37. Jul 2018.
- LEE, P. H.; LEE, G.; PARK, H. J.; BANG, O. Y.; JOO, I. S.; HUH, K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. **J. Neural Transm.** Vol. 113, pp. 1435-1439. Feb 2006.
- LEE, Y. M.; PARK, S. H.; SHIN, D.; HWANG, J-Y. PARK, B.; PARK, Y-J.; LEE, T. H.; CHAE, H. Z.; JIN, B. K.; OH, T. H.; OH, Y. J. Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease. **J Biol Chem.** Vol. 283, No. 15, pp. 9986-9998. Apr 2008.
- LIAN, T. H.; GUO, P.; ZUO, L. J.; HU, Y.; YU, S. Y.; YU, Q. J.; JIN, Z.; WANG, R. D.; LI, L. X.; ZHANG, W. Tremor-dominant in Parkinson disease: The relevance to iron metabolism and inflammation. **Frontiers in Neuroscience.** Vol.13, Article 255. Mar 2019.
- LIM, L.; KANG, J.; SONG, J. ALS-causing profilin-1 mutant forms a non-native helical structure in membrane environments. **BBA-Biomembranes.** Vol. 1859, No. 11, pp. 2161-2170. Nov 2017.
- LIN, R.; KARPA, K.; KABBANI, N.; GOLDMAN-RAKIC, P.; LEVENSON, R. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Vol. 98, No. 9, pp. 5258-5263. Apr 2001.
- LIU, W.; BAI, X.; ZHANG, A.; HUANG, J.; XU, S.; ZHANG, J. Role of exosomes in central nervous system disease. **Front. Mol Neurosci.** Vol.12 Art. 240. Oct 2019.
- LOUVEAU, A.; HERZ, J.; ALME, M. N.; SALVADOR, A. F.; DONG, M. Q.; VIAR, K. E.; HEROD, S. G.; KNOPP, J.; STLIFF, J. C.; LUPI, A. L.; DA MESQUITA, S.; FROST, E. L.; GAULTIER, A.; HARRIS, T. H.; CAO, R. HU, S.; LUKENS, J. R.; SMIRNOV, I.; OVERALL, C. C.; OLIVER, G.; KIPNIS, J. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. **Nat Neurosci.** Vol. 21, No. 10, pp. 1380-1391. Oct 2018.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Anal Chim Acta.** Vol. 613, No. 1, pp. 1-19. Apr 2008.
- MARTINEZ, A.; LOPEZ, N.; GONZALEZ, C.; HETZ, C. Targeting of the unfolded protein response (UPR) as therapy for Parkinson's disease. **Biol Cell.** Vo. 111, No. 6, pp. 161-168. Jun 2019.
- MARTINEZ-MARTIN, P. Hoehn and Yahr Staging Scale. **Elsevier Ltd.** Pp. 23-25. May 2010.
- MAZURSKYY, A.; HOWITT, J. Initiation and transmission of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. **Neurochem Res.** Vol. 44, pp. 2685-2694. Nov 2019.
- MCLELLAND, G.; SOUBANNIER, V.; CHEN C. X.; MCBRIDE, H. M.; FON, E. A. Parkin and PINK1 function in a vascular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. **EMBO J.** Vol. 33, No. 4, pp. 282-95. Feb 2014.

MELKI, R. Apha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. **Rev. Neurol (Paris)**. Vol. 174, No. 9, pp. 644-652. Aug 2018.

MOMEN-HERAVI, F.; BALAJ, L.; ALIAN, S.; TRACHTENBERG, A. J.; HOCHBER, F. H.; SKOG, J.; KUO, W. P. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. **Front physiol**. Vol. 3, Art. 162, pp. 1-6. Mai 2012.

MOTA, A.; HEMATI-DINARVAND, M.; TAHERAGHDAM, A. A.; NEJABATI, H. R.; AHMADI, R.; GHASEMNEJAD, T.; HASANPOUR, M.; VALILO, M. Association of paraoxonase1 (PON1) genotypes with activity of PON1 in patients with Parkinson's disease. **Acta Neurol Taiwan**. Vol. 28, No. 3, pp-66-74. Sep 2019.

MULAK A. A Controversy on the Role of Short-Chain Fatty Acids in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Mov. disord**. Vol. 33, No. 3, pp. 398-401. Mar 2018.

NICOLETTI, A.; MOSTILE, G.; NICOLETTI G.; ARABIA, G.; ILICETO, G.; LAMBERTI, P.; MARCONI, R.; MORGANTE, L.; BARONE, P.; QUATTRONE, A.; ZAPPIA, M. Clinical phenotype and risk of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **J. Neurol**. Vol. 263 pp. 88-894. Mar 2016.

OLANOW, C.W.; STERN, M.B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). **Neurology**. Vol. 72 No. 21 Suppl 4, pp. S1-136. May 2009.

PANIS, C.; BINATO, R.; CORREA, S.; VICTORINO, V. J.; DIAS-ALVES, V.; HERRERA, A. C. S. A.; CECCHINI, R.; SINÃO, A. N. C.; BARBOSA, D. S.; PIZZATTI, L.; ABDELHAY, E. Short infusion of paclitaxel imbalances plasmatic Lipid metabolism and correlates with cardiac markers of acute damage in patients with breast cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**. Vol. 80, No. 3, pp. 469-478. Jul 2017.

PANIS, C.; HERRERA, A. C. S. A.; VICTORINO, V. J.; CAMPOS, F. C.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; COLADO SIMÃO, A. N.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**. Vol. 133, No. 1, pp.89-97. May 2012.

PANIS, C.; PIZZATTI, L. SOUZA, G. F.; ABDELHAY, E. Clinical proteomics in cancer: Where we are. **Cancer lett**. Vol. 382, No. 2, pp. 231-239. Aug 2016.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; BUFALO, A. C.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E. Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. **Tumour Biol**. Vol. 37, No. 3, pp. 3775-83. Mar 2016.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; HERRERA, A. C.; CORREA, S.; BINATO, R.; ABDELHAY, E. Label-free MSE proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. **J Proteome**. Vol. 13, No. 11, pp. 4752-4772. Set 2014.

PAUL, K. C.; SINSHEIMER, J. S.; COCKBURN, M.; BRONSTEIN, J. M.; BORDELON, Y.; RITZ, B. Organophosphate pesticides and PON1 L55M in Parkinson's disease progression. **Environ Int**. Vol. 107, pp.75-81. Oct 2017.

PINHEIRO, A.; SILVA, A. M.; TEIXEIRA, J. H.; GONÇALVES, R. M.; ALMEIDA, M. I.; BARBOSA, M. A.; SANTOS, S. G. Extracellular vesicles: intelligent delivery strategies for therapeutic applications. **J. Control. Release**. Vol. 289 pp. 56-69. Sep 2018.

PIRES, B. R.; PANIS, C.; ALVES, V. D.; HERRERA, A. C. S.; BINATO, R.; PIZZATTI, L.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E. Label-free proteomics revealed oxidative stress and inflammation as factors that enhance chemoresistance in luminal breast cancer. **Oxid Med Cell Longev**. Vol. 2019, No. 5357649, pp. 1-15. Aug 2019.

PIZZATTI, L.; PANIS, C.; LEMOS, G.; ROCHA, M.; CECCHINI, R.; SOUZA, G. H. M. F.; ABDELHAY, E. Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: Disclosing new insights from therapy resistance. **Proteomics**. Vol. 12, No. 17, pp. 2618-2631. Aug 2012.

PORRO, C.; PANARO, M. A.; LOFRUMENTO, D. D.; HASALLA, E.; TROTTA, T. The multiple roles of exosomes in Parkinson's disease: an overview. **J. Immunopharmacology and Immunotoxicology**. Vol. 41, Issue-4, pp. 469-476. Aug 2019.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**. Vol. 10; 10:53. Nov 2017.

QU, M.; LIN, Q.; HUANG, L.; FU, Y.; WANG, L.; HE, S.; FU, Y.; YANG, S.; ZHANG, Z.; ZHANG L.; SUN, X. Dopamine-loaded blood exosomes target to brain for better treatment of Parkinson's disease. **J. Control. Release**. Vol. 287, pp. 156-166. Oct 2018.

RAJPUT, A. H.; SITTE, H. H.; RAJPUT, A.; FENTON, M. E.; PIFL, C.; HORNYKIEWICZ, O. Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: Clinical and brain biochemical correlation. **Neurology**. Vol. 15 No. 70 pp. 1403-1410. Apr 2008.

RAMARKER, C.; MARINUS, J.; STIGGELBOUT, A. M.; VAN HILTEN, B. J. Systematic Evaluation of Rating Scales for Impairment and Disability in Parkinson's Disease. **Mov. Disord**. Vol. 17, No. 5; pp.867-876. May 2002.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J. Cell Biol**. Vol. 200, No.4, pp. 373-383. Feb 2013.

Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde, OMS. 2015. Disponível em: <https://sbgg.org.br/wp-content/uploads/2015/10/OMS-ENVELHECIMENTO-2015-port.pdf>. Acesso em: 05 de maio de 2020.

RIETDIJK, C. D.; PEREZ-PARDO, P.; GARSSSEN, J.; VAN WEZEL, R. J. A.; KRANEVELD, A. D. Exploring Braak's hypothesis of Parkinson's disease. **Front. Neurol**. Vol. 8, Article 37. Feb 2017.

ROCHA, E. M.; MIRANDA, B.; SANDERS, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis**. Vol. 109, pp. 249-257. Jan 2018.

ROCHA, E. M.; SMITH, G. A.; PARK, E.; CAO, H.; GRAHAM, A-R.; BROWN, E.; MCLEAN, J. R.; HAYES, M. A.; BEAGAN, J.; IZEN, S. C.; PEREZ-TORRES, E.;

HALLETT, P. J.; ISACSON, O. Sustained systemic glucocerebrosidase inhibition induces brain α -synuclein aggregation, microglia and complement C1q activation in mice. **Antioxid Redox Signal**. Vol. 23, No. 6, pp. 550-564. Aug 2015.

RODRIGUES-DE-PAULA, F.; LANA, R.C.; LOPES, L.K.R.; CARDOSO, F.; *et al.* Determinants of the use of physiotherapy services among individuals with Parkinson's disease living in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. Vol. 76, No. 9, pp. 592-598. Sep 2018.

SAMPEDRO, F.; MARÍN-LAHOZ, J.; MATÍNEZ-HORTA, S.; PÉRES-GONZÁLES, R.; PAGONABARRAGA, J.; KULISEVSKY, J. CLU rs11136000 promotes early cognitive decline in Parkinson's disease. **Mov Disor**. Vol. 35, No. 3, pp. 508-513. Mar 2020.

SAMUEL, F.; FLAVIN, W. P.; LQBAL, S. PACELLI, C. RENGANATHAN S. D. S.; TRUDEAU, L.E.; CAMPBELL, E. M.; FRASER, P. E.; TANDON, A. Effects of serine 129 phosphorylation on α -synuclein aggregation, membrane association, and internalization. **J. of biological chemistry**. Vol. 291, No 9, pp. 4374-4385. Feb 2016.

SAUERBIER, A.; QAMAR, M.A.; RAJAH, T.; CHAUDHURI, K.R. New concepts in the pathogenesis and presentation of Parkinson's disease. **Clin Med (Lond)**. Vol. 16, No. 4, pp. 365-70. Aug 2016.

SAVARYN, J. P.; TOBY, T. K.; KELLEHER, N. L. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. **Proteomics**. Vol. 16, No. 18, pp. 2435-2443. Sep 2016.

SEKIYAMA, K.; WARAGAI, M.; AKATSU, H.; SUGAMA, S.; TAKENOUCHI, T.; TAKAMATSU, Y.; FUJITA, M.; SEKIGAWA, A.; ROCKENSTEIN, E.; INOUE, S.; LA SPADA, A. R.; MASLIAH, E.; HASHIMOTO, M. Disease modifying effect of adiponectin in model of α -synucleinopathies. **Ann Clin Transl Neurol**. Vol. 1, No. 7, pp. 479-489. Jul 2014.

SERPELL, L. C.; BERRIMAN, J.; JAKES, R.; GOEDERT, M.; CROWTHER, R. A. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Vol. 97, No. 9, pp. 4897-4902, abr. 2000.

SIMON, D. K., TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology. **Clin Geriatr Med**. 2020 Feb; Vol. 36, No. 1, pp. 1-12. Aug 2019.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes --vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol**. Vol. 21, No. 4, pp. 575-581. Aug 2009.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**. Vol. 62, pp. 13-25. Sep 2013.

SMITH, E. R.; NILFOROOSHAN, R.; WEAVING, G.; TABET, N. Plasma fetuin-A is associated with the severity of cognitive impairment in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**. Vol. 24, No. 2, pp. 327-33. Jan 2011.

SOUSA, A. C. P. A.; ZUNZUNEGUI, M-V.; LI, A.; PHILLIPS, S. P.; GURALNIK, J. M.; GUERRE, R. O. Association between C-reactive protein and physical

performance in older populations: results from the International Mobility in Aging Study (IMIAS). **Age Ageing**. Vol. 45, No. 2, pp. 274-80. Jan 2016.

SRIVASTAVA, G.; SINGH, K. TIWARI, M. N.; SINGH, M. P. Proteomics in Parkinson's disease: Current trends, translational snags and future possibilities. **Expert Rev Proteomics**. Vol. 7, No. 1, pp. 127-139. Feb 2010.

SRIVASTAVA, G.; SINGH, K.; TIWARI, M.N.; SINGH, M.P. Proteomics in Parkinson's disease: current trends, translational snags and future possibilities. **Expert Rev Proteomics**. Vol. 7, No. 1, pp. 127-39. Feb 2010.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat Rev Mol Cell Biol**. Vol. 5, No. 9, pp. 699-711. Sep 2004.

STUENDL, A.; KUNADT, M.; KRUSE, N.; BARTELS, C.; MOEBIUS, W.; DANZER, K. M.; MOLLENHAUER, B.; SCHNEIDER, A. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Brain**. Vol. 139, No.2, pp 481-494. Feb 2016.

TANAKA, Y.; NONAKA, T.; SUZUKI, G.; KAMETANI, F.; HASEGAWA, M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. **Hum Mol Genet**. Apr 2016. Vol. 25, No. 7, pp. 1420-33. Apr 2016.

TANG, Y-T.; HUANG, Y-Y. ZHENG, L.; QUIN, S-H.; XU, X-P.; AN, T-X.; XU, Y.; WU, Y-Y.; HU, X-M.; PING, B-H.; WANG, Q. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and sérum. **Int J Mol Med**. Vol. 40, No. 3, pp. 834-844. Sep 2017.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis**. Vol. 37, No. 3, pp. 510-518. Mar 2010.

TEXEIRA, F. G.; VOLAÇA-FARIA, H.; DOMINGUES, A. V.; CAMPOS, J.; SALGADO, A. J. Preclinical comparison of stem cells secretome and levodopa application in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Cells**. Vol. 9, No. 2, pp. 1-18. Jan 2020.

TITOVA, N.; PADMAKUMAR, C.; LEWIS, S.J.G.; CHAUDHURI, K.R. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? **J Neural Transm**. Dec 2016.

TOFARIS, G. K. A critical assessment of exosomes in the pathogenesis and stratification of Parkinson's disease. **J. Parkinsons Dis**. Vol.7, No.4, pp. 569-576. Jul 2017.

TOMLINSON, P. R.; ZHENG, Y.; FISCHER, R.; HEIDASCH, R.; GARDINER, C.; EVETTS, S.; HU, M.; WADE-MARTINS, R.; TURNER, M. R.; MORRIS, J.; TALBOT, K.; KESSLER, B. M.; TOFARIS, G. K. Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. **Ann Clin Transl Neurol**. Vol. 2, No. 4, pp. 353-361. Feb 2015.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**. Vol 18; No. 6. Dec 2019.

- TSILIONI, I.; PANAGIOTIDOU, S.; THEOHARIDES, T. C. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. **Clin Ther.** Vol. 36, No. 6, pp. 882-888. Jun 2014.
- UMEMURA, A.; OEDA, T.; YAMAMOTO, K.; TOMITA, S.; KOHSAKA, M.; PARK, K.; SUGIYAMA, H.; SAWADA, H. Baseline plasma C-reactive protein concentrations and motor prognosis in Parkinson disease. **PLoS One.** Vol. 10, No. 8, pp. 1-12. Aug 2015.
- WEI, Y.; LU, M.; MEI, M.; WANG, H.; HAN, Z.; CHEN, M.; YAO, H.; SONG, N.; DING, X.; DING, J.; XIAO, M.; HU, G. Pyridoxine induces glutathione synthesis via PKM2- mediated Nrf2 transactivation and confers neuroprotection. **Nat Commun.** Vol. 11, No. 1, pp. 1-12. Feb 2020.
- WU, X.; ZHENG, T.; ZHANG, B. Exosomes in Parkinson's disease. **Neurosci. Bull.** Vol. 33, No. 3, pp. 331-338. Jun 2017.
- YANG, C.; WANG, H.; LI, C.; NIU, H.; LUO, S.; GUO, X. Association between clusterin concentration and demetia: a systematic review and meta-analysis. **Metab Brain Dis.** Vol. 34, No. 1, pp. 129-140. Feb 2019.
- YANG, T-T.; LIN, C. L.; HSU, C-T.; WANF, T-G.; KE, F-Y.; KUO Y-M. Differential distribution and activation of microglia in the brain of male C57BL/6J mice. **Brain Struct Funct.** Vol. 218, No. 4, pp. 1051-60. Jul 2013.
- YANG, Y., HU, W.; JIANG, S.; WANG, B.; LI, Y.; FAN, C.; DI, S.; MA, Z.; LAU, W. B.; QU, Y. The emerging role of adiponectin in cerebrovascular and neurodegenerative diseases. **Biochim Biophys Acta.** Vol. 1852, No. 9, pp. 1887-94. Sep 2015.
- YILMAZ, R.; STRAFELLA, A.P.; BERNARD, A.; SCHULTE, C.; *et al.* Serum Inflammatory Profile for the Discrimination of Clinical Subtypes in Parkinson's Disease. **Front Neurol.** Vol. 9, Art.1123, pp. 1-9. Dec 2018.
- YU, H.; SUN, T.; AN, J.; WEN, L.; LIU, F.; BU, Z.; CUI, Y.; FENG, J. Potential roles of exosomes in Parkinson's disease: From pathogenesis, diagnosis, and treatment to prognosis. **Front. Cell. Dev. Biol.** Vol. 8 Art. 86. Feb 2020.
- YUAN, L.; LI, J-Y. Exosomes in Parkinson's disease: Current perspectives and future challenges. **ACS Chem. Neurosci.** Vol. 10, pp. 964-972. Jan 2019.
- ZHANG, Y.; FONSLOW, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M-C. YATES 3rd, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem Rev.** Vol. 113, No. 4, pp. 2343-2394. Apr 2013.

9. ANEXOS

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação de marcadores de diagnóstico e prognóstico em amostras de pacientes com doença de Parkinson do estado do Rio de Janeiro: metagenômica e espectrometria de massas.

Nome do Voluntário:

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa para estudar como se desenvolve a doença de Parkinson.

A sua participação é VOLUNTÁRIA. Não haverá qualquer prejuízo se você não quiser participar desse projeto. Seu tratamento atual não será modificado. Você não pagará nada, mas também não receberá recompensa ou qualquer forma de pagamento por sua participação. Você pode desistir de participar a qualquer momento. Para sair do estudo, você só precisa avisar um dos pesquisadores. Você não precisará explicar os motivos para desistir do estudo.

Para poder participar você deve assinar este TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e responder o FORMULÁRIO DE CADASTRO. Caso não se sinta confortável você tem o direito de não responder as perguntas do formulário.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo principal deste estudo é identificar moléculas que sejam importantes para o diagnóstico da doença de Parkinson e entender o desenvolvimento da doença a partir das bactérias que habitam nosso corpo.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você concorde em ser VOLUNTÁRIO deste estudo, precisaremos usar um pouco do seu sangue, suor, fluido do nariz e fezes. Também precisaremos entrevistar você para saber seus hábitos de vida.

Avenida Horácio Macedo, 1281, Bloco C, Pólo de Química, Cidade Universitária, Ilha do Fundão,
Rio de Janeiro, RJ - 21941-598 ☎ : 55 (21) 3938-3700 / 3938-3798
Site: www.lbcd.iq.ufrj.br E-mail: lbcd@iq.ufrj.br



Para identificar as moléculas que sejam importantes para diagnosticar a doença de Parkinson, serão analisados seu sangue e suor. Para análise de sangue, duas amostras de 5 ml (dois tubos pequenos) serão colhidas por profissional treinado, da seguinte forma: uma agulha será introduzida em uma veia sua, as amostras de sangue serão colhidas e, logo em seguida, a agulha será retirada da veia. Todos os cuidados serão tomados, de forma a tornar mínimos os riscos de infecção, contaminação, sangramento e dor.

Para análise do suor você deverá utilizar por uma semana um sabonete líquido sem cheiro para tomar banho e lavar o cabelo. Não se preocupe, pois nós providenciaremos esse sabonete para você. É importante que você não utilize nenhum desodorante, antitranspirante, perfume ou colônia durante esse tempo. No dia da coleta do suor, seria interessante se você viesse ao hospital com uma camiseta regata ou sem mangas. Pediremos que você faça 5 minutos de exercício leve (como uma volta no corredor ou subir a escada). Após esse curto período de tempo, um funil de vidro será apoiado na parte superior das suas costas e antebraço. No funil, será colocado uma fibra que será responsável pela coleta do suor. Todos os cuidados serão tomados, de forma a não causar desconforto ou dor.

Já para entender o desenvolvimento da doença de Parkinson a partir das bactérias que habitam nosso corpo serão utilizadas as amostras do fluido do nariz e fezes. Para análise do fluido do nariz será utilizado um *swab* nasal (uma espécie de cotonete, só que com a haste mais longa) que será colocado no seu nariz e girado para coletar as bactérias presentes ali. Todos os cuidados serão tomados, de forma a não causar desconforto ou dor.

Para análise das fezes, você receberá um pequeno pote no qual depositará você mesmo as suas fezes, na sua casa. Depois da coleta, você colocará o pote dentro de uma sacola de plástico e irá deixá-lo lá até o dia de voltar ao hospital. Na sua próxima consulta, você trará esse material.

As entrevistas serão feitas por um pesquisador do estudo e serão realizadas no Centro de Neurologia no mesmo dia em que você vier fazer alguma etapa do seu tratamento. Desta forma, você não precisará vir ao hospital apenas para fazer as entrevistas.

Os dados do seu prontuário médico, como por exemplo, os resultados de exames clínicos e de laboratório, também serão consultados. Todas essas informações somente serão consultadas pelos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais que estão trabalhando no seu tratamento. Não será permitido o acesso de outras pessoas a essas informações.

Temos o compromisso de utilizar seus dados e suas amostras apenas para esta pesquisa. Todo material será armazenado em freezer -80°C e será utilizado novamente apenas para confirmação deste estudo.

Trabalhamos em parceria com Universidades em Londres e na Alemanha. Caso você aprove, suas amostras poderão ser enviadas para lá, para dar continuidade a esta pesquisa.

RISCOS

O estudo em questão não oferece riscos adicionais à sua saúde e o seu tratamento será exatamente o mesmo caso você concorde ou não em participar. A colheita de sangue apresentam os mesmos riscos de qualquer punção venosa para exames laboratoriais, tais como riscos de infecção, contaminação, sangramento e dor. Todos os cuidados serão tomados, de forma a tornar mínimos esses riscos. As coletas de suor, fluido de nariz e fezes não apresentam risco.

BENEFÍCIOS

Não está previsto nenhum benefício imediato para você. As conclusões deste estudo poderão contribuir para a melhoria futura no processo de diagnóstico e entendimento da doença de Parkinson. Se for da sua preferência, você será mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Caso você concorde em participar deste estudo, o seu tratamento neurológico continuará sendo acompanhado pela equipe de saúde e não será alterado.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e pela equipe de pesquisadores. Seu nome não será revelado mesmo que seus dados sejam usados para ensino ou para divulgação científica.



UFRJ - INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE APOIO AO
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO



TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste estudo, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

A sua participação no estudo não terá nenhum custo para você. Você não precisará vir ao hospital apenas para o estudo. As entrevistas e a colheita de sangue, suor, fluido de nariz serão feitas em ocasiões em que você já esteja no hospital para outros atendimentos. As fezes serão trazidas por você em um dia de atendimento.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de informações será imediatamente interrompida.

A pesquisadora responsável do estudo pode interromper sua participação a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos você e seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a pesquisadora principal do estudo, Dr^a. Luciana Pizzatti, no telefone (21) 3938-3708. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - Sala 01D-46/1º andar - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br;

Avenida Horácio Macedo, 1281, Bloco C, Pólo de Química, Cidade Universitária, Ilha do Fundão,
Rio de Janeiro, RJ - 21941-598 ☎ : 55 (21) 3938-3700 / 3938-3798
Site: www.lbcd.iq.ufrj.br E-mail: lbcd@iq.ufrj.br



Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr^a. Ana Lúcia Zuma de Rosso, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome do Sujeito da Pesquisa

Data: ____/____/____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Nome do representante legal (se necessário)

Data: ____/____/____

Assinatura do representante legal (se necessário)

Nome do Pesquisador Responsável

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo 2 – Ficha de entrevista com o paciente

DOENÇA DE PARKINSON - ENTREVISTA COM O PACIENTE

DATA (da coleta do sangue): / /

NOME		TELEFONE	
HOSPITAL / UNIDADE DE SAÚDE		PRONTUÁRIO	
DATA NASCIMENTO	ESCOLARIDADE (anos de estudo)	ESTADO CIVIL 1. casado(a) 2. solteiro(a) 3. separado/divorciado(a) 4. viúvo(a)	
NATURALIDADE	PROFISSÃO	LATERALIDADE 1. destro(a) 2. canhoto(a) 3. ambidestro(a)	
SEXO: ☐ 1.FEMININO ☐ 2.MASCULINO	COR: ☐ 1.BRANCA ☐ 2.NEGRA ☐ 3.PARDA ☐ 4.AMARELA ☐ 5.OUTRA		

HISTÓRIA FAMILIAR ☐ 1. NÃO ☐ 2. SIM	
QUEM? _____	IDADE DE INÍCIO: _____
☐ TABAGISMO (_____ cig/dia) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	
☐ ETILISMO (DOSE _____) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	
☐ CAFÉINA (DOSE _____) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	

☐ ÁGUA DE POÇO DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ CONTATO COM AGROTÓXICOS DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ CONTATO COM PETROQUÍMICOS DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ DERIVADOS LÁCTEOS DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

DATA DO INÍCIO DA DOENÇA (mês / ano): _____

SINTOMA INICIAL: ☐1.TREMOR ☐2.RIGIDEZ ☐3.BRADICINESIA ☐4.DEPRESSÃO ☐5.OUTRO

SEGMENTO ACOMETIDO INICIALMENTE: ☐1.MSD ☐2.MSE ☐3.MID ☐4.MIE

MEDICAMENTO	DOSE (nº vezes diária)	DATA DE INÍCIO

--	--	--

OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS:

EXAMES COMPLEMENTARES:

☐ TC DE CRANIO ☐ RM DE CRANIO ☐ OUTROS

REALIZA FISIOTERAPIA ? ☐ NÃO ☐ SIM

QUANTAS VEZES POR SEMANA? ☐ DIARIAMENTE ☐ TRÊS VEZES ☐ DUAS VEZES ☐ UMA VEZ

TEM ACOMPANHAMENTO FONAUDIOLÓGICO? ☐ NÃO ☐ SIM

SINTOMAS MOTORES		DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	TREMOR DE REPOUSO		
2	RIGIDEZ		
3	BRADICINESIA “tapping”		
4	INSTABILIDADE POSTURAL		
5	MARCHA		
6	POSTURA		
7	FACIES		
8	MOVIMENTAÇÃO OCULAR		
SINTOMAS AUTONÔMICOS		DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	SUDORESE		
2	SEBORRÉIA		
3	SALIVAÇÃO		
4	DISFAGIA		

5	CONSTIPAÇÃO INTESTINAL		
6	INCONT. URINÁRIA/FECAL		
7	HIPOTENSÃO POSTURAL		
8	IMPOTÊNCIA COEUNDI		
	DISTÚRBIOS DO SONO	DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	INSÔNIA		
2	FRAGMENTAÇÃO DO SONO		QUANTAS VEZES ACORDA?
3	PESADELOS		
4	SONHOS VÍVIDOS		
5	PLMD		
6	SONOLÊNCIA DIURNA		
7	RLS		
8	RSBD		
	DISTÚRBIOS NEUROPSIQUIÁTRICOS	DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	DEPRESSÃO		
2	ANSIEDADE		
3	ALUCINAÇÕES		
4	DEMÊNCIA		
	OUTROS	DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	S. DISREGULAÇÃO DOPAMINÉRGICA		
2	ALTERAÇÃO VISUAL		
3	HIPOFONIA		
4	DISARTRIA		
5	FESTINAÇÃO		
6	HIPOSMIA		
7	CAIMBRA		
8	DOR/ PARESTESIA		
	DISCINESIAS E FLUTUAÇÕES	DATA DE INÍCIO	OBSERVAÇÃO
1	PICO DE DOSE		
2	FIM DE DOSE		

3	BIFÁSICA		
4	WEARING OFF		
5	DELAYED ON		
6	NO ON		
7	ON-OFF		
8	DISTONIA MATINAL		
9	ACINESIA MATINAL		
10	ACINESIA NOTURNA		
11	FREEZING ON / OFF		
12	NÃO MOTORAS - ESPECIFICAR		

ESCALA DE HOEHN & YAHR

ESCALA DE ATIVIDADES DIÁRIAS DE SCHWAB E ENGLAND

MINI EXAME DO ESTADO MENTAL

CLASSIFICAÇÃO:

☐ TREMULANTE ☐ RÍGIDO ACINÉTICO ☐ MISTO

AMOSTRAS COLETADAS:

() Fezes () Swab Nasal () Sangue () Suor ()

Outro: _____

Anexo 3 – Ficha de entrevista com o controle

DOENÇA DE PARKINSON - ENTREVISTA COM O CONTROLE

DATA (da coleta do sangue): / /

NOME		TELEFONE	
HOSPITAL / UNIDADE DE SAÚDE		PRONTUÁRIO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
DATA NASCIMENTO	ESCOLARIDADE (anos de estudo)	ESTADO CIVIL 1. casado(a) 2. solteiro(a) 3. separado/divorciado(a) 4. viúvo(a)	
NATURALIDADE	PROFISSÃO	LATERALIDADE 1. destro(a) 2. canhoto(a) 3. ambidestro(a)	
SEXO: ☐ 1.FEMININO ☐ 2.MASCULINO	COR: ☐ 1.BRANCA ☐ 2.NEGRA ☐ 3.PARDA ☐ 4.AMARELA ☐ 5.OUTRA		

HISTÓRIA FAMILIAR ☐ 1. NÃO ☐ 2. SIM	
QUEM? _____	IDADE DE INÍCIO: _____

☐ TABAGISMO (_____ cig/dia) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	
☐ ETILISMO (DOSE _____) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	
☐ CAFEÍNA (DOSE _____) DATA DE INÍCIO: _____ OBS: _____	

☐ ÁGUA DE POÇO DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ CONTATO COM AGROTÓXICOS DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ CONTATO COM PETROQUÍMICOS DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

☐ TTO GÁSTRICO DATA DE INÍCIO: _____ OBS:

COMORBIDADE / MEDICAMENTO	DOSE (n° vezes diária)	DATA DE INÍCIO

AMOSTRAS COLETADAS:

() Fezes () Swab Nasal () Sangue () Suor ()

Outro: _____