



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Letícia Carlos Giacomini

Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson

Rio de Janeiro
2018

Letícia Carlos Giacomini

Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências.

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

Rio de Janeiro

2018

G429c Giacomín, Letícia Carlos
 Caracterização do conteúdo molecular e efeito
 biológico de exossomos enriquecidos de plasma de
 pacientes com Doença de Parkinson / Letícia Carlos
 Giacomin. -- Rio de Janeiro, 2018.
 145 f.

 Orientadora: Luciana Pizzatti Barboza.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
 de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
 Graduação em Bioquímica, 2018.

 1. Doença de Parkinson. 2. Exossomos. 3.
 Metabolômica. I. Pizzatti Barboza, Luciana, orient.
 II. Título. |

Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro, 11 de setembro de 2018.

Prof^a. Dr^a. Luciana Pizzatti Barboza, Presidente
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ

Prof^a. Dr^a. Bianca Cruz Neves
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ

Prof^a. Dr^a. Débora Foguel
Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ

Dedico esta tese ao meu marido Vinícius, à
minha família e a todos que sofrem com o mal
de Parkinson.

Agradecimentos

Agreço à Deus.

Agreço ao meu marido Vinícius pela paciência de 8 meses em hemisférios diferentes. Aos meus pais e aos meus irmãos Larissa, Lourenço e Lucas pela disponibilidade e companherismo.

À toda a minha família que sempre me apoiou nos meus estudos.

À pós-graduação em Bioquímica pelo apoio.

À todos do LADETEC, em especial aos técnicos Willian, Tamara e Mariani, pela ajuda nas análises. Ao Professor Vinícius Sadela que me ensinou tudo que sei sobre espectrometria de massas.

À todos LABMOPS pelos momentos difíceis e também pelas risadas diárias: Sheila, Vanessa, Gabi, Nicole, Bruna, Felipe e Paula. Agreço à Professora Luciana Pizzatti pela orientação, conselhos e por ter me adotado na minha orfandade acadêmica.

Agreço imensamente à Dr^a Ana por nos receber no consultório para, literalmente, tirar sangue dos seus pacientes.

À todos os pacientes que aceitaram dar um pouquinho si por, de alguma maneira, acreditarem na ciência.

À Professora Elis, não só pelo apoio como representando da pós-graduação em Bioquímica, mas também por ter me dado a oportunidade de realizar o doutorado sanduíche.

Ao Professor Tiago Outeiro por ter me recebido em seu laboratório e a todos do Departamento de Neurodegeneração: Cristine, Evi, Mary, Anka, Diana L., Elly, Dany, Jenny, Eva, Alexandra, Sonja, Cristiane, Antônio e Inês. Obrigada por toda ajuda, colaboração nos experimentos e apoio nas frustrações. E à Diana P., Patrícia, Dani, Isabel e Joana pela amizade em língua portuguesa.

Agreço à banca: Professor Anderson e Professora Bianca, que colaboram desde o exame de qualificação, e; à Professora Débora, ao Professor Fábio e ao Professor Robson, também pela colaboração nas análises dos exossomos no ZetaView.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e à CAPES pelo financiamento do período sanduíche.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram na produção desta tese e que por algum motivo não foram citados.

“Conhecereis a verdade e ela vos libertará”

João 8, 32

Resumo

Giacomin, Letícia Carlos. Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A doença de Parkinson (DP) é o segundo tipo de doença neurodegenerativa mais comum caracterizada clinicamente por bradicinesia, tremor em repouso, rigidez muscular e instabilidade postural. Apesar de ainda não existir, no sangue, um biomarcador de diagnóstico, molecularmente a doença é caracterizada pela formação de agregados, chamados corpos de Lewy, onde ocorre o acúmulo da proteína α -*sinucleína* na região da substância negra *pars compacta*. Porém, sabe-se que outras áreas não dopaminérgicas, também estão envolvidas. Estudos recentes indicam o papel dos exossomos na comunicação célula-célula e na progressão da doença. Os exossomos são nanovesículas envoltas por bicamada lipídica, que podem conter ácidos nucleicos, metabólitos e proteínas específicas. Dentre os ácidos nucleicos presentes nos exossomos, estão os RNAs longos não-codificantes (RNAInc). Por isso, o objetivo desta tese é caracterizar o conteúdo molecular e avaliar o efeito biológico de exossomos plasmáticos de pacientes com DP. O estudo envolveu uma coorte com 101 pacientes e 36 doadores saudáveis. Os pacientes foram classificados segundo a escala de estadiamento Hoehn & Yahr em leve (45,54%), moderado (41,58%) e avançado (12,88%). A quantidade de α -*sinucleína* plasmática, quantificada através do ensaio ELISA, foi estatisticamente igual entre pacientes e controles. Porém foi estatisticamente maior nos exossomos dos pacientes. Além disso, os exossomos plasmáticos foram adicionadas às culturas celulares de HEK293 e H4 e observou-se um leve aumento na oligomerização e agregação da α -*sinucleína in vivo* pelos ensaio BiFC e pelo modelo de co-transfecção de SynT e Sph1, respectivamente. Para avaliação da metabolômica plasmática e exossomal, a etapa de pré-tratamento da amostra, extração líquido-líquido, foi otimizada. O método de detecção dos metabólitos, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de ultra performance, foi validado previamente às análises. Observou-se que a via do metabolismo de glicerofosfolídeos, a biossíntese de hormônios esteroidais e o metabolismo do ácido araquidônico estão relacionadas aos estágios leve, moderado e avançado da doença, no plasma, respectivamente. Além disso, o metabolismo de glicerofosfolídeos também apareceu alterado nas amostras de exossomos plasmáticos dos pacientes quando comparados com amostras de doadores

saudáveis, mostrando a relevância do estudo dessa via metabólica para o melhor entendimento da DP. Por último, foram realizadas análise de RNAInc por RT-qPCR para o grupo, em amostras de exossomos plasmáticos. Observou-se que os RNAInc Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, HOTAIR, lincRNA-RoR e lincRNA-SFMBT2, lincRNA-VLDLR podem estar relacionados ao desenvolvimento da patologia.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, exossomos, BiFC, *α-sinucleína*, metabolômica, RNA longo não-codificante

Abstract

Giacomin, Letícia Carlos. Caracterização do conteúdo molecular e efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Parkinson's disease (PD) is the second most common type of neurodegenerative disease clinically characterized by bradykinesia, resting tremor, muscle stiffness and postural instability. Although there is no diagnostic biomarker in the blood, molecularly the disease is characterized by the formation of aggregates, called Lewy bodies, where α -synuclein accumulation occurs in the region of the *substantia nigra pars compacta*. However, it is known that other non-dopaminergic areas are also involved. Recent studies indicate the role of exosomes in cell-cell communication and disease progression. Exosomes are nanovesicles enveloped by lipid bilayer, which may contain nucleic acids, metabolites and specific proteins. Among the nucleic acids present in the exosomes are the long non-coding RNAs (lncRNA). Therefore, the aim of this thesis is to characterize the molecular content and to evaluate the biological effect of plasmatic exosomes of patients with PD. The study involved a cohort of 101 patients and 36 healthy donors. Patients were classified according to the Hoehn & Yahr scale in early (45.54%), moderate (41.58%) and advanced (12.88%). The amount of plasmatic α -synuclein, quantified by ELISA, was statistically equal between patients and controls. However, it was statistically higher in patients' exosomes. In addition, plasmatic exosomes were added to the HEK293 and H4 cell cultures and a slight increase in oligomerization and α -synuclein aggregation was observed *in vivo* by the BiFC assay and by the SynT and Sph1 co-transfection model, respectively. For the evaluation of plasma and exosomal metabolomics, the sample pretreatment step, liquid-liquid extraction, was optimized. The method of detection of the metabolites, by liquid chromatography coupled to ultra performance mass spectrometry, was validated prior to the analysis. It was observed that the glycerophospholipid metabolism pathway, biosynthesis of steroid hormones and arachidonic acid metabolism are related to the early, moderate and advanced stages of the disease in plasma, respectively. In addition, the metabolism of glycerophospholipids also appeared altered in patients' plasmatic exosome samples when compared to healthy donor samples, showing the relevance of the study of this metabolic pathway for a better understanding of PD. Finally, lncRNA analysis by RT-qPCR for the group was

performed on plasmatic exosome samples. It was observed that the lncRNA Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, HOTAIR, lincRNA-RoR and lincRNA-SFMBT2, lincRNA-VLDLR may be related to the development of the disorder.

Keywords: Parkinson's disease, exosomes, BiFC, α -synuclein, metabolomics, long non-coding RNA.

Lista de abreviaturas

ASC: Área sob a curva

BiFC: Ensaio de complemento de fluorescência bimolecular, do inglês, "*Bimolecular fluorescence complementation*"

BSA: albumina sérica bovina, do inglês, "*Bovine serum albumin*"

CCV: Vesículas cobertas por clatrina, do inglês "*covered clathrin vesicles*".

cDNA: DNA complementar

CEE: células estaminais embrionárias

CL: Corpos de Lewy

CMV: corpos multivesiculares

CSF: líquido cefalorraquidiano

CYP: citocromos p450

DMEM: do inglês, "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*"

DNA: ácido desoxirribonucleico, do inglês, "*deoxyribonucleic acid*"

DP: Doença de Parkinson

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EET: ácido epoxieicosatrienóico, do inglês, "*epoxyeicosatrienoic acid*"

EGFP: proteína verde fluorescente aumentada, do inglês, "*Enhanced Green Fluorescent Protein*"

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês, "*gas chromatography coupled to mass spectrometry*"

H&Y: Escala Hoehn & Yahr modificada

H4: Células de neuroglioma humano

HEK: Células de rim embrionário humano 293

HETE: ácido hidroxieicosatetraenóico, do inglês, "*hydroxyeicosatetraenoic acid*"

DHET: ácido dihidroxieicosatrienóico, do inglês, "*dihydroxyeicosatrienoic acid*"

DPBS - tampão fosfato salino de Dulbecco, do inglês "*Dulbecco's phosphate-buffered saline*"

HMDB: Do inglês, "*Human Metabolome Database*"

iPSCs: células estaminais pluripotentes induzidas, do inglês, "*induced pluripotent stem cells*"

LC-HRMS: Cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas de alta resolução, do inglês, "*liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry*"

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês, "*liquid chromatography coupled to mass spectrometry*"

LOD: Limite de detecção, do inglês, "*limit of detection*"

m/z: Razão massa carga

MAO B: Monoamina oxidase tipo B

MEEM: mini exame do estado mental

miRNA: micro RNA

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

NAC: componente não- β -amiloide, do inglês, "*Non-A β component*"

NL: Neutritos de Lewy

PA: Para análise

PBS: Tampão fosfato salino, do inglês, "*phosphate buffered saline*"

PBS-T: PBS suplementado com 0,05% Tween-20

PFA: Paraformaldeído

pH: Potencial hidrogeniônico

PrP: Proteína priônica

PrP^C: Proteína priônica na forma celular

PrP^{Sc}: Proteína priônica na isoforma de *scrapie*

PVDF: Fluoreto de polivinilideno, do inglês, "*Polyvinylidene fluoride*"

qPCR: Reação da polimerase em cadeia quantitativa, do inglês, "*quantitative polymerase chain reaction*"

RMN: Ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucleico, do inglês "*ribonucleic acid*"

RNAInc: RNA longo não-codificante

RNAm: RNA mensageiro

RNAnc: RNAs não-codificantes

RNAr: RNA ribossomal

RNA-Seq: Sequenciamento de RNA

RNAi: RNA de interferência

ROC: Característica de operação do receptor, em inglês, "*receiver operating characteristic*"

Rps14: Proteína ribossômica humana 14, do inglês, "*ribosomal protein S14*"

RSD: Desvio padrão relativo, do inglês "*relative standard deviation*"

RT-qPCR: *Transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia quantitativa*, do inglês, "*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*"

SDS: Dodecil sulfato de sódio, do inglês, "*sodium dodecyl sulfate*"

SE: Escala Schwab & England

SFB: Soro fetal bovino

SNC: Sistema nervoso central

Sph1: Synphilin-1

SynT: α -*sinucleína* ligada a um fragmento truncado não fluorescente de EGFP

TBME: T-butil metil éter, do inglês, "*methyl t-butyl ether*"

TBS-T: do inglês, "*tris-buffered saline with Tween 20*"

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, do inglês, "*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*"

t_R : Tempo de retenção

UPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada a espectrometria de massa em tandem, do inglês, "*ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometer*"

Lista de figuras

Figura 1 Marcas celulares características da DP já registradas.	28
Figura 2 α -sinucleína humana.	29
Figura 3 Modelo esquemático de agregação da α -sinucleína.	31
Figura 4 Modelos de agregação da α -sinucleína utilizados em culturas celulares. ...	32
Figura 5 Espalhamento da α -sinucleína.	34
Figura 6 Mecanismos propostos de propagação da α -sinucleína.	35
Figura 7 Liberação das microvesículas e dos exossomos.	37
Figura 8 Conteúdo dos exossomos.	37
Figura 9 Esquema experimental da análise metabolômica.	39
Figura 10. Possíveis funções exercidas pelos RNAInc.	42
Figura 11 Fluxograma esquemático da análise metabolômica.	51
Figura 12 Projeção do design Doehlert no plano.	53
Figura 13 Esquema da síntese de cDNA de acordo com o kit <i>Human and Mouse LncProfilersTM qPCR Array Kits (System Bioscience)</i>	59
Figura 14 Desenho da placa <i>LncProliflers qPCR array Kit (System Bioscience)</i> utilizada no ensaio de RT-qPCR.	60
Figura 15 Montagem de placa para realização do RT-qPCR.	60
Figura 16 Condições de PCR.	61
Figura 17 Caracterização dos exossomos de plasma sanguíneo.	64
Figura 18 Quantificação da α -sinucleína plasmática e exossomal de sangue de pacientes com DP em <i>pool</i>	64
Figura 19 Quantificação da α -sinucleína plasmática de sangue de pacientes com DP individualmente.	65

Figura 20 Curva ROC. α -sinucleína (ng/ml) plasmática de pacientes com DP versus controle.....	65
Figura 21 Caracterização da α -sinucleína exossomal em plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson.	66
Figura 22 Efeito dos exossomos na oligomerização da α -sinucleína.	69
Figura 23 Efeito dos exossomos na formação de inclusões.....	70
Figura 24 Gráfico de superfície de resposta do efeito de diferentes condições de extração para a (A) foledrina, (B) prednisolona e (C) trembolona em pH ácido.	79
Figura 25 Cromatogramas para avaliação de seletividade/especificidade no tempo de retenção da metilefedrina.	81
Figura 26 Cromatogramas para análise de arraste no tempo de retenção da metilefedrina.....	82
Figura 27 Cromatogramas do <i>pool</i> do grupo leve de pacientes com Doença de Parkinson.....	84
Figura 28 Cromatogramas do <i>pool</i> do grupo moderado de pacientes com Doença de Parkinson.....	84
Figura 29 Cromatogramas do <i>pool</i> do grupo avançado de pacientes com Doença de Parkinson.....	84
Figura 30 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo leve com doença de Parkinson pelo controle.	85
Figura 31 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo moderado com doença de Parkinson pelo controle.	85
Figura 32 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo avançado com doença de Parkinson pelo controle.	86
Figura 33 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo leve com DP.	87
Figura 34 A rede metabólica do metabolismo de glicerofosfolípideo.....	88

Figura 35 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo moderado com DP.....	88
Figura 36 A rede metabólica da biossíntese de hormônios esteroidais.....	89
Figura 37 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo avançado com DP.	90
Figura 38 A rede metabólica do metabolismo do ácido araquidônico.	90
Figura 39 Cromatogramas do <i>pool</i> de exossomos de pacientes com Doença de Parkinson.....	92
Figura 40 Perfil de subtração das intensidades das moléculas dos exossomos do grupo com doença de Parkinson pelo controle.....	92
Figura 41 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no exossomos de plasma de pacientes com DP.....	93
Figura 43 Diagrama de Venn comparando RNAInc expressos para o grupo com DP e controle.....	99
Figura 44 Redes de correlação entre o RNAInc HOTAIR com proteínas, fatores de transcrição e outras moléculas de RNA.....	100
Figura 45 Redes de correlação entre o RNAInc LINC-ROR com proteínas, fatores de transcrição e outras moléculas de RNA.....	100

Lista de tabelas

Tabela 1 Critério de diagnóstico clínico segundo a <i>UK Parkinson's Disease Society Brain Bank</i>	23
Tabela 2 Escala de Estadiamento de Hoehn e Yahr Modificada.	24
Tabela 3 Escala de Atividades Diárias de Schwab e England.....	25
Tabela 4 Regiões gênicas e genes relacionados a DP.	27
Tabela 5 Planejamento experimental Doehlert para três variáveis.....	54
Tabela 6 Caracterização clínica da coorte.....	62
Tabela 7 Sumário dos resultados da curva ROC.	66
Tabela 8 Característica clínica das coorte. N.A.: Não avaliado.....	74
Tabela 9 Classes e substâncias endógenas e analitos análogos utilizados no procedimento de otimização.....	76
Tabela 10 Valores de recuperação (%) dos analitos em relação aos 13 experimentos envolvidos no processo de otimização.	78
Tabela 11 Condições críticas de extração para cada analito em pH ácido, alcalino e neutro e suas respectivas conclusões.....	80
Tabela 12 Fórmula química protonada (M+H), íon (m/z), tempo de retenção (minutos), concentração de trabalho (ng/mL), limite de detecção (ng/mL) e desvio padrão relativo (%) dos analitos envolvidos no procedimento de validação.	81
Tabela 13 Metabólitos alterados, suas respectivas vias o qual fazem parte e grupo de estadiamento que se originaram.	91
Tabela 14 Metabólitos alterados, sua respectiva via o qual fazem parte no estudo metabolômico do conteúdo exossomal de plasma de pacientes com DP..	93
Tabela 15 RNA's longos não codificantes de exossomos de sangue periférico de pacientes com DP diferencialmente expressos em relação ao controle.....	98

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	22
1.1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson	22
1.1.2 Avaliação clínica e sintomas da Doença de Parkinson	22
1.1.3 Tratamento da Doença de Parkinson	25
1.1.4 Etiologia da Doença de Parkinson	26
1.1.5 α-sinucleína	28
1.1.6 Modelos celulares para estudo de agregação da α-sinucleína	30
1.1.7 Modelos de propagação sugeridos para DP	33
1.2 EXOSSOMOS	35
1.2.1 Exossomos na Doença de Parkinson	38
1.3 METABOLÔMICA.....	39
1.4 RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 DESENHO DO ESTUDO	46
4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS	46
4.2.1 Western Blot	47
4.2.2 Microscopia eletrônica	47
4.2.3 Análise do tráfego de nanopartículas	48
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE A-SINUCLEÍNA.....	48
4.4 PLASMÍDEOS	49

4.5	Cultura de células e transfecções.....	49
4.6	Imunocitoquímica	50
4.7	Microscopia de fluorescência	50
4.8	Quantificação das inclusões de α -sinucleína.....	50
4.9	Metabolômica	50
4.9.1	Otimização	52
4.9.1.1	preparo da solução de analitos	52
4.9.1.2	ensaio de otimização	52
4.9.2	Validação qualitativa	55
4.9.3	Extração líquido-líquido	56
4.9.4	Análise das substâncias	57
4.9.5	Análise in silico da metabolômica	57
4.10	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS RNALNC.....	58
4.10.1	Síntese do cDNA	58
4.10.2	Ensaio de RT-qPCR	59
4.10.3	Análise in silico dos RNAInc	61
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	ANÁLISE DO EFEITO BIOLÓGICO DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLAMAS DE PACIENTES COM DP	62
5.1.1	Caracterização clínica da coorte	62
5.1.2	Caracterização dos exossomos de plasma sanguíneo	62
5.1.3	Quantificação da α-sinucleína plasmática e exossomal de pacientes com Doença de Parkinson e doadores saudáveis	64
5.1.4	Razão da α-sinucleína exossomal em plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson	66
5.1.5	Exossomos de plasma sanguíneos de pacientes com Doença de Parkinson e a indução da oligomerização da α-sinucleína	68

5.1.6	Exossomos de plasma sanguíneos de pacientes com Doença de Parkinson e a indução da agregação da α-sinucleína	69
5.2	ANÁLISE METABOLÔMICA DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLASMAS DE PACIENTES COM DP	73
5.2.1	Características clínicas da coorte	73
5.2.2	Metabolômica	75
5.2.2.1	otimização.....	75
5.2.2.1.1	preparo da solução de analitos.....	75
5.2.2.1.2	ensaio de otimização	77
5.2.2.2	validação.....	80
5.2.2.3	análise metabolômica de plasma total de pacientes com doença de parkinson	83
5.2.2.4	análise metabolômica de exossomos de plasma de pacientes com doença de parkinson.....	91
5.3	ANÁLISE DE RNALNC DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLASMA DE PACIENTES COM DP	98
6.	PERSPECTIVAS	105
7.	CONCLUSÃO	106
8.	REFERÊNCIAS	107
9.	APÊNDICES	123
10.	ANEXOS	141

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 em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, em sua publicação *“An Essay on the Shaking Palsy”* (PARKINSON, 2002). É a segunda doença neurodegenerativa mais comum, superada apenas pela doença de Alzheimer (DE LAU; BRETELER, 2006). A idade de início é por volta dos 60 anos (OLANOW *et al.*, 2009), havendo uma estimativa de que 1 a 2% dos indivíduos acima desta idade sejam afetados pela DP (DE LAU; BRETELER, 2006), sendo que no Brasil foi encontrada uma prevalência de 3,3% (BARBOSA *et al.*, 2006). Ocorre em aproximadamente 0,3% da população, afetando 5 milhões de pessoas em todo o mundo (OLANOW *et al.*, 2009) e sua incidência varia de 8 a 18 por 100.000 pessoas por ano (DE LAU e BRETELER, 2006). Devido ao envelhecimento populacional, espera-se um aumento expressivo da prevalência da DP nas próximas décadas, com grande impacto social e econômico (DE LAU e BRETELER, 2006; OLANOW *et al.*, 2009).

1.1.2 Avaliação clínica e sintomas da Doença de Parkinson

A DP é caracterizada por quatro sinais cardinais, sendo eles a bradicinesia (lentidão ao se iniciar os movimentos), rigidez muscular, tremor em repouso e instabilidade postural. Seu diagnóstico é essencialmente clínico, baseando-se na presença de bradicinesia e de pelo menos um dos sinais citados anteriormente (HUGHES *et al.*, 1992). Aliado ao parkinsonismo, a combinação de algumas características clínicas contribuem para uma melhor acurácia diagnóstica, a exemplo da presença de tremor em repouso, distribuição assimétrica dos sintomas e boa resposta ao tratamento de reposição dopaminérgica, baseado na levodopa (HUGHES *et al.*, 1992; OLANOW *et al.*, 2009).

Os sintomas são geralmente categorizados em motores e não-motores, e alguns sintomas podem ser provocados ou agravados pelo tratamento dopaminérgico (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). O diagnóstico é definido seguindo o critério do *UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank* (tabela 1, HUGHES *et al.*, 1992).

Tabela 1 Critério de diagnóstico clínico segundo a UK Parkinson's Disease Society Brain Bank. O diagnóstico é feito seguindo os 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.

Critério 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 supra- nuclear

Sinal cerebelar

Envolvimento autonômica severo inicial

Demência grave inicial com perturbações da memória, linguagem 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

3º Passo: Critério de suporte positivo prospectivo para doença de Parkinson

(três ou mais são necessário 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

Coreia induzida por levodopa

Resposta levodopa por 5 anos ou mais

Curso clínico de 10 anos ou mais

Os sintomas não motores são classificados em: distúrbios nas funções autonômicas, distúrbios do sono, distúrbios cognitivos e psiquiátricos e sintomas sensoriais. Sintomas gastrointestinais são comuns. Ocorre a diminuição da mobilidade do trato gastrointestinal com sintomas, tais como, plenitude pós-prandial e retenção

gástrica, porém, trânsito intestinal lento e constipação são de longe mais comuns, ocorrendo em 70-80% dos casos (JOST; ECKARDT, 2003; JOST, 2010).

Uma variedade de distúrbios do sono pode aparecer em aproximadamente dois terços dos pacientes sendo afetados (MEHTA *et al.* 2008). Elas incluem desordens no comportamento do sono REM, onde os pacientes agem conforme seus sonhos e até chutam durante a noite quando estão sonhando. Apneia obstrutiva do sono, quando a respiração para, também está bem relacionada à doença (MONDERER; THORPY 2009).

Deterioração cognitiva e demência são comuns na DP e podem ocorrer no início e com a doença já avançada (WILLIAMS-GRAY *et al.*, 2006). Depressão, ansiedade assim como sintomas sensoriais também são sintomas muito recorrentes na doença. Perda do olfato acontece em 80% dos pacientes e costuma aparecer antes dos sintomas motores (DOTY *et al.*, 1988).

Sintomatologicamente, os pacientes podem ser classificados em escalas. Uma escala muito utilizada é a de Hoehn & Yahr modificada (H&Y), que classifica os pacientes com DP em estágios, de acordo com a distribuição corporal dos sintomas e o nível de incapacidade, indicando a gravidade da doença. Indivíduos no estágio 1 são levemente comprometidos, enquanto no estágio 5 estão restritos à cadeira de rodas ou ao leito, como descrito na tabela 2 (GOETZ *et al.*, 2004).

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 à cadeira de rodas ou ao leito (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.

Outra escala muito utilizada para acompanhamento de pacientes com DP é a Schwab e England (SE) que analisa o grau de dependência para realizar atividades do dia-a-dia dos parkinsonianos em porcentagem (Tabela 3, RAMAKER *et al*, 2002).

Tabela 3 Escala de Atividades Diárias 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 (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 atividades diárias, com algum grau de lentidão, dificuldade e comprometimento. Pode demorar o dobro. Começando 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.
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.

1.1.3 Tratamento da Doença de Parkinson

O tratamento da DP é sintomático e envolve essencialmente a reposição da dopamina ou a supressão de oscilações neuronais patológicas por estimulação cerebral profunda, através de implante cirúrgico (ANTONY *et al.*, 2013). Com uma etiologia multifatorial, não há tratamento disponível que possa curar ou parar a progressão da doença.

A levodopa, prodroga da dopamina, é a terapia padrão inicial para os pacientes. Inicialmente, a resposta é boa (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). Porém, em consequência das complicações a longo prazo, há uma tendência a se protelar a utilização da levodopa, particularmente nas fases pouco sintomáticas da doença. Se a opção for pela não utilização da levodopa, teremos disponível para uso inicial uma das seguintes drogas, isoladamente ou em combinação: inibidores monoamina

oxidase tipo B (MAO B), anticolinérgicos (biperideno ou triexifenidila), amantadina e agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida, pramipexol; FERRAZ; BORGES, 2002).

A fisioterapia e a terapia ocupacional têm um papel importante no tratamento da DP, especialmente naqueles pacientes com distúrbio acentuado do equilíbrio e da marcha (DE ANGELIS *et al.*, 1997).

1.1.4 Etiologia da Doença de Parkinson

Em relação aos aspectos patológicos, a DP é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, juntamente com a presença de inclusões proteicas intracitoplasmáticas, conhecidas por corpos de Lewy (CL) e neutritos de Lewy (NL). Outras áreas não dopaminérgicas também estão envolvidas, como neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, neurônios noradrenérgicos do *locus ceruleus*, neurônios serotoninérgicos da rafe, bem como neurônios do córtex cerebral, tronco encefálico, medula espinhal e sistema nervoso autônomo periférico (FORNO, 1996). Há relatos de que os sintomas motores se iniciam quando há cerca de 50 a 60% de degeneração neuronal na substância negra e aproximadamente 80% de depleção dopaminérgica (WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

Apenas de 5-10% dos casos de DP apresenta-se como uma forma de herança mendeliana, ou seja, aproximadamente 90-95% dos casos da doença são esporádicos. A contribuição genética para DP não tinha sido levada em consideração até o início da década de 1990. No entanto, 15 anos após a identificação do primeiro gene relacionado com a forma dominante da doença, descobriu-se que diversas regiões cromossômicas estão relacionadas com a DP (KLEIN; WESTENBERGER, 2012). Apenas seis destas regiões têm os genes descritos, sendo eles: *SNCA* (α -sinucleína) e *LRRK2*, *PINK1*, *PARK7* (*DJ-1*), ATPase tipo 13A2 (*ATP13A2*) e *PARK2* (*Parkin*).

As características clínicas da DP de início precoce estão associadas com alterações em *PINK1*, *Parkin* e *DJ-1*, que estão todos direta ou indiretamente envolvidos em mecanismos de estresse oxidativo. As mutações em α -sinucleína normalmente causam rápida progressão da DP com formação generalizada e abundante dos corpos de Lewy. Mutações em *LRRK2* acometem cerca de 30-70% de pessoas com a doença na idade de 80 anos, e normalmente levam a um início tardio da DP associado a formação de corpos de Lewy, típico da patologia (SINGLETON *et*

al., 2013; OZELIUS *et al.*, 2006; GOLDWURM *et al.*, 2007). Finalmente, mutações em *ATP13A2* causam uma forma atípica de DP com demência, relacionada a síndrome de Kufor-Rakeb (RAMIREZ *et al.*, 2006). Dentre todas as regiões cromossômicas suspeitas, 18 ganharam o *status* de *loci 'Park'* (Tabela 4).

Tabela 4 Regiões gênicas e genes relacionados a DP (Adaptado de ANTONY *et al.*, 2013). De todos os genes que foram propostos como potenciais fatores genéticos para a DP, apenas o subgrupo listado aqui ganhou o *status* oficial de *loci* PARK. A coluna “herança” resume os modelos de herança, denominados atossômica dominante (AD), autossômica recessiva (AR) e modos desconhecidos de herança (NI, não identificado). A coluna “Associação com DP” resume a frequência gênica populacional em associação com a DP. Em contraste com fatores genéticos “raro” e “comum”, “fatores de risco” não são suficientes para causar a doença, mas estão associados ao seu risco.

Locus	Gene	Herança	Associação com DP	Cromossomo	Descrição do produto gênico
<i>PARK1</i>	<i>SNCA</i>	AD	Comum	4q21	Quatro mutações pontuais em α -sinucleína
<i>PARK2</i>	<i>Parkin</i>	AR	Comum	6q25.2–27	E3 ubiquitina ligase, 150 mutações incluindo mutações pontuais, deleções e inserções
<i>PARK3</i>	Unknown	AD	Rara	2p13	NI
<i>PARK4</i>	<i>SNCA</i>	AD	Comum	4p15	Duplicação ou triplicação de α -sinucleína
<i>PARK5</i>	<i>UCHL1</i>	AD	Rara	4p14	Ubiquitina c-terminal hidrolase L1, mutação pontual única
<i>PARK6</i>	<i>PINK1</i>	AR	Comum	1p35–36	Serina/treonina cinase mitocondrial indutore e PTEN > 60 mutações incluindo mutações pontuais e raramente deleções e inserções
<i>PARK7</i>	<i>DJ-1</i>	AR	Comum	1p36	Chaperona molecular redox dependente; > 10 mutações, incluindo mutações pontuais, inserções e duplicações
<i>PARK8</i>	<i>LRRK2</i>	AD	Comum	12q12	Cinase com repetições ricas em leucina; mutações pontuais como causa mais frequente de DP
<i>PARK9</i>	<i>ATP13A2</i>	AR	Comum	1p36	ATPase tipo-P neuronal, DP atípica
<i>PARK10</i>	Unknown	NA	Fator de risco	1p32	NI
<i>PARK11</i>	'GIGYF2'?	AD	Rara ou risco	2q36–37	Não confirmado
<i>PARK12</i>	Unknown	NA	Fator de risco	Xq21–25	NI
<i>PARK13</i>	<i>Omi/HTRA2</i>	AD?	Rara ou risco	2p12	Serina protease mitocondrial, mutações pontuais
<i>PARK14</i>	<i>PLA2G6</i>	AR	Rara	22q13.1	Fosfolipase A2, DP atípica
<i>PARK15</i>	<i>FBXO7</i>	NA	Fator de risco	22q12–13	E3 ubiquitina ligase, do atípica
<i>PARK16</i>	Unknown	NA	Fator de risco	1q32	NI
<i>PARK17</i>	<i>VPS35</i>	AD	Rara	16q11.2	Proteína vacuolar 35, mutações pontuais
<i>PARK18</i>	<i>EIF4G1</i>	AD	Rara	3q27.1	Fator 4 gama 1 iniciador da translação de eucariotos mutações pontuais

No entanto, está bem estabelecido que os fatores ambientais e genéticos estão correlacionados à fenótipos celulares, considerados como “marcas registradas da DP” (em inglês, *Hallmarks of PD*, figura 1). De fato, a exposição a certos pesticidas como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6,-tetrahidropiridina (MPTP) ou paraquat, resultam na degeneração de neurônios dopaminérgicos e parkinsonismo crônico (DI MONTE *et al.* 2002).

Embora a etiologia da DP esteja associada com diferentes disfunções celulares, esses são os possíveis fatores iniciadores.

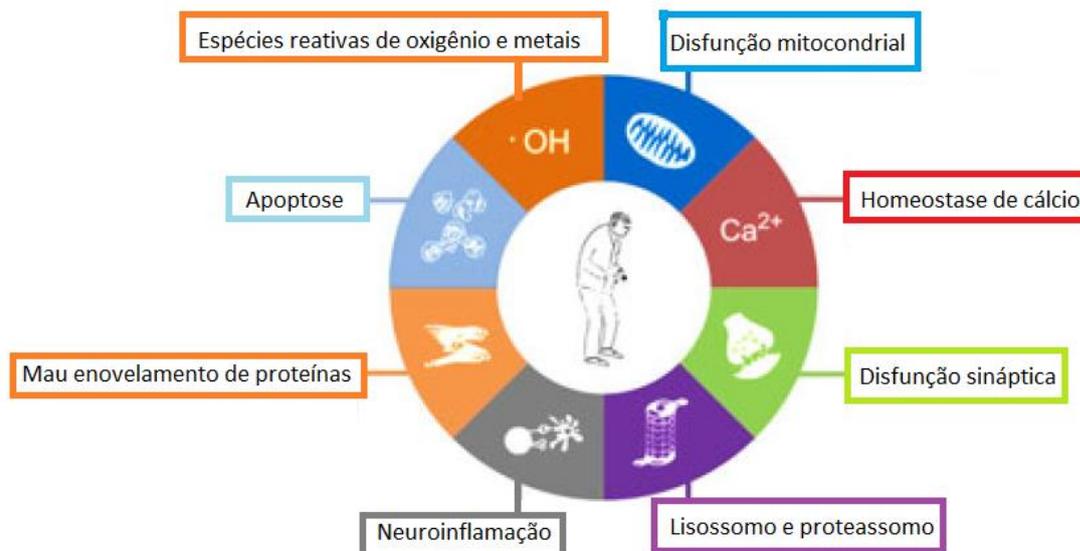


Figura 1 Marcas celulares características da DP já registradas (Adaptado de ANTONY *et al.*, 2013). Todos os subtipos da DP podem se dividir fenótipos celulares comuns. Correlações entre os fenótipos celulares representados e a progressão da doença foram estabelecidos. Em contraste, os mecanismos cronológicos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

O mau enovelamento de proteínas está relacionado a mutações no gene da α -sinucleína, que é a principal proteína componente de corpos de Lewy, a marca patológica da doença não só no cérebro dos portadores da mutação, mas também naqueles com sua forma esporádica. A desenovelamento da proteína é resultante de substituições de aminoácidos ou superexpressão gênica, podendo levar a oligomerização, fibrilação, agregação e consequente neurodegeneração posterior. Agregados de α -sinucleína (sob a forma de corpos de Lewy) interferem nas funções dos microtúbulos, causando disfunção sináptica e outras interrupções da homeostase neuronal (SHENG; CAI, 2012).

1.1.5 α -sinucleína

A α -sinucleína pertence a uma família com três diferentes produtos gênicos: além da α -, β - e γ -sinucleína. Estas proteínas foram descritas em vertebrados, e parecem ser altamente conservadas entre espécies de vertebrados distantes (MAROTEAUX *et al.*, 1988; JAKES *et al.*, 1994; GEORGE *et al.*, 1995). A α -sinucleína foi descoberta pela primeira vez no órgão elétrico de *Torpedo californica*, e chamada de sinucleína devido sua localização celular ser no interior dos terminais nervosos sinápticos, e dentro do compartimento nuclear (MAROTEAUX *et al.*, 1988). No entanto, α -sinucleína não foi consistentemente encontrada no núcleo em vários estudos subsequentes, e este ainda é um assunto em discussão.

A α -sinucleína é uma proteína pequena de 140 aminoácidos, intrinsecamente desordenada, altamente carregada negativamente, termicamente estável e, funcionalmente, apresenta-se em três domínios. O domínio N-terminal é uma região altamente conservada com uma série hexamérica (KTKEGV) que se repete. Todas as mutações familiares descritas estão localizadas no domínio N-terminal, sugerindo que esta região possui uma importante função (Figura 2).

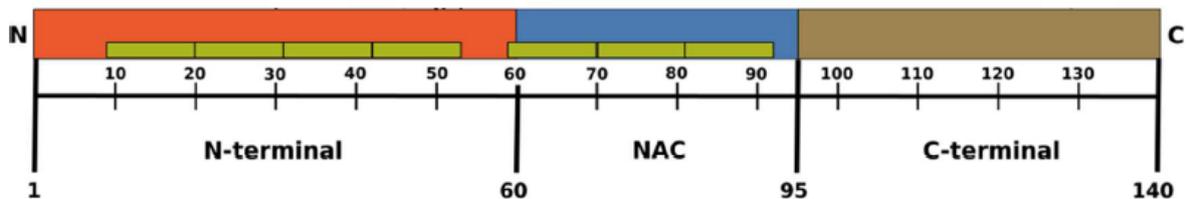


Figura 2 α -sinucleína humana. Representação esquemática da estrutura da α -sinucleína humana, mostrando os três domínios distintos: N-terminal, componente não- β -amiloide (NAC) e C-terminal. Posição dos aminoácidos indicada na parte inferior. Caixas verdes representam as repetições hexaméricas KTKEGV. Adaptado de GALLEGOS *et al.*, 2015.

O domínio hidrofóbico central da α -sinucleína também é referido como a região NAC (componente não- β -amiloide). Esta região amiloidogênica tem a capacidade de alterar a conformação de *random coil* para estrutura em folha β (SYKES *et al.* 1990; SERPELL *et al.*, 2000), e formar $A\beta$ -like protofibrilas e fibrilas (HARPER *et al.*, 1997; HARPER *et al.*, 1999). A região C terminal é a menos conservada na família das sinucleínas e é variável em tamanho e sequência. Este é um domínio altamente ácido composto por resíduos de prolina, glutamato e aspartato (AMER *et al.*, 2006), e foi proposto para conferir atividade semelhante à chaperona à proteína (KIM *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002).

Compreender os mecanismos envolvidos no processo de agregação da α -sinucleína é crucial para identificar as espécies tóxicas que desencadeiam doenças. Um conceito amplamente aceito é a hipótese de que os oligômeros de α -sinucleína e as protofibrilas são as espécies citotóxicas, e que os agregados insolúveis maiores são citoprotetores (CAUGHEY *et al.*, 2003; WINNER *et al.*, 2011). Como afirmado acima, a α -sinucleína é uma proteína desordenada em solução. Esta falta de estrutura secundária e terciária definida permite que ela adote múltiplas conformações. Assim, ainda não está claro como a forma nativa da α -sinucleína adquire uma estrutura que é propensa a agregação. Ainda não se sabe exatamente quais das espécies de α -sinucleína são responsáveis pela citotoxicidade celular e neurodegeneração.

A disfunção da via de degradação molecular e das organelas é mais uma marca da DP, e fortes evidências indicam interações funcionais entre o sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia (KOROLCHUK *et. al.*, 2010; CHU *et. al.*, 2009). Considerando que os dois sistemas de degradação estão envolvidos na depuração de proteínas desnoveladas, uma forma especial de autofagia, também conhecido como mitofagia, remove mitocôndrias defeituosas das células (LEE *et. al.*, 2012). Na DP, a disfunção destes sistemas de depuração facilita o acúmulo de α -sinucleína e mitocôndrias defeituosas. Estudos recentes demonstraram que formas mutadas da α -sinucleína podem inibir a sua própria degradação por autofagia (MARTINEZ-VICENTE *et. al.*, 2008).

1.1.6 Modelos celulares para estudo de agregação da α -sinucleína

Como a agregação da α -sinucleína é uma das características das sinucleinopatias, o estudo deste processo é crucial para compreender os mecanismos patológicos subjacentes à formação dos CLs. Vários modelos celulares foram desenvolvidos na tentativa de estudar este aspecto. No entanto, ao contrário de muitas proteínas propensas a agregar, α -sinucleína não agrega prontamente quando superexpressa em culturas celulares.

É provável que a auto-interação de α -sinucleína em dímeros seja o evento primário subjacente à formação de espécies de maior massa molecular. Então, a formação dos dímeros, é o passo inicial limitante da agregação da α -sinucleína (KRISHNAN *et al.*, 2003; ROOSTAEE *et al.*, 2013). Portanto, mimetizar as etapas iniciais de agregação da proteína nas células é de grande interesse. Uma abordagem para permitir a visualização de dímeros de proteínas em células vivas é o ensaio de complemento de fluorescência bimolecular (BiFC; KERPPOLA, 2006). Este sistema envolve a associação de dois fragmentos não fluorescentes (VN- α -sinucleína e α -sinucleína-VC) de uma proteína fluorescente, reconstituindo o fluoróforo funcional (VENUS). Este método permite a visualização direta de interações proteína-proteína no contexto de uma célula viva e, portanto, sua localização subcelular (Figura 3).

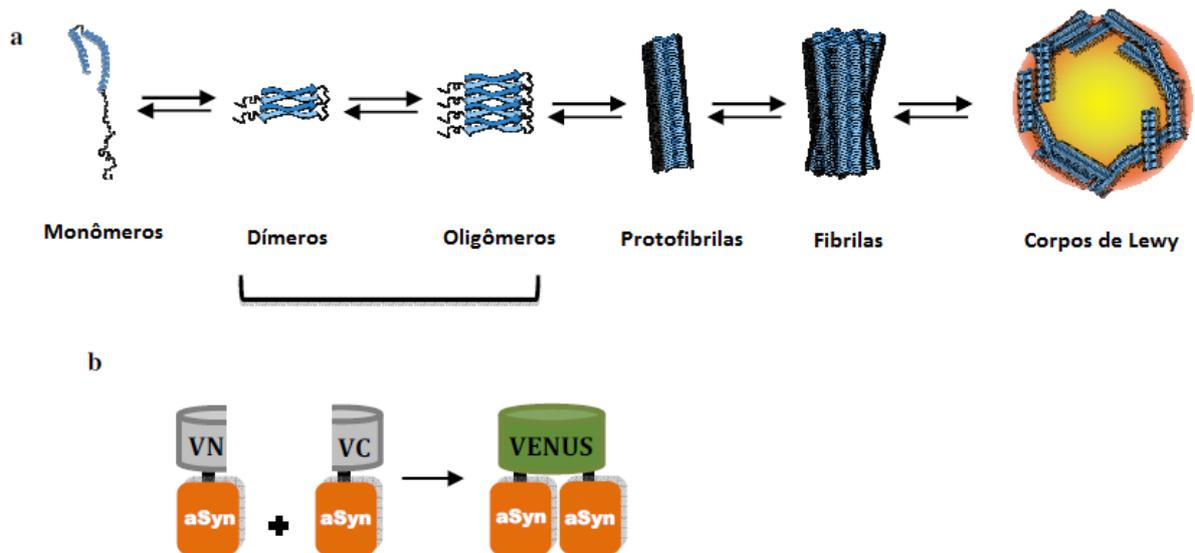


Figura 3 Modelo esquemático de agregação da α -sinucleína. Sumário dos modelos de agregação da α -sinucleína. (a) Proposta do mecanismo de agregação da α -sinucleína. (b) Representação esquemática do Venus BiFC. Esse modelo permite uma visualização *in vivo* de um sistema complexo. aSyn: α -sinucleína.

O ensaio BiFC foi aplicado para o estudo da oligomerização da α -sinucleína por fusão de cada um dos fragmentos de proteína fluorescente pelo o N- e/ou C-terminal. Quando a α -sinucleína interage e forma dímeros e/ou oligômeros, os dois fragmentos não fluorescentes podem gerar fluorescência. Dímeros e oligômeros da α -sinucleína são detectados também no núcleo da célula, e essas espécies levaram a um aumento da citotoxicidade (OUTEIRO *et al.*, 2008).

Outro modelo celular útil no estudo da agregação da α -sinucleína consiste na co-expressão da proteína ligada a um fragmento truncado não fluorescente de EGFP (proteína verde fluorescente aumentada, do inglês, “*Enhanced Green Fluorescent Protein*”; SynT) juntamente com Synphilin-1 (Sph1; MCLEAN *et al.*, 2001), como pode ser observado pela análise da figura 4. Esse constructo permite a visualização de inclusões de α -sinucleína citoplasmáticas semelhante aos encontrados nos CL, após imunocoloração.

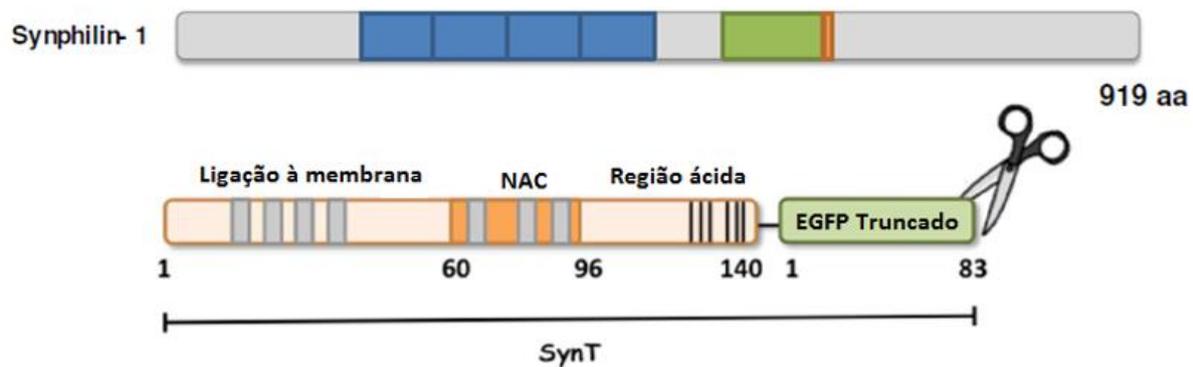


Figura 4 Modelos de agregação da α -sinucleína utilizados em culturas celulares. Co-expressão de SynT com Sph1 leva a expressão de inclusões no citosol. Os 83 aminoácidos do EGFP são fusionados à porção C-terminal da α -sinucleína. Sph1, caixas azuis: repetições tipo anquirina; caixa verde: domínio tipo *coiled coil*; caixa laranja: sítio de ligação ao ATP, GTP. EGFP: proteína verde fluorescente aumentada, do inglês, “*Enhanced Green Fluorescent Protein*”.

Sph1 é uma proteína com 919 aminoácidos, composta por diferentes domínios. Existe predominantemente como uma proteína de 90 kDa, mas também pode ocorrer como uma isoforma de 120 kDa. Fragmentos menores de Sph1 também são detectados no cérebro humano, e pode representar formas proteolíticas processadas, ou espécies alternadamente processadas (MURRAY *et al.*, 2003).

A Sph1 é uma proteína neuronal, enriquecida em terminais nervosos pré-sinápticos (RIBEIRO *et al.*, 2002) e foi identificada pela primeira vez como uma proteína que interage com α -sinucleína em um estudo em levedura (ENGELENDER *et al.*, 1999). Isto também foi confirmado por estudos em células de mamíferos (KAWAMATA *et al.*, 2001), onde co-expressão de um domínio de α -sinucleína e Sph1 resultou na formação de inclusões citoplasmáticas que se assemelham a CLs (ENGELENDER *et al.*, 1999). Como consequência, foi considerado um gene candidato relacionado a DP (uma vez que se liga a α -sinucleína, potencializa sua agregação e está presente em CLs). Usando este modelo, foi mostrado que alterações no C-terminal da α -sinucleína pode aumentar o seu potencial para formar inclusões intracelulares, pois isso não se deve simplesmente pelo fragmento de EGFP usado. A fusão do mesmo 83 aminoácidos de EGFP com tubulina ou a sinaptofisina não induziu a formação de inclusões proteicas (MCLEAN *et al.*, 2001).

Todos esses modelos de células têm suas limitações, uma vez que nenhum ensaio baseado em células é capaz de recapitular a fisiologia *in vivo* da α -sinucleína (ASTASHKINA *et al.*, 2012). Contudo, facilitam a interpretação do efeito de eventos/vias, mutações ou drogas/pequenos compostos, na agregação da α -

sinucleína e, portanto, são extremamente valiosos para esses estudos. De qualquer forma, outros métodos para o diagnóstico precoce da doença são claramente necessários.

1.1.7 Modelos de propagação sugeridos para DP

Nos últimos anos, houve um aumento de estudos que tentam estabelecer uma analogia entre as doenças priônicas com sinucleinopatias, sugerindo que α -*sinucleína* pode se comportar de uma maneira semelhante a um príon. A proteína do príon (PrP) pode agir tanto de maneira normal quanto como agente patogênico infeccioso (PRUSINER 1982). Os patógenos podem se espalhar/transmitir dentro e entre espécies após alterações na conformação da proteína: a forma celular de PrP (PrP^C) é rica em α -*hélices*, e converte-se na forma de *scrapie* (PrP^{Sc}) que é rico em estrutura de folha β . Além disso, o PrP^{Sc} atuará como um indutor e recrutará PrP^C em agregados, desencadeando sua conversão em PrP^{Sc} (RIEK *et al.*, 1996; WILLE *et al.*, 2009). No entanto, nas sinucleinopatias, a terminologia do tipo príon indica que α -*sinucleína* pode compartilhar algumas características com príons, como a propagação, embora sem ter propriedades infecciosas.

Além disso, de acordo com a hipótese de Braak, a topografia e a presença de CL está correlacionada com a extensão e gravidade dos sintomas da DP. O aparecimento cronológico dos sintomas da DP começa com uma fase pré-sintomática caracterizada por perdas olfativas, distúrbios do sono e constipação (onde os CLs/NLs são restritos ao sistema entérico periférico, bulbo olfatório e tronco cerebral caudal), seguido da fase de sintomas motores (patologia de Lewy aparece no sistema nervoso). A fase final é caracterizada por declínio cognitivo e sintomas psiquiátricos (os CLs atingem a neocórtex; BRAAK *et al.*, 2003) Os estágios da hipótese de Braak estão ilustrados na figura 5.

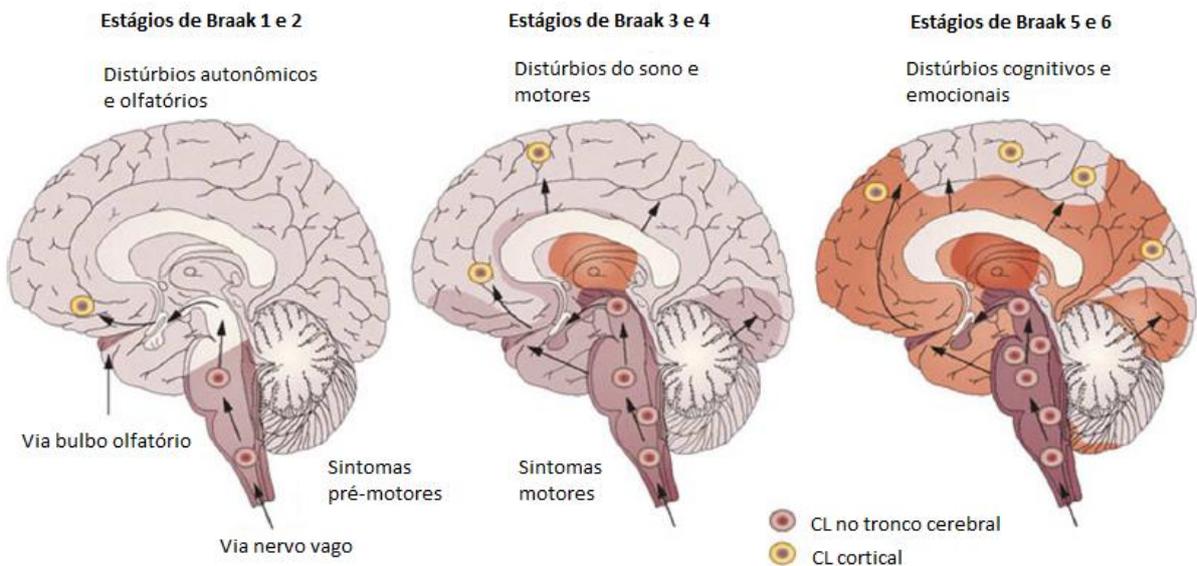


Figura 5 Espalhamento da α -sinucleína. Os estágios de Braak levantam a hipótese de que a DP se inicia no bulbo olfatório e se dispersa para as regiões corticais (DOTY 2012).

Enxertos de neurônios mesencefálicos embrionários em pacientes com DP foram encontrados apresentando CLs anos após o transplante (KORDOWER *et al.*, 2008; KORDOWER *et al.*, 2008; BRUNDIN *et al.*, 2010), de forma a confirmar a hipótese proposta por Braak (BRAAK *et al.*, 2006). A capacidade da α -sinucleína fibrilar de se autopropagar e espalhar, sugere que as transmissões celulares desempenham um papel na progressão da doença (BRAAK *et al.*, 2003; ANGOT *et al.*, 2010).

Uma única injeção intrastriatal de α -sinucleína desenvolvida em camundongos foi capaz de iniciar uma cascata neurodegenerativa pelo acúmulo de CLs/NLs intracelulares, perda dos neurônios e comprometimento da coordenação motora. Assim, a α -sinucleína é suficiente para induzir as características comportamentais e patológicas da DP esporádica (LUK *et al.*, 2012). De acordo com a hipótese de Braak, um estudo recente mostrou que em camundongos injetados com fibrilas de α -sinucleína no bulbo olfatório foi capaz de se espalhar gradualmente a partir do local injetado para múltiplas regiões cerebrais olfativas e não-olfativas que são afetadas pela DP (REY *et al.*, 2016). Outro estudo interessante mostrou que o tratamento intragástrico administrando rotenona (um inibidor do complexo I da cadeia respiratório mitocondrial) induz um acúmulo progressivo de α -sinucleína no sistema nervoso entérico, surgindo sequencialmente no núcleo motor dorsal do nervo vago, medula espinhal e sistema nervoso em camundongos (PAN-MONTOJO *et al.*, 2010). Essas

observações reforçam a ideia de que a DP pode começar na periferia e progredir até atingir o cérebro.

Evidências convergentes sugerem que a α -sinucleína liberada é captada por células neuronais. Está presente no líquido cefalorraquidiano (CSF), plasma sanguíneo e saliva, em pacientes normais e afetados (EL-AGNAF *et al.*, 2003; EL-AGNAF *et al.* 2006; AL-NIMER *et al.*, 2014). O mecanismo pelo qual a α -sinucleína é liberada ainda não está claro. Assim, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos seria importante para a potencial identificação de novos biomarcadores e alvos para a intervenção terapêutica. Foi proposto que a transferência da α -sinucleína pode ocorrer via liberação direta, exossomos, endocitose e nanotubos de tunelamento (WALES *et al.*, 2013; Figura 6).

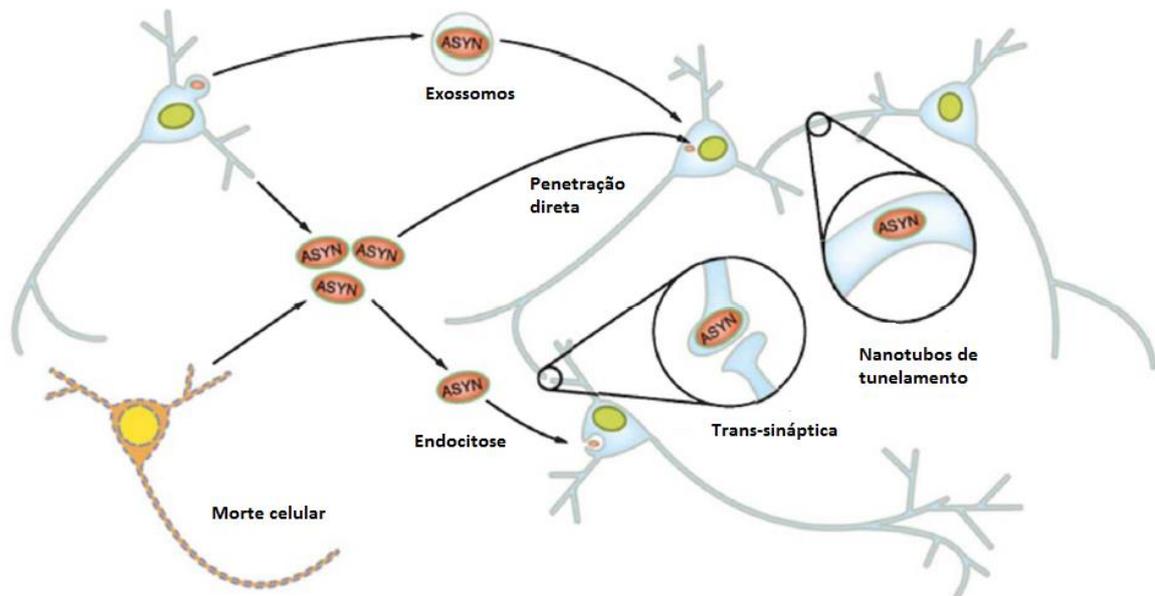


Figura 6 Mecanismos propostos de propagação da α -sinucleína. Muitos mecanismos tem sido propostos para a transferência da α -sinucleína entre os neurônios e indução da doença em outras regiões cerebrais. Uma vez liberados para o meio extracelular, via exocitose ou exossomos, essas espécies podem entrar em outros neurônios por penetração direta ou endocitose. Os dois outros mecanismos possíveis envolvem interação direta entre o hospedeiro e a célula e podem ocorrer pela formação de nanotubos de tunelamento ou via transmissão trans-sináptica. ASYN: α -sinucleína. Adaptados de WALES *et al.*, 2013.

Nesta tese iremos estudar mais detalhadamente o papel dos exossomos na propagação da DP.

1.2 EXOSSOMOS

Exossomos são vesículas esféricas de 30 a 100 nm que são liberadas para o espaço extracelular por diversos tipos de células e desempenham variados tipos de funções (MATHIVANAN; SIMPSON, 2010; TRAJKOVIC *et al.*, 2008). Assim como as

microvesículas, os exossomos também transportam biomoléculas das células de origem (SARKAR *et al.*, 2009). Juntos, eles são citados como vesículas extracelulares e podem ser distinguidos não apenas pelo seu tamanho, mas também pela sua origem. Ao contrário das microvesículas que são liberadas da membrana plasmática (LEE *et al.*, 2012; RAPOSO; STORVOGEL, 2013; Figura 7), os exossomos são formados por um brotamento do endossomo tardio e encapsulam diversas proteínas celulares (HANNAFON; DING, 2010; BOBRIE *et al.*, 2011). Os endossomos tardios são empacotados com várias dessas vesículas e são geralmente mencionados como corpos multivesiculares (CMV). Os CMVs são destinados a fusão com os lisossomos, que levam a degradação do conteúdo das vesículas, ou à membrana plasmática que permite que os exossomos sejam liberados no espaço extracelular. A formação dessas vesículas é um processo regulado que envolve a organização da membrana endossomal em domínios que são altamente enriquecidos por uma classe específica de proteínas de membrana, chamadas de tetrasparinas. Muitos membros da família das tetrasparinas que incluem CD9, CD63 e CD81 são altamente presentes nos exossomos e servem como marcadores para estas vesículas (GUPTA; PULLIAM, 2014).

Em relação à sua composição, os exossomos possuem proteínas necessárias para o seu transporte e fusão (anexinas, proteínas Rab, flotilina), proteínas associadas à biogênese dos CMV (Alix, TSG101), proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp90) (OHNO *et al.*, 2013), como ilustra a figura 8. Essas vesículas também podem carrear uma variedade de proteínas do citoesqueleto (actina, tubulina, cofilina) e enzimas metabólicas (GAPDH e piruvato cinase). Adicionalmente, a membrana exossomal é enriquecida com *lipis-rafts*, que incluem colesterol, esfingolipídeos, ceramida e glicerolfosfolipídeos contendo cadeias longas e saturadas de ácidos graxos. Curiosamente, os exossomos secretados a partir de células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas, também apresentam complexos de histocompatibilidade principais funcionais (MHC I e II) na sua superfície (UTSUGI-KOBUKAI *et al.*, 2003; LUKETIC *et al.*, 2007).

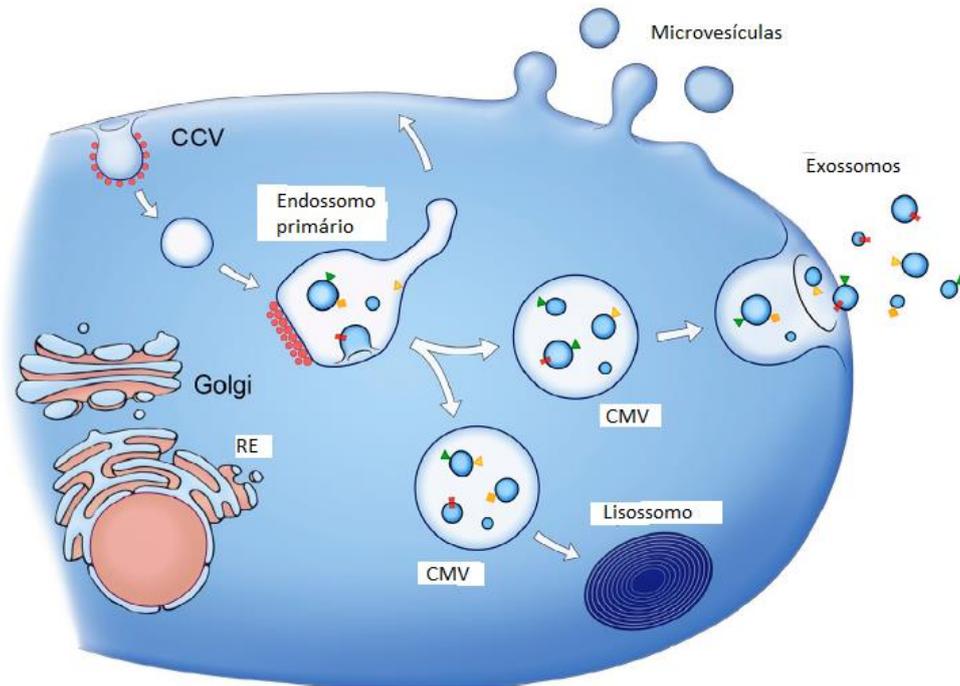


Figura 7 Liberação das microvesículas e dos exossomos. As microvesículas são liberadas diretamente da membrana plasmática, enquanto os exossomos são liberados pela fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática. Outros corpos multivesiculares podem se fundir aos lisossomos. As bolas vermelhas representam as clatrininas associadas às vesículas na membrana plasmática ou clatrininas cobrindo a membrana dos endossomos. CMV: Corpos multivesiculares; CCV: Vesículas cobertas por clatrina, do inglês “covered clathrin vesicles”. Adaptado de RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013.

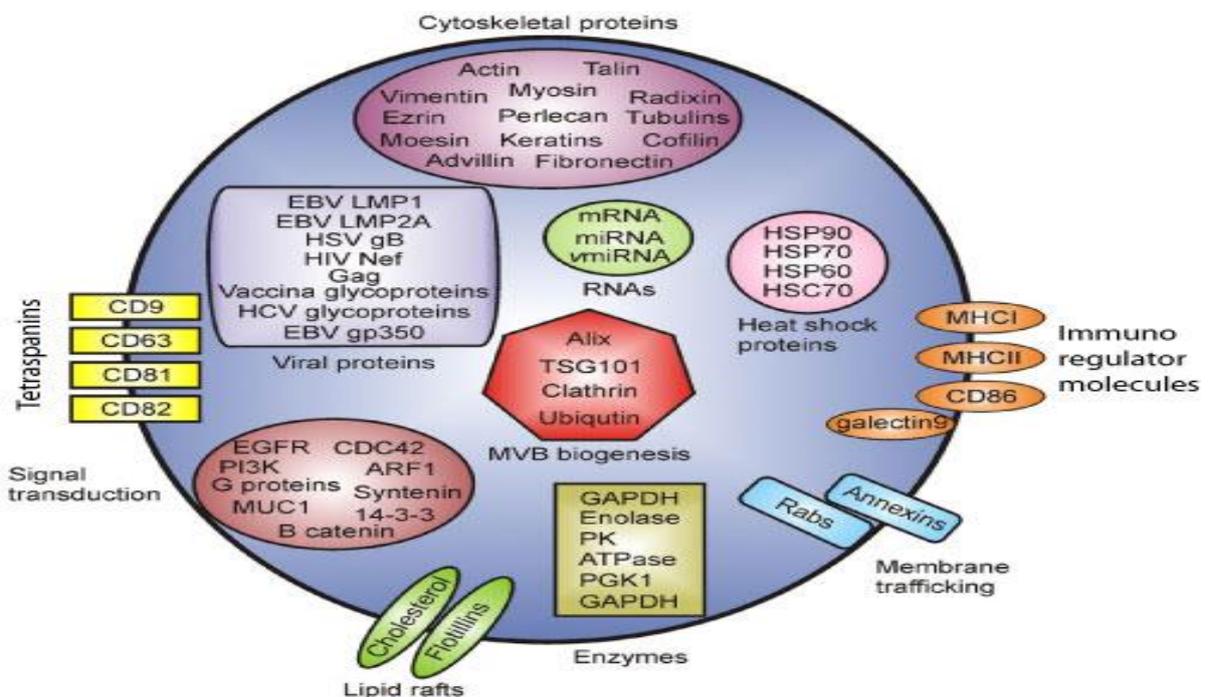


Figura 8 Conteúdo dos exossomos. Os exossomos possuem em sua membrana proteínas específicas das células de origem, bem como as chamadas tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 e CD82) que são consideradas marcadoras de exossomos em amostras purificadas. Estas nanovesículas também podem conter micro RNAs (miRNA), *Epstein Bar Virus* (EBV), proteínas de choque térmico, RNAs longos não codificantes (RNA lnc), dentre outras moléculas. Adaptado de MECKES *et al.*, 2011.

São liberados tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas e garantem a comunicação intercelular entre células de diferentes linhagens. Inicialmente, imaginou-se que seriam vesículas que carregariam apenas conteúdo desnecessário para as células de origem (GUPTA; PULLIAM, 2014). Essas observações rapidamente mudaram as percepções sobre os exossomos para mensageiros da comunicação celular. Nos últimos anos, os achados relativos aos exossomos mostraram sua atuação não apenas como potenciais biomarcadores para diversas doenças, mas também como um mecanismo para o desenvolvimento de muitas condições patológicas (GUPTA; PULLIAM, 2014).

1.2.1 Exossomos na Doença de Parkinson

Assim como para as outras doenças neurodegenerativas, sabe-se que os exossomos estão envolvidos no transporte de α -sinucleína para o espaço extracelular e a propagação de oligômeros tóxicos para neurônios não afetados (DANZER *et al.*, 2012). A captação da α -sinucleína está relacionada com a indução de morte celular em neurônios saudáveis (EMMANOULIDOU *et al.*, 2010), destacando o papel dessas vesículas na patogênese das doenças neurodegenerativas. Além disso, estudos recentes mostraram que o papel dos exossomos na patogênese da DP se baseia na presença das formas mutantes de diversas proteínas envolvidas em vias endocíticas, tais como *LRRK2* e a proteína vacuolar 35 correlacionados com a doença (RUSSO *et al.*, 2012). *LRRK2*, por exemplo, foi visto regulando a transmissão sináptica e sua superexpressão está associada com a supressão da endocitose e exocitose das vesículas sinápticas nos neurônios (XIONG *et al.*, 2010). Além disso, mutações em *LRRK2* levam a um aumento anormal no número de CMV morfológicamente distintos (ALEGRE-ABARRATEGUI; WADE-MARTINS, 2009). A formação de um grande número de CMVs pode potencialmente levar ao acúmulo de exossomos contendo a forma tóxica da proteína α -sinucleína e auxiliar na propagação da doença.

Recentemente foi descoberto que os exossomos não contêm apenas proteínas, mas também pequenas moléculas (metabólitos), alvo de estudo da metabolômica; além de transcritos de RNA mensageiro (RNAm) assim como micro RNA (miRNA) e RNA longo não-codificante (RNAInc; VINCIGUERRA; STUTZ, 2004). Produtos de vias de sinalização, vírus, dentre outros, podem ser transportados através dos exossomos (FEVRIER *et al.*, 2005).

1.3 METABOLÔMICA

Apesar dos muitos esforços que têm sido feitos para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DP, ainda há muito a ser descoberto. Devido à complexidade etiológica da doença, a identificação de vias moleculares facilitará a sua compreensão e aumentará a capacidade de diagnóstico e tratamento. Uma ferramenta para atingir esse objetivo é a metabolômica, que é um conceito que promove a identificação de metabólitos, fornecendo o perfil metabólico e assinatura da amostra analisada (Figura 9; CAUDLE *et al.*, 2010).

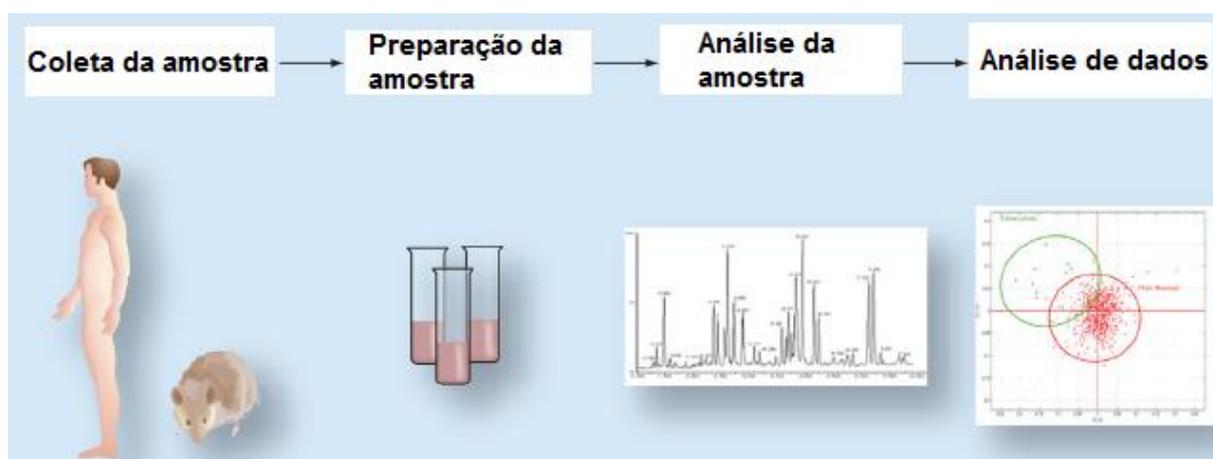


Figura 9 Esquema experimental da análise metabolômica. As amostras são coletadas dos objetos de estudo e, posteriormente são preparadas para a análise por ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massas. Os dados gerados são analisados com auxílio de banco de dados para discriminar vias relacionadas à doença estudada. Adaptado de CAUDLE *et al.*, 2010.

Estudos recentes tem focado na identificação da etiologias moleculares relacionada a DP que levam a *déficits* na homeostase protéica e autofagia (GORMAN, 2008; MEHTA *et al.*, 2013). Perfis metabólicos surgiram, indicando que a função mitocondrial e o estresse oxidativo são críticos para a manutenção da homeostase proteica (VENDRUSCOLO *et al.*, 2011). Como a função mitocondrial é criticamente sensível à alterações metabólicas, mudanças nas assinaturas metabólicas podem aumentar o estresse oxidativo mitocondrial e gerar modificações lipídicas, causando falhas no sistema autofágico e no lisossomo, que levam ao desdobramento da proteína, formação de fibrilas e agregação (NIXON , 2013). Abordagens metabólicas ligadas a investigação da biologia de sistemas são cada vez mais populares devido à sua capacidade única de revelar os componentes ambientais, genéticos e fisiológicos que combinados levam a estados patológicos.

A metabolômica pode ser usada para rastrear rotas metabólicas perturbadas de doenças com mecanismos patológicos que podem ser desconhecidos ou pouco compreendidos, para assim, gerar novas hipóteses baseadas em dados, ou para validar hipóteses estabelecidas a partir de genomas, transcriptomas ou proteomas (NORDSTRÖM *et al.*, 2010; VAN DER GREEF *et al.*, 2013; THYSELL *et al.*, 2010). A compreensão do metaboloma também é uma boa abordagem para preencher a lacuna entre os perfis genótipo-fenótipo e é considerada uma ferramenta promissora e potencialmente útil para o diagnóstico laboratorial (BUJAK *et al.*, 2015).

Todavia, devido a grande diversidade de moléculas pequenas, não existe um método de preparação de amostra perfeito que maximize a detecção de todos os metabólitos de todos os fluidos biológicos e tecidos. A preparação irá depender do método analítico subsequente a ser utilizado (CAUDLE *et al.*, 2010).

Várias plataformas para o estudo da metabolômica em amostras de pacientes com DP tem sido utilizadas, como espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A espectroscopia de RMN pode fornecer um alto nível de informação estrutural (MARION, 2013). A principal vantagem da RMN é a capacidade de identificar novos compostos, mas sua sensibilidade é várias ordens de magnitude mais baixa que a sensibilidade de GC-MS ou LC-MS (WISHART, 2016; DIAS *et al.*, 2016).

No entanto, ainda existem algumas limitações e melhorias que devem ser levadas em conta. Assim, um método de preparação de amostra seletiva, bem como técnicas analíticas apropriadas, deve ser aplicado para fornecer uma determinação confiável de metabólitos. A preparação dependerá do método analítico subsequente a ser usado. Para LC-MS, a precipitação de proteína é comumente utilizada, seguida pela adição de solvente orgânico e centrifugação (CAUDLE *et al.*, 2010).

Além de diversos metabólitos, formas tóxicas de proteínas agregadas, tais como α -sinucleína e príons, que são responsáveis pelo desenvolvimento das DP e doença de Creutzfeldt-Jacob, respectivamente, foram observadas empacotadas em exossomos e liberadas de uma célula para outras, iniciando a cascata inflamatória. Embora tenha-se inicialmente sugerido que atuariam como sinalização, removendo componentes celulares indesejados do cérebro, novas evidências sugerem que estes exossomos podem estar contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento e propagação de diversas neuropatologias (CAUDLE *et al.*, 2010).

1.4 RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE

Sabe-se que apenas 1,5-2% do genoma humano são regiões que codificam proteínas. Enquanto isso, as regiões restantes pertencem a transcritos que não as codificam e são conhecidos como RNAs não-codificantes (RNAnc). Acredita-se, porém, que eles possuem atividade regulatória extremamente importante em células normais em desenvolvimento, participando nos processos funcionais e patogênicos de diversas doenças (BARTEL, 2004; ESTELLER, 2011). Os primeiros RNAnc a serem identificados foram os RNAs ribossomal (RNAr) e transportador (RNAt), correspondendo, juntos, a 95% do conteúdo celular de RNA. Os outros tipos de RNAnc são classificados em curtos e longos, se forem menores ou maiores que 200 nucleotídeos, respectivamente.

Evidências recentes enfatizam o papel dos RNAnc em diversos processos biológicos (desenvolvimento e diferenciação cerebral) e em várias doenças neurodegenerativas como, Alzheimer, Huntington e Parkinson (SALTA; STROOPER, 2012). Já foram descobertas funções na biologia de células tronco, epigenética, câncer, sinalização e neurobiologia (PAULI *et. al.*, 2011; WANG *et. al.*, 2011; GUPTA *et. al.*, 2010).

São pouco conservados entre as espécies, mostram-se altamente específicos a tecidos e possuem baixos níveis de expressão (PAULI *et. al.*, 2012; MERCER *et. al.*, 2008). Sabe-se que possuem funções significativas no genoma, como, modulação da RNA polimerase II, na transcrição gênica, regulação de *splicing* e epigenética (MANAGADZE *et. al.*, 2011). Esse grupo de RNA compreende uma grande porção do transcriptoma, mais de 18.000 transcritos são conhecidos como RNAInc e esse número aumenta a cada ano (GUTTMAN *et. al.*, 2009).

Os lncRNAs podem ser poliadenilados ou não, localizam-se tanto no núcleo quanto no citoplasma e estão presentes em menor quantidade quando comparados com RNAm, que possui capacidade de codificar proteínas. Alguns se originam de *enhancers* (KIM *et al.*, 2010). Nos últimos anos, RNAInc têm sido vistos regulando uma grande variedade de funções como sinalização celular, inibição molecular (*decoys*), guias para ribonucleoproteínas para sítios específicos em regiões da cromatina e também participando como suportes na formação de complexos envolvendo DNA, RNA e proteínas, reforçando a importância potencial que estas moléculas exercem durante a regulação epigenética (WANG; CHANG, 2011; Figura 10).

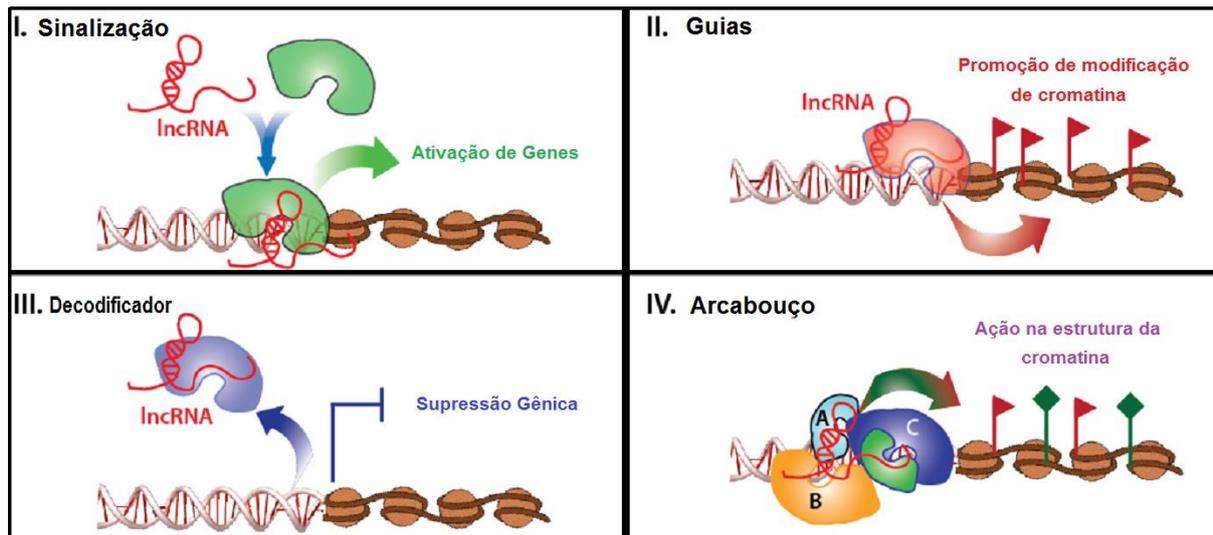


Figura 10. Possíveis funções exercidas pelos RNAInc. Os RNAInc podem atuar recrutando outras proteínas para (I) induzir sinalização, bem como atuar como (II) guias de RNAs, (III) decodificadores e (IV) formando arcabouços moleculares que, modificando a estrutura da cromatina, podem inibir ou ativar a transcrição de genes alvo. As bandeiras vermelhas e verdes representam sítios de alteração na cromatina.

Os RNAInc têm a capacidade de responder a diferentes estímulos provocando um controle substancial do mecanismo de transcrição que regula sua expressão (GUTTMAN *et al.*, 2009; GUTTMAN *et al.*, 2010). Além disso, eles têm uma função central tanto positiva quanto negativa na regulação da transcrição, em grande parte devido à transcrição abrangente de *enhancers* e promotores por RNAInc (GUENTHER *et al.*, 2007)

A expressão dos RNAInc é alta em diversas partes do sistema nervoso central (SNC). Mercer e colaboradores em 2008 observaram 1328 RNAInc, dos quais 849 foram vistos estando superexpressos no cérebro de ratos (MERCER *et al.*, 2008). Além disso, foi confirmado que os RNAInc são expressos em diversas partes do cérebro (QURESHI *et al.*, 2010). Recentemente, um grande número de estudos mostrou que eles possuem a função principal de modulação espacial-temporal de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do cérebro. Isso mostra a relevância dos RNAInc levando-se em consideração a importância no SNC.

2. JUSTIFICATIVA

Com o envelhecimento populacional haverá o aumento no número de casos de DP. Conforme o Relatório Mundial de Saúde e Envelhecimento, o número de pessoas com mais de 60 anos no país deverá crescer muito mais rápido do que a média internacional (OMS, 2015). Enquanto a quantidade de idosos vai duplicar no mundo até o ano de 2050, ela quase triplicará no Brasil. Amparado pela maior expectativa de vida, o número de brasileiros acima de 65 anos deve praticamente quadruplicar até 2060, confirmando a tendência de envelhecimento acelerado da população já apontada por demógrafos.

Além disso, dados do CENSO 2010 divulgados pelo IBGE, mostram que a população com essa faixa etária 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).

Apesar da grande quantidade de indivíduos afetados pela doença, o diagnóstico ainda não é bem estabelecido. A DP é uma doença com características clínicas e evolução natural bem conhecidas. Porém, os exames de neuroimagem são inespecíficos e não há marcador biológico laboratorial para o diagnóstico da doença (FERRAZ; BORGES, 2002). Atualmente, o diagnóstico da DP é apenas clínico, ou seja, o conhecimento das manifestações clínicas e de suas variações são os requisitos mais importantes para um diagnóstico acurado da doença e seu acompanhamento.

Em contrapartida, estima-se que até 80% das células dopaminérgica da região da substância negra já esteja perdida quando o primeiro sintoma motor aparece (CHUNG *et al.*, 2001). Além disso, um estudo realizado por Hughes e colaboradores no Reino Unido em 1992, mostrou que cerca de 25% dos pacientes com diagnóstico clínico em vida da DP tem outro diagnóstico no exame anatopatológico no *post-mortem* (HUGHES *et al.*, 1992).

Sobretudo, um editorial publicado em 2014 intitulado “*Prioritized Research Recommendations from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke Parkinson’s Disease 2014 Conference*”, recomendou o estudo em diversas áreas da DP, tais como: pesquisa clínica, (a) definindo as características e a história natural da doença, incluindo eventos de progressão, biomarcadores ou outros determinantes para os subtipos, objetivando informações suficientes para se estabelecer um racional de prevenção e descoberta de populações de alto risco, (b) caracterizando a progressão da doença e entendendo o mecanismo que está baseado a

heterogeneidade, envolvendo características clínicas e fatores biológicos, tais como genótipo e biomarcadores; pesquisa translacional, (c) desenvolvendo ferramentas que promovam a estratificação dos pacientes de maneira mais homogênea com ênfase nos tipos de progressão: lenta ou rápida, e; pesquisa básica, (d) desenvolvendo modelos de transmissão patológica da α -sinucleína e proteína tau, além de determinar os mecanismos de propagação, liberação e captação das formas mutantes destas proteínas, (e) elucidando a função normal e anormal da α -sinucleína e sua relação com os genes envolvidos na DP, como por exemplo, *ATP13A2*, *GBA*, *LRRK2*, *PINK1* e *PARK2* (SIEBER *et al.*, 2014).

Portanto esta tese de doutorado pretende caracterizar o conteúdo molecular e avaliar o efeito biológico de exossomos enriquecidos de plasma de pacientes com DP, classificados de acordo com o estadiamento H&Y em leve, moderado e avançado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Caracterizar o perfil molecular de exossomos de plasma de sangue periférico de pacientes com DP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Enriquecer e caracterizar os exossomos plasmáticos de pacientes com DP, de acordo com a escala de estadiamento H&Y, em leve, moderado e avançado;
- Quantificar a α -sinucleína em plasma sanguíneo e em exossomos de plasma sanguíneo de pacientes com DP;
- Estudar o papel dos exossomos de plasma sanguíneos de pacientes com DP na oligomerização e agregação da α -sinucleína, de acordo com os modelos BiFC e synT-Sph1, respectivamente;
- Desenvolver e otimizar o protocolo de extração líquido-líquido para substâncias molecularmente semelhantes às do plasma sanguíneo;
- Validar o método de análise metabolômica;
- Avaliar o perfil metabolômico do plasma sanguíneo e de exossomos de pacientes com DP, correlacionando com a evolução da doença;
- Identificar o perfil de expressão RNA longo não-codificante presente em exossomos de plasma sanguíneo de pacientes com DP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este projeto foi aprovado pelo Comitês de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEP 594/04). Todo material foi utilizado após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos pacientes com DP e doadores saudáveis.

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); além de distribuição inicialmente assimétrica da doença e boa resposta à levodopa. Foram excluídos do estudo os pacientes que solicitaram desligamento de sua participação.

Os dados sócio-demográficos foram coletados de prontuário médico com a ajuda de um formulário desenvolvido pela Dr^a Ana Lucia Zuma de Rosso (Anexo 1), da Divisão de Neurologia do Setor de Distúrbios do Movimento do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, que também nos auxiliou na definição do diagnóstico desses pacientes. A dose equivalente de levodopa foi calculada de acordo com TOMLINSON *et al.*, 2010.

Foi levado em consideração o tratamento antiparkinsoniano administrado no período da coleta do sangue, assim como a sintomatologia. Os pacientes foram classificados de acordo com as escalas H&Y em leve (estágios 1, 1,5 ou 2), moderado (estágios 2,5 ou 3) ou avançado (estágio 4 ou 5), e; SE levando-se em consideração também o período da coleta do sangue.

4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

Os pacientes com DP e doadores saudáveis tiveram seu sangue periférico coletado em tubo roxo EDTA. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm para separar a porção plasmática da porção celular. O plasma foi retirado e armazenado em eppendorfs de 1,5 mL com adição de Inibidor de protease (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) e armazenado a -80°C até sua utilização.

Para o enriquecimento dos exossomos do plasma foram utilizadas duas metodologias: ultracentrifugação e o reagente ExoQuick (System Biosciences, LLC,

Palo Alto, CA, EUA). No processo de ultracentrifugação, 500µL de plasma foram diluídos com igual quantidade de tampão fosfato salino (PBS). As amostras foram centrifugadas por 30 minutos, a 2000g e a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e centrifugado por 2 horas, a 110.000g e a 4°C em micro-ultracentrífuga Sorvall™ MTX 150 (ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Alemanha; THÉRY *et al.*, 2016). Aos *pellets* foram adicionados 200 µL de PBS.

Já o isolamento dos exossomos utilizando o kit ExoQuick deu-se segundo instruções do fabricante. Inicialmente, 500µL de plasma foram incubados por 30 minutos a 4°C com 120µL de *ExoQuick*. Após centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e, aos pellets foi adicionado 200 µL de PBS.

4.2.1 Western Blot

A concentração proteica foi determinada através do ensaio de *Bradford* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 96°C em tampão de amostra (125 mM de 1 M Tris HCl pH 6,8, 4% SDS 0,5% Bromofenol blue, 4 mM EDTA, 20% Glicerol, 10% β-Mercapto etanol). 50µg de proteína foram separadas em gel SDS-poliacrilamida 12%. As amostras foram transferidas do gel para membrana de PVDF utilizando o sistema de transferência iBlot Dry (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

A membrana foi bloqueada com BSA 5% e incubada com anti-Alix 1:2000 (Abcam, Boston, EUA), anti-TSG101 1:2000 (Abcam, Boston, EUA) e anti-calnexina 1:2000 (Abcam, Boston, EUA) *overnight* a 4°C. Após a lavagem (por 3 vezes, 15 minutos cada, em em tampão TBS-T (do inglês, “*Tris-buffered saline with 0,05% of Tween 20*”) a membrana foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-camundongo IgG ou anti-coelho IgG marcados com peroxidase de rábano (GE Healthcare, Bucks, UK) diluídos a 1:10.000. As proteínas foram detectadas através do sistema de detecção de quimioluminescência ECL (Millipore, Billerica, MA, USA) em câmara Fusion FX (Vilber Lourmat).

4.2.2 Microscopia eletrônica

Todo o procedimento de microscopia eletrônica foi realizada com o auxílio da *Facility for Transmission Electron Microscopy* do *Max Planck Institute for Biophysical Chemistry*. Alíquotas de 10µL das amostras contendo exossomos foram adsorvidos em grades de cobre revestidas com Formvar/carbono (Pella, Redding, CA) e coradas

negativamente com acetato de uranilo a 2% (p/v). As imagens foram obtidas em diversas ampliações (1000–90.000X) utilizando um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM120.

4.2.3 Análise do tráfego de nanopartículas

A análise do tráfego de nanopartículas foi realizada através de microscópio NanoSight LM10 (NanoSight Ltd, Salisbury, GB). As amostras foram diluídas em 1:30.000. Foram gravados 5 vídeos de 30 segundos para cada amostra. O tamanho e a concentração dos exossomos foi determinado pela análise dos vídeos gravados através de *software* NTA (versão 2.3). O desfoque e os parâmetros mínimos esperados de tamanho de partícula usados para as análises foram ajustados automaticamente.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE A-SINUCLEÍNA

A quantificação dos níveis de α -sinucleína foi realizada em plasma e em exossomos de plasma dos pacientes com DP e doadores saudáveis. As amostras de exossomos foram sonicadas com homogeneizador ultrassônico em ponteira, 2 vezes por 15 segundos a 30% com intervalos de 2 minutos entre cada etapa.

A proteína foi quantificada através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Placa *multi-array standart plates* de 96 poços (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EUA) foi revestida com 100 μ L de anticorpo anti α -sinucleína como anticorpo de captura (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) a 1 μ g/mL diluído 1:500 em PBS e incubado *overnight* a 4°C, sem agitação.

Todas as etapas de lavagem foram realizadas 3 vezes com 200 μ L de PBS-T (PBS suplementado com 0,05% Tween-20). Após a lavagem foi realizada a captura e o bloqueio simultaneamente. Padrões e amostras foram diluídos 1:4 em 1% BSA/PBS-T e incubados por 1 hora a 700 rpm a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e 100 μ L de anticorpo policlonal de coelho FL-140 (α , β , γ -sinucleína) foi adicionado a 200 μ g/mL em 1 μ g/mL de BSA/PBS-T.

Após a detecção primária a placa foi lavada 3 vezes e foram adicionado 100 μ L do anticorpo secundário α -sinucleína de cabra-anti-coelho 1:5000 diluído em 1% BSA/PBS-T e incubados por 1 hora a 700 rpm a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada 3 vezes e 100 μ L de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, do inglês, "3,3',5,5'-tetramethylbenzidine") foi adicionado sendo incubado por 30

minutos protegido da luz. A reação foi parada com 100µL de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplaca Tecan Infinite 200 PRO a 450nm.

4.4 PLASMÍDEOS

Para a preparação, 4 cepas da bactéria DH5α contendo os plasmídeos com genes das proteínas VN-*α-sinucleína*, *α-sinucleína-VC*, SynT e Sph1, respectivamente, cresceram em meio LB, com 1% de ampicilina, a 37 °C, em agitação, *overnight*. Os desenhos dos plasmídeos se encontram em anexo (Anexos 2-5).

Após esse período, foi realizada um ensaio de Midiprep para purificação do DNA plasmidial, utilizando o kit *NucleoBond® Xtra Midi/Maxi*, de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, o material plasmidial foi quantificado em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Bremen Alemanha) Foi preparada uma solução estoque de 1µg/µL que foi armazenada a -20 °C até o uso.

4.5 CULTURA DE CÉLULAS E TRANSFECCÕES

Células de neuroglioma humano (H4) foram mantidas em Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* (Life Technologies-Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e células de rim embrionário humano 293 (HEK) cresceram em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Ambos os meio de cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB; PAA, Cölbe, Germany) e 1% de penicillina-streptomomicina (PAN, Aiden-bach, Alemanha). As células cresceram a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Para transfecção, 100.000 células HEK foram plaqueadas, por poço, em placas de 12 poços (Costar, Corning, Nova York, EUA) no dia anterior. 30 minutos antes da transfecção as células foram incubadas com Opti-MEM e subsequentemente transfectadas com quantidade equimolar dos plasmídeos VN-*α-sinucleína* e *α-sinucleína-VC*, utilizando Metafectina (Biotex, Munique, Alemanha) na razão de 1:3 de acordo com as instruções do fabricante.

Já as células H4 também foram plaqueadas em placas de 12 poços no dia anterior. Quantidades iguais de plasmídeos codificando SynT e Sph1 foram transfectados utilizando CaCl₂ e tampão fosfato (2x BES: 50mM BES, 280mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄X2H₂O, pH 7,106). 16 horas após a transfecção para ambas as linhagens celulares o meio foi substituído e foram adicionados 1µL ou 10 µL do preparado de exossomos.

4.6 IMUNOCITOQUÍMICA

Para avaliar a formação de agregados nas células, 24 horas após a adição do material dos exossomos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 10 minutos a temperatura ambiente. Células H4 foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0,5% por 20 minutos a temperatura ambiente. Após o bloqueio com BSA 5% por 1 hora, as células foram incubadas com o anticorpo primário murino anti- α -sinucleína (1:1000, BD Transduction Laboratory, New Jersey, USA) *overnight* a 4°C e com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 asno anti-murino IgG (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram coradas com Hoechst 33258 (Life Technologies- Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; 1:5000 em DPBS 1x - tampão fosfato salino de Dulbecco) por 5 minutos e mantidas em PBS para a microscopia de fluorescência.

4.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Células HEK expressando o ensaio α -sinucleína Venus-BiFC foram visualizadas através do microscópio Olympus IX81-ZDC, com a objetiva de 20x. 100 imagens foram randomicamente tiradas. A intensidade total foi medida utilizando o *software Olympus Scan^R Image Analysis*.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DAS INCLUSÕES DE A-SINUCLEÍNA

Células co-transfectadas com SynT e Sph1 foram detectadas através do microscópio Leica DMI 6000B (Leica, Wetzlar), com objetiva de 40x. Registros foram anotados de acordo com o padrão de inclusão de α -sinucleína e classificadas em 4 grupos: células sem inclusões; menos que 5 inclusões (< 5 inclusões), entre 5 e 9 inclusões (≥ 5 -9 inclusões) e mais que 10 inclusões (≥ 10 inlusões), a partir de 50 imagens tiradas. Os resultados foram expressos em porcentagem do número total de células transfectadas.

4.9 METABOLÔMICA

A análise metabolômica deu-se de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 11).

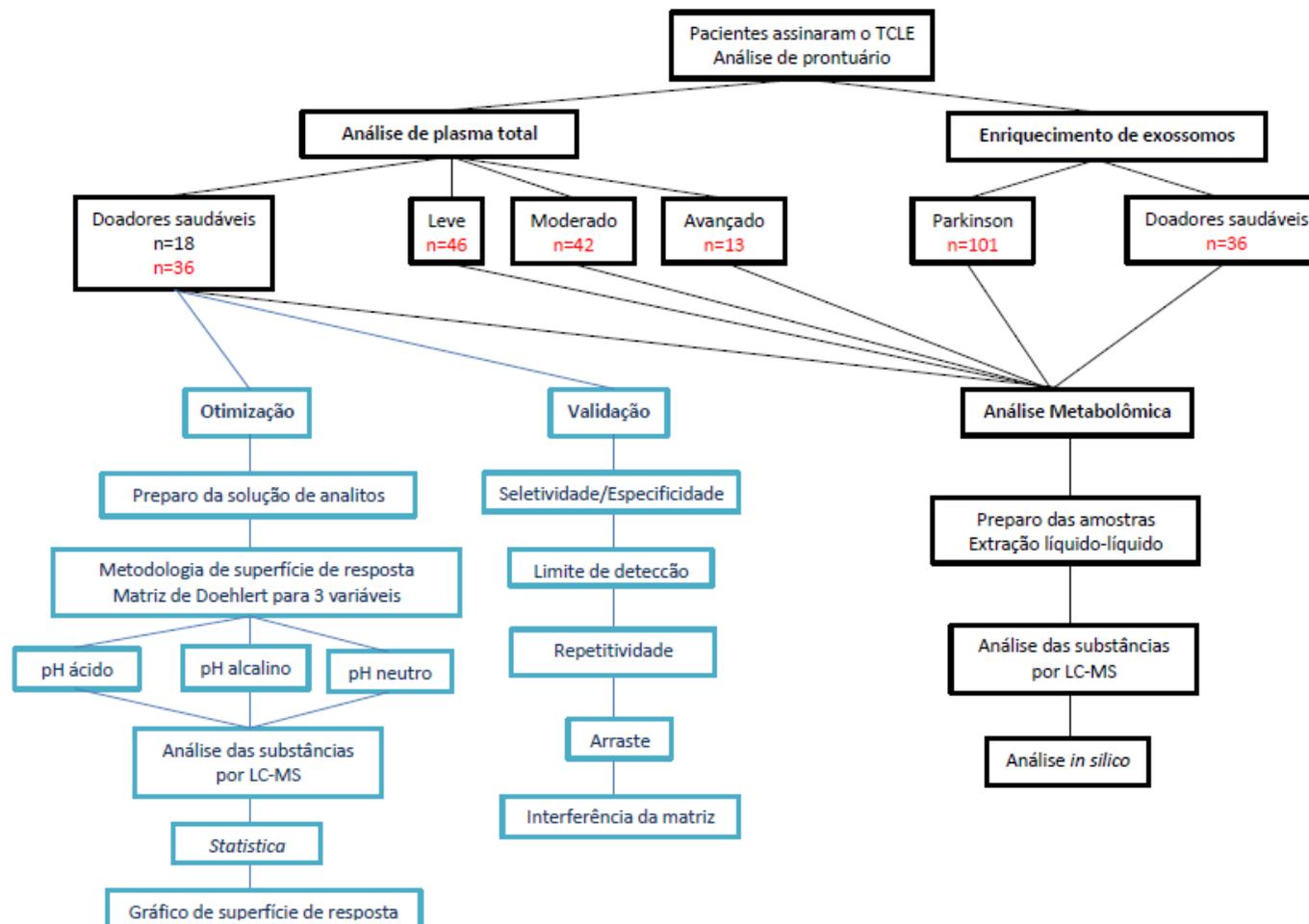


Figura 11 Fluxograma esquemático da análise metabolômica. As amostras de plasma de doadores saudáveis (n=18) foram utilizadas para os ensaios de otimização e validação. A análise metabolômica *per se* foi realizada para as amostras de plasma de doadores saudáveis (n=36) e pacientes com DP, em *pool* (n=101), ou de acordo com o grau de estadiamento de H&Y – leve, n=46; moderado, n=42, e; avançado, n=13. Além disso, a análise também foi realizada com as amostras provenientes de exossomos de plasma dos doadores saudáveis (n=36) e dos pacientes com DP (n=101), em *pool*.

Previamente à análise metabólica, o protocolo de preparação das amostras por extração líquido-líquido foi desenvolvido e otimizado. Além disso, foi realizada a validação da análise qualitativa por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, para o plasma sanguíneo, matriz utilizada neste estudo.

4.9.1 Otimização

4.9.1.1 preparo da solução de analitos

Inicialmente, foi preparado uma solução padrão de analitos para o processo de otimização. Selecionamos algumas candidatas e após a análise de sua estrutura química 12 foram incluídas em nossa solução.

É importante salientar que o conhecimento da estrutura química dessas substâncias foi fundamental nessa etapa do estudo. As substâncias deveriam ser exógenas e com estrutura química semelhante àquelas encontradas no plasma sanguíneo, como, por exemplo, testosterona, adrenalina, noradrenalina, dopamina e cortisol. Dessa forma, poderíamos garantir que se o nosso método estivesse recuperando todas essas substâncias de maneira satisfatória, os resultados dos nossos ensaios seriam também satisfatórios.

4.9.1.2 ensaio de otimização

A otimização foi realizada pela metodologia de superfície de resposta, utilizando a matriz de Doehlert para 3 variáveis (Figura 12). Foi realizada uma otimização multivariada uma vez que esta é considerada mais eficiente que processos univariáveis, já que a influência de diversos parâmetros de um procedimento experimental pode ser avaliada simultaneamente com um pequeno número de experimentos.

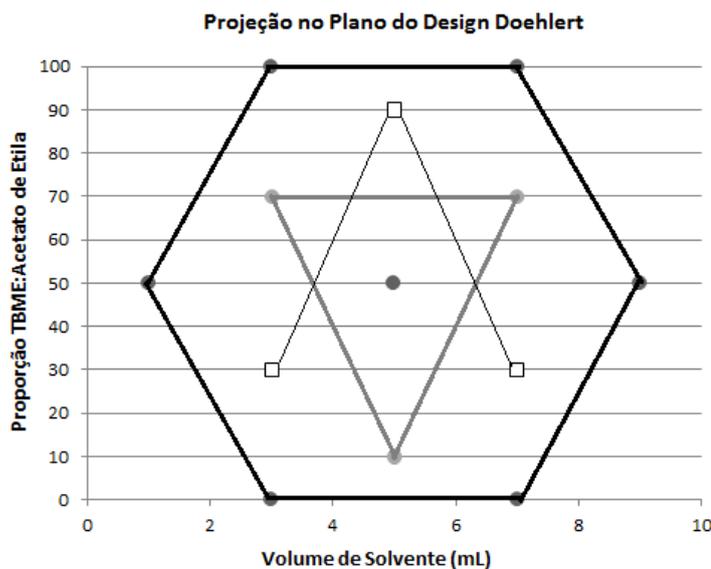


Figura 12 Projecção do design Doehlert no plano. O círculo preto, cinza e o quadrado branco indicam tempo de orbital na posição 40 de 20, 10 e 30 minutos, respectivamente.

O protocolo se baseia em adicionar à amostra 750µL de tampão fosfato pH 7,0 seguida da adição de aproximadamente 1g de NaCl PA. O conteúdo foi homogeneizado até saturar totalmente a solução com auxílio de um vórtex. Aos tubos relativos à extração em pH alcalino (pH=8,0) foi adicionado aproximadamente 0,5g de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$ 1:3 e em seguida agitado em vórtex por 10 segundos. Já para extração em pH ácido (pH=4,0), foi adicionado em cada tubo 600 µL de tampão formiato de amônio 1M, pH 4,0 e ajustando-se o pH para 4,0, se necessário, com ácido acético glacial. A extração em pH neutro (pH=7,0) seguiu sem nenhuma adição ao processo. Dessa etapa em diante, o protocolo segue semelhante para a extração nos diferentes pH's.

Foi adicionado solvente orgânico (TBME e acetato de etila) em diferentes proporções e volumes, como está ilustrado na tabela 5. Posteriormente, os tubos foram colocados em agitador em tempos também variados (Tabela 5). Os tubos foram, então, centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e em seguida a fase orgânica foi transferida para tubos secos. Foi realizada a reconcentração das substâncias evaporando a fase orgânica sob fluxo de N_2 a 40° C. Ao final, o resíduo foi dissolvido com 100µL de solução da mistura MeOH:H₂O 3:7, 0,1% ac. fórmico, 5mM NH_4COOH .

Para as análises realizadas em cada um dos 3 pHs os testes foram realizados em 3 condições: tubos positivos, onde a solução padrão foi adicionada inicialmente no processo; tubos negativos, sem solução padrão; e, tubos para análise de recuperação, onde a solução padrão foi adicionada após a etapa de reconcentração.

Assim, foram preparados 39 tubos para análise em cada um dos pH's estudados, com 500 µg de proteína procedente de plasma de sangue periféricos de doadores saudáveis, quantificados através de fluorímetro *Qubit 3.0* (Thermo Fisher Scientific, Bremen Alemanha) conforme as instruções do fabricante e avolumado para 2 mL de PBS.

Tabela 5 Planejamento experimental Doehlert para três variáveis.

Experimento	Volume de solvente (mL)	% TBME (em Acet. Et.)	Tempo de orbital (min.)
1	3	100	20
2	7	100	20
3	5	90	30
4	3	70	10
5	7	70	10
6	1	50	20
7	5	50	20
8	9	50	20
9	3	30	30
10	7	30	30
11	5	10	10
12	3	0	20
13	7	0	20

TBME: T-butil metil éter, do inglês, "*methyl t-butyl ether*"; Acet. Et.: acetato de etila

Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução para obtenção das respostas dos experimentos em termos de área do pico cromatográfico na região de retenção do analito e a massa exata do mesmo.

O tratamento dos dados foi realizado no software *Statistica* utilizando todas as áreas obtidas em cada condição de extração. Nessa ferramenta foram setados os valores das variáveis para buscar o maior valor de recuperação dos padrões internos, gerando-se as condições críticas para cada substância. A análise da recuperação foi realizada pela comparação das resposta das amostras submetidas ao processo de extração (tubos positivos), com aquelas nas quais o analito foi adicionado após as etapas de extração (tubos de recuperação).

Avaliou-se a melhor equação para descrever a resposta por meio da identificação e eliminação dos parâmetros menos significativos, observados através dos gráficos de Pareto. Permitindo, assim, um melhor valor de $R^2_{ajustado}$ indicando uma boa correlação entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados.

A equação obtida para cada substância em cada pH foi derivada da equação geral apresentada abaixo:

$$(Y) = b_0 + b_1(X_1) + b_2(X_2) + b_3(X_3) + b_4(X_1)(X_1) \\ + b_5(X_2)(X_2) + b_6(X_3)(X_3) \\ + b_7(X_1)(X_2) + b_8(X_1)(X_3) + b_9(X_2)(X_3)$$

Onde: b_0 é o termo constante, b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes dos termos lineares; b_4 , b_5 e b_6 são os coeficientes dos termos quadráticos; e, b_7 , b_8 e b_9 são os coeficientes de interação entre os três fatores.

Toda a estatística foi realizada com base nos resíduos, que é a diferença entre o valor observado e o valor predito pelo modelo. Foram salvos os valores dos resíduos para cada analito. Foram gerados os gráficos de superfície de resposta que indicaram as melhores condições de extração para cada uma das substâncias em cada um dos pHs.

4.9.2 Validação qualitativa

A validação de procedimentos de análise qualitativa consistiu em uma série de experimento no qual foram avaliados os seguinte parâmetros: seletividade/especificidade; limite de detecção; repetitividade; rendimento da extração; arraste; e, interferência da matriz.

Para o estudo da seletividade/especificidade do método foram analisadas dez amostras de plasma de diferentes origens. Foi verificada a ausência de substâncias interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno.

Para o estudo do limite de detecção do método foram analisadas dez plasmas de origens diferentes com 10% da concentração dos analitos; e, dez plasmas com 50% da concentração dos analitos. A avaliação do limite de detecção foi realizada pela análise da presença dos picos.

Para o estudo de repetitividade foram analisadas sete replicatas fortificadas com os analitos, com o objetivo de determinar a dispersão entre as replicatas. O resultado é apresentado como desvio padrão e é expresso através do desvio padrão relativo percentual (RSD%).

Para estudo de rendimento de extração foram analisados sete replicatas fortificadas com os analitos e outras sete replicatas fortificadas com os analitos adicionados após a reconcentração. Para o cálculo, foram comparadas as respostas

das alíquotas submetidas ao processo de extração com aquelas nas quais a solução padrão foi adicionada após a etapa de extração.

Para o estudo do arraste a um plasma adicionado com o dobro de concentração dos analitos foi injetado seguido de um plasma sem analito. A avaliação foi realizada pela análise de significativas alterações nas áreas ou alturas do pico, dentro do tempo de retenção determinado dos analitos.

Para a avaliação da interferência da matriz foram utilizados dez plasmas diferentes fortificados com os analitos na concentração definida. A análise se da pela verificação da presença dos analitos em cada uma das dez amostras nos tempos de retenção esperados. O pico cromatográfico deverá ser observado em todas as amostras utilizadas na avaliação.

4.9.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi realizada para as amostras de sangue periférico de doadores saudáveis e pacientes com DP em *pool*, além de separadas em grupo de acordo com a escala de estadiamento H&Y. Também foi realizada para as amostras provenientes do conteúdo enriquecido dos exossomos dos doadores saudáveis e pacientes com DP.

As preparação das amostras foi realizada através de uma extração líquido-líquido. Partindo-se de 500µg de proteína procedente de plasma de sangue periféricos de doadores saudáveis, pacientes e de 90µg das amostras do conteúdo dos exossomos, 20 µL da solução padrão e avolumado para 2 mL de PBS.

Às amostras foi adicionado 750µL de tampão fosfato pH 7,0, seguida da adição de aproximadamente 1g de NaCl PA. O conteúdo foi homogeneizado até saturar totalmente a solução com auxílio de um vórtex. Aos tubos relativos à extração em pH alcalino foi adicionado aproximadamente 0,5g de tampão Na₂CO₃:NaHCO₃ 1:3 e em seguida agitado em vórtex por 10 segundos. Já para extração em pH ácido, foi adicionado em cada tubo 600 µL de tampão formiato de amônio 1M, pH 4,0 e ajustou-se o pH para 4,0,s e necessário, com ácido acético glacial. A extração em pH neutro seguiu sem nenhuma adição ao processo.

Foi adicionado 9 mL de acetato de etila em todos os tubos. Posteriormente, as amostras foram colocados em agitador rotatório na posição 40 por 30 minutos no caso da extração alcalina e neutra e, por 10 minutos para a extração em pH ácido. Os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 10 minutos e em seguida a fase orgânica foi

transferida para tubos secos. Foi realizada a reconcentração das substâncias evaporando a fase orgânica sob fluxo de N₂ a 40° C. Ao final, o resíduo foi dissolvido com 100µL de solução da mistura MeOH:H₂O 3:7, 0,1% ac. fórmico, 5mM NH₄COOH.

4.9.4 Análise das substâncias

O perfil metabólico foi avaliado por cromatografia líquida (AccelaLC, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um espectômetro de massas de alta resolução (LC-HRMS; Q-Exactive, Orbitrap, Thermo Fisher Scientific, Bremen Alemanha). A separação por cromatografia foi realizada em coluna de fase reversa (Agilent C18, 1.8 µm, 50 mm X 2.1 mm) at 40 °C. A fase móvel utilizada foi (A) H₂O com 5,0 mM de formiato de amônio e (B) MeOH, ambos com 0,1% de ácido fórmico. A taxa de fluxo foi configurada para 400 µL/min.

O perfil de eluição foi: 0-0,3 minutos, 5% B; 0,3-0,5 minutos, 5% a 10% B; 0,5-1,0 minuto, 10% a 25% B; 1,0-6,0 minutos, 25% a 90% B; 6,0-8,0 minutos, 90% a 100% B; 8,0-9,0 minutos, 100% B (lavagem da coluna); 9,0-9,1 minutos, 100% a 5% B, 9,1-11,0, 5% B (equilíbrio da coluna para as condições iniciais). A corrida teve duração total de 11 minutos e o volume de injeção foi de 8.0 µL. Os metabólitos foram detectados pela massa através do *TraceFinder* 3.0 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) e estatisticamente avaliados pelo software SIEVE (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). A análise das substâncias separadas pela cromatografia foi feita por espectrometria de massas, com um analisador de alta resolução do tipo ORBITRAP. A análise foi realizada em FULL-MS, que consiste numa varredura de todos os íons com razão massa/carga entre 100 e 800, no modo (+) de ionização utilizando *electrospray* como fonte. A voltagem do *spray* foi configurada para 3,9 e 2,9 kV. A temperatura do capilar foi de 380°C e a radio frequência da *S-lens* foi de 80 (unidades arbitrárias). O revestimento de nitrogênio e o fluxo do gás auxiliar foi de 60 e 20 (unidades arbitrárias), respectivamente. Nesse experimento, todos os íons com essa faixa de razão m/z foram selecionados no quadrupolo e analisados, gerando um espectro de massas.

4.9.5 Análise in silico da metabolômica

Para verificar os processos biológicos relacionados aos metabólitos únicos e diferencialmente expressos encontrados na análise metabolômica, foi realizada uma análise *in silico*. Foi desenvolvido um *in-house python script* chamado de

"metabomops" para converter a lista de m/z adquirida em uma lista com o código do metabólito para a Human Metabolome Database (HMDB; Wishart *et al.*, 2013). Este programa agrupa todo o conjunto de metabólitos do HMDB e verifica pico em um servidor que fornece a lista de metabólitos com a massa dentro de um erro suficientemente pequeno. A ionização e os parâmetros de erro podem ser definidos pelo usuário (padrão -1 e 0,01, respectivamente). Esse *script* é de fonte aberta e pode ser acessado em <https://github.com/igorrcosta/metabomops/>. Assim, após esta etapa, os HMDBs relativos aos íons foram investigados no MetaboAnalyst 3.0 (Xia e Wishart, 2016) com o auxílio do banco de dados *KEGG Pathways*.

4.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS RNALNC

Para a realização do enriquecimento dos exossomos, sua lise, purificação e eluição de RNA, foi utilizado o kit *SeraMir™ Exosome RNA Amplification (System Bioscience)*. Inicialmente, 500 µL de plasma de pacientes com DP e 500 µL de plasma de doadores saudáveis foram incubados por 30 minutos a 4°C com 120 µL de *ExoQuick* cada. Após centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e, aos pellets, foram adicionados 350 µL de tampão de lise.

Após 5 minutos e homogeneização das amostras, 200 µL de Etanol 100% foram adicionados a cada uma das mesmas. Em paralelo, as colunas de centrifugação foram acopladas aos tubos coletores, e as amostras foram transferidas para as colunas de spin. Uma nova centrifugação, a 13.000 por 1 minuto, foi realizada em cada amostra, e o líquido presente no tubo coletor foi descartado. Às colunas de centrifugação, foram adicionados 400 µL de tampão de lavagem, e novamente as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 1 minuto, este procedimento foi repetido duas vezes e os RNAs presentes nas colunas foram eluídos com 30µL de tampão de eluição e quantificados utilizando *Qubit* (Thermo Fisher Scientific, Bremen Alemanha).

4.10.1 Síntese do cDNA

Para a realização da síntese do cDNA, o kit *Human and Mouse LncProfilers™ qPCR Array Kits (System Bioscience)* foi utilizado. Alguns RNALnc não possuem caudas poliadeniladas dessa forma, para aumentar a performance do ensaio de qPCR antes da conversão em cDNA, o kit de síntese de cDNA inclui reagentes com o objetivo de poliadenilar todos os RNALnc antes da conversão em cDNA. Para a reação

de poliadenilação dos RNAs, à 5 µL do RNA total (1 a 2 µg) purificado, foram adicionados 2µL de tampão 5X PolyA, 1 µL de MnCl₂ 25Mm, 1,5µL de ATP 5Mm e 0,5 µL de *PolyA Polymerase*, totalizando 10 µL de solução, que foi incubada por 30 minutos a 37°C, utilizando o termociclador *ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies)*.

Posteriormente, foram adicionados 0,5 µL de *Adaptador Oligo dT* à solução de poliadenilação e a solução final foi aquecida por 5 minutos a 60°C no termociclador *ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies)*. Ao término da reação, a solução permaneceu em temperatura ambiente por 2 minutos. Para a síntese do cDNA , foram adicionados à reação anterior 4µL de tampão RT 5X, 2 µL dNTPd mix, 1,5 µL de DTT 0,1M, 1,5 µL de *Random Primer mix* e 1 µL de *Transcriptase Reversa*. A síntese ocorreu a 42°C durante 60 minutos com inativação da enzima a 95°C por 10 minutos, utilizando o termociclador *ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies; Figura 15)*.

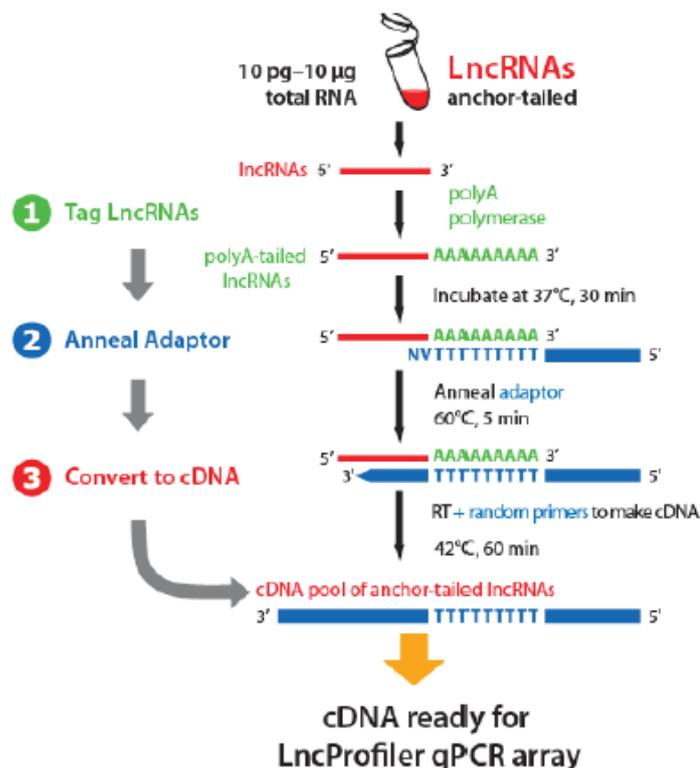


Figura 13 Esquema da síntese de cDNA de acordo com o kit *Human and Mouse LncProfilers™ qPCR Array Kits (System Bioscience)*.

4.10.2 Ensaio de RT-qPCR

Para determinar o perfil de expressão de lncRNAs o kit *LncProfilers™ qPCR Array Kits (System Bioscience)* foi utilizado de acordo com instruções do fabricante.

Os ensaios foram realizadas em placas de 96 poços contendo 1,750 μL de Buffer 2X SYBER Green qPCR Mastermix, 20 μL de lncRNA cDNA de cada amostra e 1,730 μL de água RNase free, totalizando 3.500 μL de mastermix. A cada poço da placa de qPCR, foram adicionados 28 μL do mix. A placa do qPCR array contém, liofilizado, um par de primers de lncRNAs em cada poço, totalizando 90 pares, além de cinco pares de RNAs endógenos como normalizadores (Figura 16).

Human LncProfiler qPCR Array

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	21A	75K	75L	Air	AK023948	Alpha 280	Alpha 250	ANRIL	anti-NOS2A	antiPeg11	BACE1AS	BC200
B	CAR Intergenic	DHFR upstream	Dio3os	DISC2	DLG2AS	E2F4 antisense	EgoA	EGO B	Emx2os	Evf1 and EVF2	GASS	Gomafu
C	H19	H19 antisense	H19 upstream	HAR1A	HAR1B	HOTAIR	HOTAIRM1	HOTTIP	Hoxa11as	HOXA3as	HOXA6as	HULC
D	IGF2AS	IPW	Jpx	Kcnq1ot1	KRASP1	L1PA16	p21	RoR	SFMBT2	VLDLR	LOC 285194	LUST
E	Malat1	mascrNA	MEG3	MEG9	MER11C	ncR-uPAR	NDM29	NEAT1	Nespas	NRON	NTT	p53 mRNA
F	PCGEM1	PR antisense	PRINS	PSF Inhibiting	PTENP1	RNCR3	SAF	SCA8	snaR	SNHG1	SNHG3	SNHG4
G	SNHG5	SNHG6	Sox2ot	SRA	ST7OT	TEA ncRNAs	Tmevpg1	TncRNA	Tsix	TUG1	UCA1	UM9-5
H	WT1-AS	Xist	Y RNA-1	Zeb2NAT	Zfas1	Zfx2as	18S rRNA	RNU43	GAPDH	LAMIN A/C	U6	No assay control

Figura 14 Desenho da placa *LncProliflers qPCR array Kit (System Bioscience)* utilizada no ensaio de RT-qPCR.

A placa de primers estoques foi ressuspensa com 44 μL de água livre de RNase por poço. Após a ressuspensão, 2 μL de cada poço com cada par de primers foram adicionado no poço correspondente na placa contendo o mix descrito anteriormente (Figura 17).

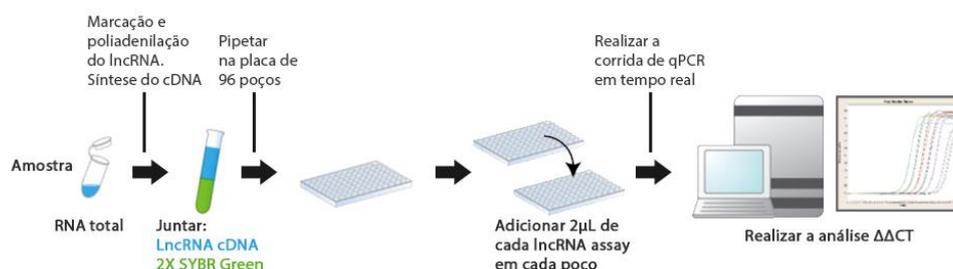


Figura 15 Montagem de placa para realização do RT-qPCR.

O ensaio de qPCR foi realizado no *QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems by Life Technologies)*, seguindo o protocolo padrão sugerido pelo fabricante do kit, composto de quatro etapas: um ciclo de 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C, 40

ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto final, a 60°C, para leitura dos dados (Figura 18).

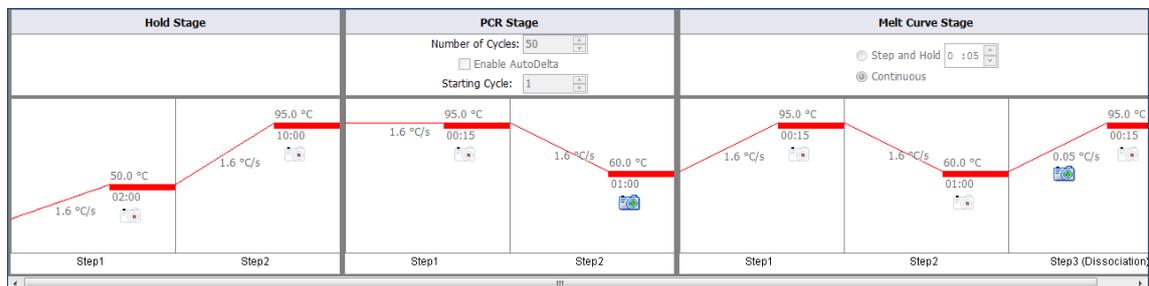


Figura 16 Condições de PCR.

4.10.3 Análise in silico dos RNAInc

Os RNAInc expressos foram analisados segundo o banco de dados *Incrnadb-Long Noncoding RNA Database v2.0* (AMARAL *et al.*, 2011; QUEK *et al.*, 2015), sugerido pelo próprio kit *LncProfiler qPCR Arrays* (*System Biosciences*), onde foram retiradas informações como *alias*, localização subcelular e cromossômica, função, expressão e ligante molecular. Também foi utilizada a base de dados *Incrnadisease – The LncRNA and Disease Database* (CHEN *et al.*, 2013), onde foram observadas as doenças associadas e disfunção associada e a *IncRInter – Database of long non-coding RNA interaction*, de onde foram observadas as interações dos RNAInc com outras moléculas (CHUN-JIE *et al.*, 2017).

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando os softwares *GraphPad Prism 6* (San Diego California, USA), *SPSS statistics software* (SPSSStatistics 17.0,) and *Microsoft Excel* e foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram calculadas utilizando *one-way ANOVA* com *post-hoc Tukey's test*. Significância foi avaliada, onde * corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$ e *** corresponde a $p < 0.001$. Análises de correlação foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson. Curva das características operacionais do receptor (ROC) foram utilizadas para avaliar as relações de sensibilidade e especificidade para determinar a performance diagnóstica. Os gráficos de Venn foram contruídos de acordo com OLIVEROS, 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO EFEITO BIOLÓGICO DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLAMAS DE PACIENTES COM DP

5.1.1 Caracterização clínica da coorte

Os estudo incluiu 64 pacientes com DP classificados de acordo com a escala de estadiamento H&Y em leve (n=30), moderado (n=25) e avançado (n=9) e 18 doadores saudáveis, que apresentavam idade semelhante e coabitavam com os pacientes. Nenhuma diferença estatística foi observada envolvendo idade do exame, idade de início, escolaridade, consumo de café, tabaco, álcool, água de poço ou histórico familiar, como pode ser observado na tabela 6. Como esperado, devido aos critérios de inclusão e estratificação da coorte, a escala H&Y, escala SE e o mini exame do estado mental (MEEM) foram estatisticamente diferentes entre os grupos de estadiamento da doença e os controles ($p < 0,0001$). Também houve diferença estatística entre os grupos no tempo de doença ($p < 0,0001$) e gênero ($p=0,0309$).

Tabela 6 Caracterização clínica da coorte. N.A.: Não avaliado

	Controle (n=18)	DP (n=64)	DP (n=64)			p Valor
			Leve (n=30)	Moderado (n=25)	Avançado (n=9)	
Idade do exame (anos)	61,61±9,13	66,27±9,75	64,63±10,16	67,16±8,23	69,22±12,16	0,2407
Idade de início (anos)	N.A.	54,94±11,42	57,03±10,56	55,52±11,83	46,34±10,12	0,0996
Tempo de doença (anos)	N.A.	11,33±6,95	7,60±4,49	11,64±5,49	22,89±3,78	< 0,0001
Gênero (% maculino)	16,66	56,25	56,67	60,00	44,44	0,0309
Escolaridade (anos)	N.A.	8,67±4,03	9,17±4,21	8,32±3,85	8,00±4,18	0,8291
Consumo de cafeína (% não)	N.A.	17,19	20,00	12,00	22,22	0,8542
Tabagista (% não)	N.A.	59,38	56,67	60,00	66,67	0,9626
Etilista (% não)	N.A.	43,75	46,67	40,00	44,44	0,9706
Consumo de água de poço (% não)	N.A.	35,94	36,67	36,00	33,33	0,9897
Histórico familiar (% sim)	N.A.	45,31	60,00	32,00	33,33	0,1808
Escala Hoehn & Yahr modificada	N.A.	2,63±0,86	1,93±0,17	2,84±0,27	4,33±0,5	< 0,0001
Escala Schwab & England	N.A.	72,89±22,85	82,67±15,07	74,6±14,13	35,56±27,43	< 0,0001
Mini exame do estado mental	N.A.	25,07±5,80	27,43±2,46	24,79±5,10	20±8,93	0,0125
Dose equivalente de levodopa (mg)	N.A.	198,14±110,29	157,03±81,90	224,38±119,96	303,88±146,90	0,1644

5.1.2 Caracterização dos exossomos de plasma sanguíneo

Os exossomos de sangue periférico de pacientes com DP e controles saudáveis foram enriquecidos utilizando o reagente *Exoquick* e ultracentrifugação. Os

pellets e sobrenadantes foram confirmados para a presença dos exossomos pelo ensaio de western blot, sendo imunoreativas para os marcadores Alix e TSG101, para as duas metodologias (Figura 17A). Além disso, a proteína de retículo endoplasmático calnexina foi encontrada apenas nos lisados celulares, indicando ausência de contaminação. Devido aos resultados semelhantes nas duas abordagens, o reagente *Exoquick* foi escolhido para as demais análises devido a sua rapidez e facilidade de manuseio. As análises seguintes foram realizadas para os grupos de estadiamento de DP (leve, moderado e avançado) e doadores saudáveis. O ensaio de microscopia eletrônica (Figura 17B) mostrou que o *pellet* continha vesículas de 40 a 120nm de diâmetro e típica morfologia dos exossomos. Os exossomos também foram quantificados pela análise do tráfego de nanopartículas (Figura 17C), mostrando que o tamanho das vesículas encontradas variou de 15 a 525 nm de diâmetro, mas sendo predominantemente em torno de 105nm, para todas as análises, característico das vesículas.

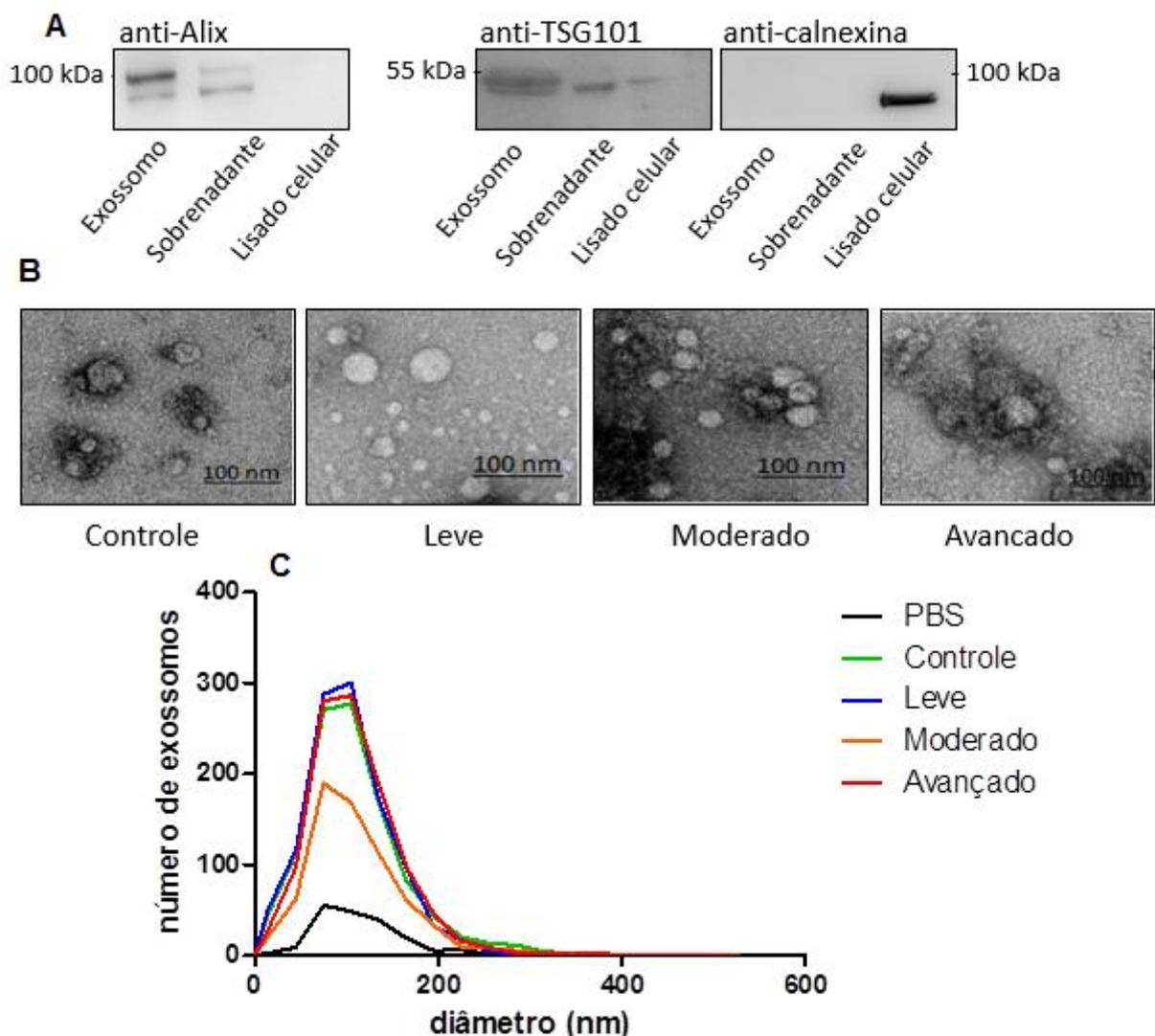


Figura 17 Caracterização dos exossomos de plasma sanguíneo. (A) Western blot. Os exossomos do pellet e sobrenadante do preparado de exossomos foram reativos para as proteínas exossomais Alix e TSG101, além de não serem reativos para calnexina, proteína de retículo endoplasmático, utilizada como controle negativo (confirmado em lisado celular). (B) Microscopia eletrônica para os grupos de DP leve, moderado, avançado e controle. Escala= 100nm. (C) Análise do tráfego de nanopartículas. Preto= PBS, verde= controle, azul= leve, laranja= moderado, vermelho= avançado.

5.1.3 Quantificação da α -sinucleína plasmática e exossomal de pacientes com Doença de Parkinson e doadores saudáveis

Foram quantificados os níveis de α -sinucleína em plasma e exossomos dos grupos de estadiamento da doença e doadores saudáveis, em *pool*. Foram encontrados valores maiores nos grupos da doença em relação ao controle quando dentro dos exossomos (Figura 18B, controle=17,26±1,52 leve=49,92±7,08, moderado=58,02±9,98, avançado=46,37±4,83, p=0,0131). Além disso, a quantidade total de α -sinucleína foi estatisticamente igual para os grupos quando livre no plasma (Figura 18A, controle=40,93±9,82ng/ml, leve=37,69±6,36, moderado=32,89±5,77 avançado=32,23±0,84), mostrando a importância do estudo dos exossomos na DP.

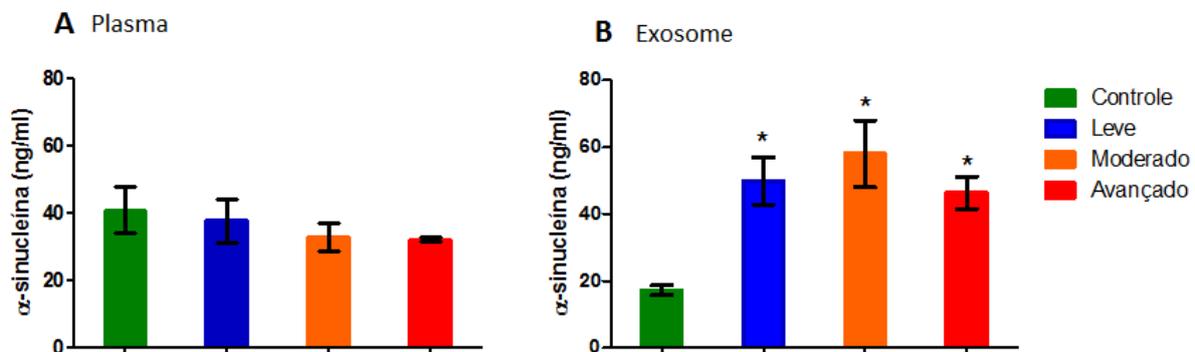


Figura 18 Quantificação da α -sinucleína plasmática e exossomal de sangue de pacientes com DP em *pool*. (A) A concentração de α -sinucleína no plasma de pacientes com DP e doadores saudáveis (controle) foi estatisticamente igual. (B) A concentração de α -sinucleína nos exossomos de pacientes com DP e doadores saudáveis (controle) foi estatisticamente maior para o grupo doente. Média e desvio padrão provenientes de análises em triplicata de uma mesma amostra (em *pool*). *p<0,05, *one-way ANOVA* com *post-hoc Tukey's test*. Controle= barra verde, grupo leve= barra azul, grupo moderado= barra laranja, avançado= barra vermelha.

Além disso, foi realizada a quantificação da α -sinucleína nas amostras dos doadores saudáveis e pacientes com DP individualmente. A realização dessa análise só foi possível devido à disponibilidade de plasma para todos os sujeitos do estudo. Disponibilidade essa que não foi observada nas amostras de exossomos, impossibilitando a realização da análise individual. Entretanto, não foi observada correlação entre a concentração de α -sinucleína plasmática e a severidade dos

sintomas motores classificados de acordo com a escala de estadiamento H&Y (Figura 19A, Coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,07837$, $p = 0,582$), a escala de atividades diárias SE (Figura 19B, Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,5784$, $p = 0,07077$), nem com a perda da função cognitiva dos pacientes classificada de acordo com o MEEM (Figura 19C, Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,1780$, $p = 0,2535$).

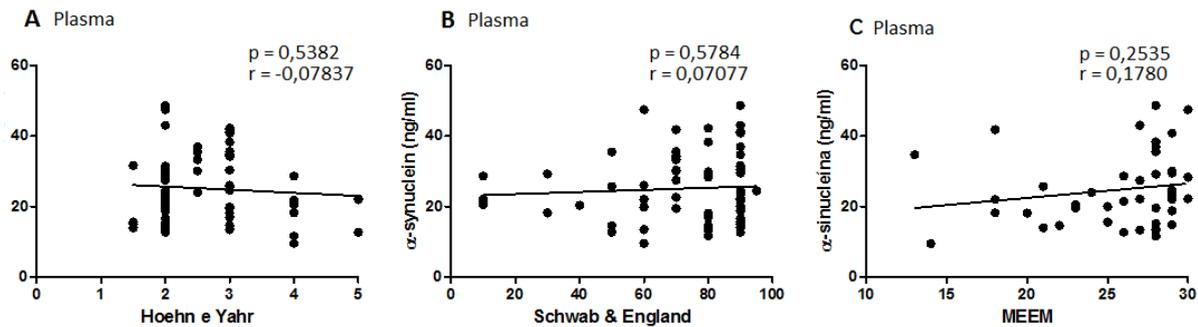


Figura 19 Quantificação da α -sinucleína plasmática de sangue de pacientes com DP individualmente. (A) A quantidade de α -sinucleína no plasma sanguíneo de pacientes com DP não se correlaciona com a severidade dos sintomas motores determinado pela escala H&Y (Coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,07837$, $p = 0,582$), (B) nem com a perda da independência nas atividades diárias determinada pela escala SE (Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,5784$, $p = 0,07077$) (C). Também não houve correlação da α -sinucleína plasmática com a função cognitiva dos pacientes (MEEM). Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,1780$, $p = 0,2535$.

A partir da quantificação da α -sinucleína plasmática individualmente, foi possível avaliar sua performance como potencial biomarcador diagnóstico pela análise da curva ROC (característica de operação do receptor, em inglês, "receiver operating characteristic"; Figura 20. A curva ROC é uma forma de representar a relação, normalmente antagônica, entre a sensibilidade (falso positivo) e a especificidade (falso negativo) de um teste diagnóstico quantitativo.

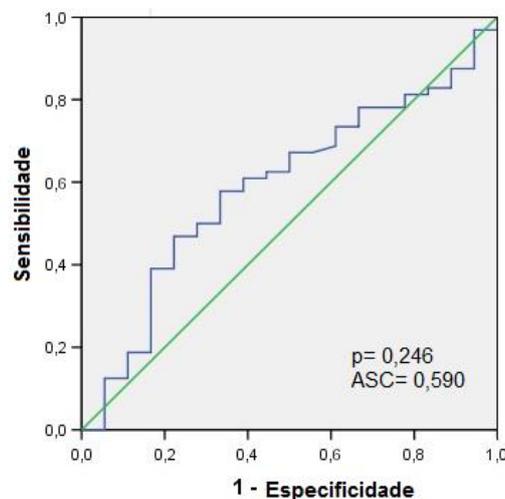


Figura 20 Curva ROC. α -sinucleína (ng/ml) plasmática de pacientes com DP versus controle. ASC: Área sob a curva.

A sensibilidade e especificidade de distinguir pacientes com DP do controle foi de 46,88% e 77,78%, respectivamente (Tabela 7). Com a área sob a curva de 0,590 e o valor de p de 0,246, o parâmetro não se mostrou eficiente para distinguir os grupos.

Tabela 7 Sumário dos resultados da curva ROC. DP versus controle, ilustrando a área sob a curva (ASC), o valor de p, valor de corte (ng/ml), a sensibilidade (%) e especificidade (%).

	ASC	Valor de p	Valor de corte (ng/ml)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
DP versus controle	0,590	0,246	22,19	46,88	77,78

5.1.4 Razão da α -sinucleína exossomal em plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson

Também foi calculada a razão da α -sinucleína exossomal com a α -sinucleína plasmática. Podemos notar pela que apenas $44 \pm 0,14\%$ da α -sinucleína encontra-se dentro dos exossomos, para o grupo controle, sendo $136 \pm 0,42\%$, $182 \pm 0,62\%$ e $144 \pm 0,11\%$ para os grupos leve, moderado e avançado, respectivamente, sendo para este último grupo estatisticamente maior que os demais (Figura 21A, $p = 0,0161$).

Além disso, também foi calculada a razão da α -sinucleína exossomal pelo número de exossomos nos diferentes grupos (Figura 21B). Nosso achado foi bastante interessante mostrando que a quantidade de α -sinucleína nos exossomos do grupo com a doença foi estatisticamente maior que do grupo controle (controle= $11,51 \pm 1,01$, leve= $29,36 \pm 4,17$, moderado= $61,07 \pm 10,50$, avançado= $30,91 \pm 3,22$, $p = 0,0050$).

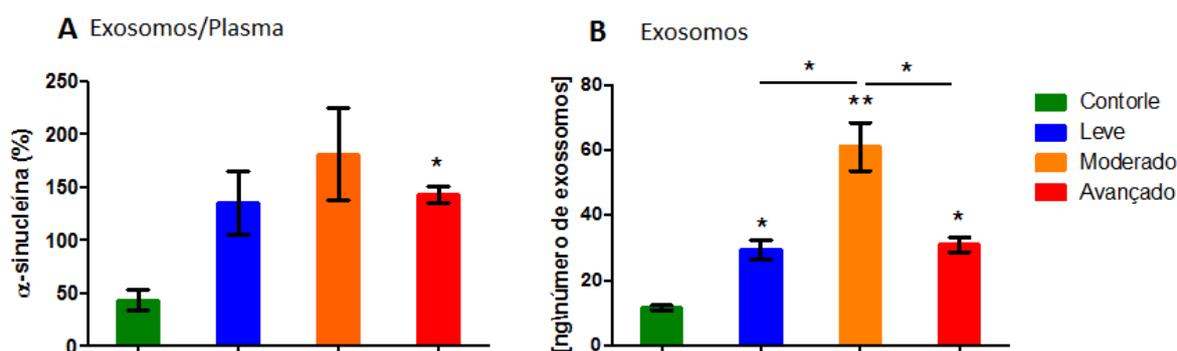


Figura 21 Caracterização da α -sinucleína exossomal em plasma sanguíneo de pacientes com Doença de Parkinson. (A) Razão da α -sinucleína exossomal com a α -sinucleína plasmática (%). (B) Razão da da α -sinucleína exossomal com o número de exossomos no plasma de pacientes com DP e controles * $p \leq 0,05$, one-way ANOVA com post-hoc Tukey's test. Controle= barra verde, grupo leve= barra azul, grupo moderado= barra laranja, avançado= barra vermelha. * $p \leq 0,05$, one-way ANOVA com post-hoc Tukey's test. Controle= barra verde, grupo leve= barra azul, grupo moderado= barra laranja, avançado= barra vermelha.

Inclusões contendo α -sinucleína não estão restritas ao SNC, mas também podem ser identificadas em tecidos corporais periféricos, confirmando a natureza sistêmica da patologia (BRAAK *et al.*, 2003). Além disso, α -sinucleína pode ainda ser detectada em diversos fluidos corporais (MALEK *et al.*, 2014), como plasma e saliva (AL-NIMER *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; VIVACQUA *et al.*, 2016), sendo uma fonte alternativa e muito mais fácil acesso que o líquido. É aceitável que a α -sinucleína possui a capacidade de se autopropagar através do cérebro. Um mecanismo potencial para seu espalhamento é através dos exossomos (EMMANOUILIDOU *et al.*, 2010; DANZER *et al.*, 2012; COLEMAN; HILL, 2015). Além disso, cresce o número de evidências que sugere que os exossomos são uma fonte de biomarcadores para doenças neurodegenerativas mais confiável que os fluidos *per se*, uma vez que eles carregam moléculas únicas e que refletem as mudanças ocorridas durante o desenvolvimento da doença (VELLA *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017).

De acordo com o estado da arte, apenas dois estudos examinaram o conteúdo de α -sinucleína em exossomos de plasma de pacientes do DP (SHI *et al.*, 2014; CERRI *et al.*, 2018). Ambos mostraram que os níveis plasmáticos de α -sinucleína exossomal é maior em pacientes com DP quando comparados com doadores saudáveis, semelhante com os nossos achados. O fato de que essa diferença não é afetada pela concentração individual de exossomos entre os grupos confirma que os exossomos plasmáticos de pacientes com DP contém uma quantidade maior de α -sinucleína por vesícula quando comparados com os doadores saudáveis.

Além disso, nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de α -sinucleína plasmática entre os pacientes e doadores saudáveis. O aumento significativo de α -sinucleína associada a exossomos em pacientes com DP pode refletir o papel funcional desta proteína como fonte na patologia. Danzer e colaboradores (2012) mostraram que exossomos associados a α -sinucleína são mais tóxicos a células que exossomos não a contendo, contribuindo com a ideia de que a via de liberação da proteína pode explicar o espalhamento da α -sinucleína observado em cérebros humanos *post-mortem*. Muitos achados sugerem que α -sinucleína exossomal de pacientes com sinucleinopatias funcionam como carreadores para transmissão da doença de maneira interneuronal, pela indução da oligomerização e agregação de proteínas endógenas (STUENDL *et al.*, 2016; NGOLAB *et al.*, 2017).

Apesar da não ter sido observada diferença nos níveis de α -sinucleína plasmática entre pacientes e controles, assim como no nosso estudo, Shi e

colaboradores (2014) observaram que os exossomos com quantidades aumentadas de α -sinucleína em pacientes com DP eram inteiramente de origem neuronal (positivos para L1CAM – proteína de adesão celular, que é encontrada na superfície das células nervosas). Como exossomos podem ser secretados por diversos tipos celulares, incluindo células do sangue periférico (ZITVOGEL *et al.*, 1998; MATSUMOTO *et al.*, 2017), e muitos estudos mostram que os níveis de α -sinucleína aumentam nas células vermelhas e em linfócitos periféricos em pacientes com DP (KIM *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2017), pode-se imaginar que diferentes populações celulares contribuem para o aumento da α -sinucleína exossomal no plasma de pacientes com DP. Além disso, uma vez que nosso protocolo não possui etapas adicionais de isolamento e caracterização de subpopulações de exossomos e que mesmo assim permita obter quantidade suficiente de vesículas a partir de um volume pequeno de amostra, a valiação da α -sinucleína exossomal em *pool*, pode ser utilizada na rotina da prática clínica após devidas otimizações.

5.1.5 Exossomos de plasma sanguíneos de pacientes com Doença de Parkinson e a indução da oligomerização da α -sinucleína

De modo a avaliar o efeito dos exossomos de doadores saudáveis e pacientes com DP na oligomerização da α -sinucleína, foi utilizado o ensaio BiFC, que é baseado na reconstrução da proteína fluorescente funcional VENUS pela interação de, no mínimo, duas moléculas de α -sinucleína que permite a visualização da formação de dímeros/oligômeros de α -sinucleína em células vivas.

Células HEK foram plaqueadas e, no dia seguinte, transfectadas com igual quantidade dos plasmídeos VN- α -sinucleína e α -sinucleína-VC, utilizando metafectina. No dia seguinte da transfecção, foi adicionado o conteúdo de exossomos - 1 μ L e 10 μ L dos grupos de estadiamento leve, moderado, avançado e doadores saudáveis (controle) -, às culturas e 24 horas após essa adição as células foram fixadas e as inclusões avaliadas em microscópio de fluorescência. Para controle experimental, alguns poços foram transfectados, porém não houve adição de exossomos de nenhuma origem (NT: não tratado). De qualquer maneira, toda a análise transcorreu igual para toda a placa, independente da presença de vesículas ou não.

Pela análise, sugere-se um leve aumento da oligomerização da α -sinucleína em função do estadiamento da doença e quantidade de exossomos, porém sem diferença estatística (N.S.: não significativo; Figuras 22A e 22B).

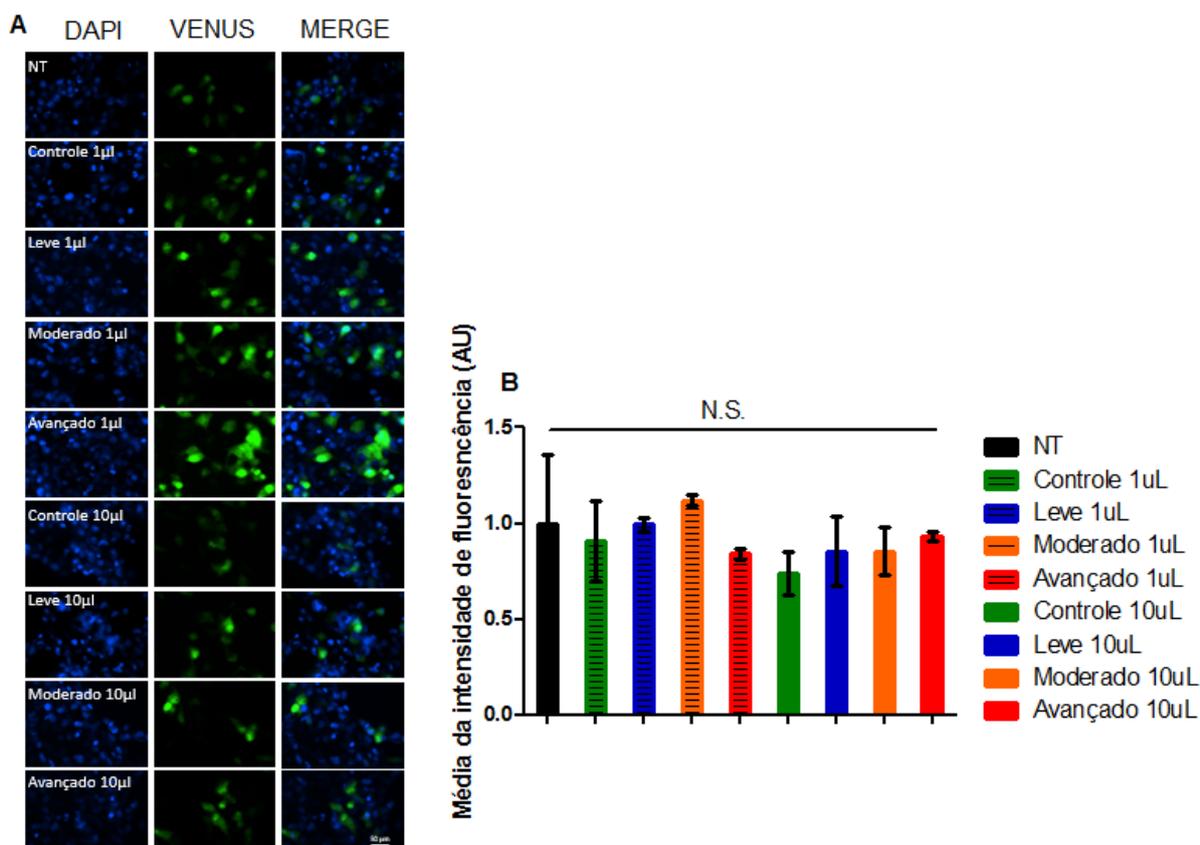


Figura 22 Efeito dos exossomos na oligomerização da α -sinucleína. (A) Imagens representativas da oligomerização da α -sinucleína. Células HEK superexpressando os constructos VN- α -sinucleína e α -sinucleína-VC. A fluorescência verde é resultante da reconstituição do fluoróforo VENUS, promovido pela interação das proteínas de interesse. Volumes de 1 μ L ou 10 μ L de exossomos de diferentes origens (grupo leve, moderado, avançado ou doadores saudáveis – controle) foram adicionado às culturas. Escala: 50nm. (B) Eficiência de oligomerização. Média da intensidade de fluorescência das células expostas a exossomos de diferentes origem e quantidades. Média e desvio padrão relativos de três experimentos independentes. NT: Não tratado, sem a presença de exossomos. N.S.: Não significativo.

5.1.6 Exossomos de plasma sanguíneos de pacientes com Doença de Parkinson e a indução da agregação da α -sinucleína

Em paralelo, foi avaliado o efeito dos exossomos na formação de inclusões de α -sinucleína. Para isso, nos baseamos no paradigma estabelecido de agregação da α -sinucleína baseado na co-expressão de SynT e Sph1, uma proteína presente nos CL, que interage diretamente com a α -sinucleína. Como previamente estabelecido, células H4 foram co-transfectadas com plasmídeos codificando cada uma das variantes SynT e Sph1 e a formação de inclusões foi avaliada após 24 horas da exposição aos exossomos, que se deu 24 horas após a transfecção.

Exossomos nas quantidades de 1 μ L e 10 μ L, provenientes de plasma de sangue periférico de doadores saudáveis (controle), grupo leve, moderado e avançado da DP, foram adicionados às culturas. Além disso, alguns poços foram

transfectados porém, não houve adição de exossomos de nenhuma origem (NT: Não tratado). Com isso, foi avaliada a propensão à agregação dos constructos mesmo na ausência de vesículas. Uma vez que o padrão de inclusão é heterogêneo, foram definidas 4 categorias (células sem inclusão, menos que 5 inclusões, entre 5 e 9 inclusões e mais que 10 inclusões) para se obter uma conclusão mais precisa do efeito dos exossomos.

Pode ser observado que o número de células com 10 ou mais inclusões aumenta para todos os grupos de estadiamento da doença em relação ao controle, para os dois volumes de exossomos adicionados (1 μ L e 10 μ L). Além disso, também houve uma diminuição no número de células sem inclusões para todos os grupos de estadiamento da doença em relação às quantidades de 1 μ L e 10 μ L de vesículas. Os resultados também sugerem uma sutil diminuição do grupo leve em relação aos grupos moderado a avançado, para ambas quantidades de vesículas adicionadas (Figuras 23A e 23B).

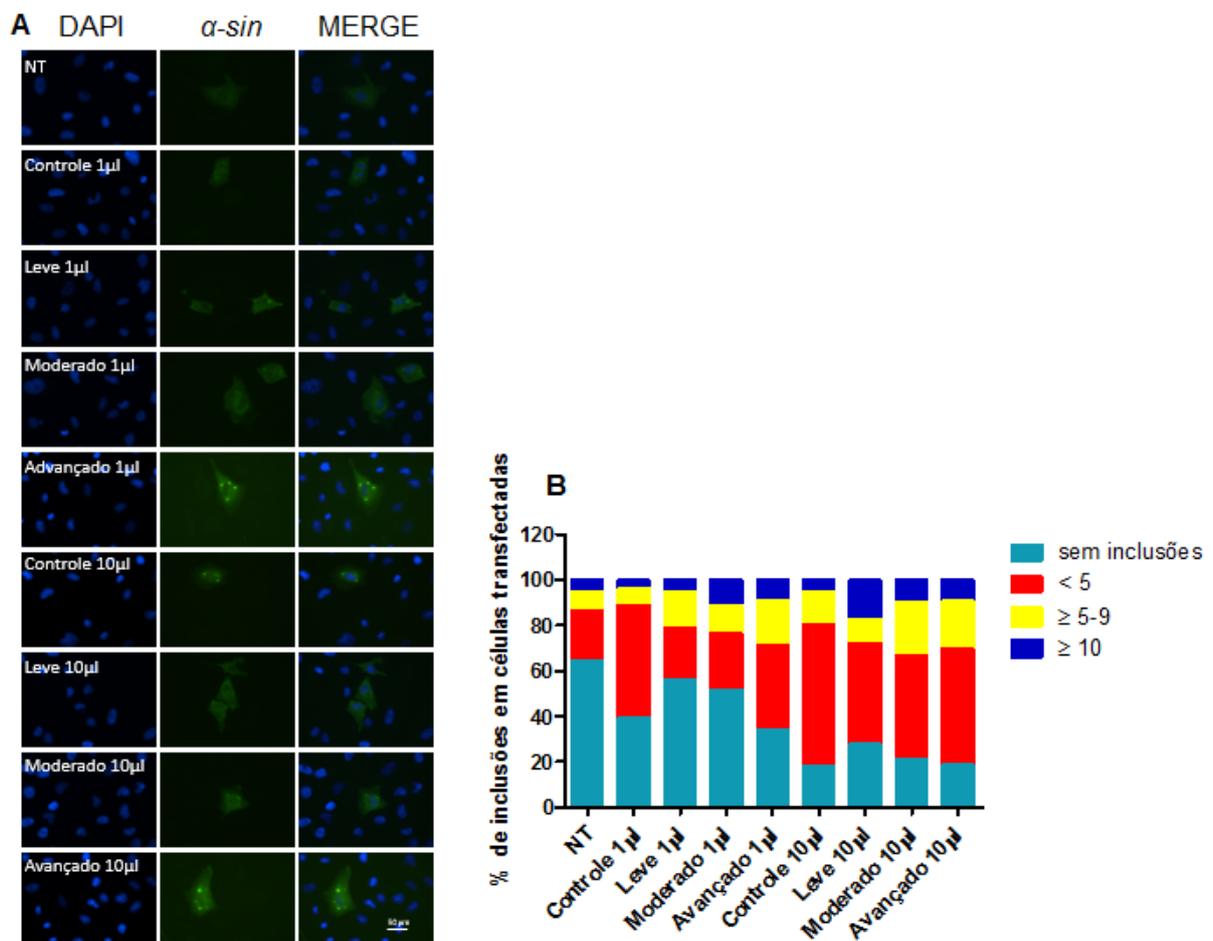


Figura 23 Efeito dos exossomos na formação de inclusões. Esse modelo consiste na co-expressão de SynT junto com Sph1. (A) Padrão de inclusão nas células H4. Exossomos de diferentes origens e quantidades resultam na formação de inclusões distintas em células humanas H4. Volumes de 1 μ L ou

10 µL de exossomos de diferentes origens (grupo leve, moderado, avançado ou doadores saudáveis – controle) foram adicionado às culturas. Escala: 50nm. (B) Quantificação das inclusões. Para cada experimento, 50 células foram classificadas em diferentes grupos de acordo com o padrão de inclusão. Resultados provenientes de um único experimento. Sem análise estatística. NT: Não tratado, sem a presença de exossomos. *α-sin*: *α-sinucleína*.

Os achados do nosso trabalho não envolvem apenas a quantificação da *α-sinucleína* plasmática e exossomal de pacientes com DP. Também mostra, de maneira inédita, que essas vesículas podem induzir a oligomerização e agregação da *α-sinucleína* em células receptoras através dos ensaios BiFC e pelo modelo baseado na co-expressão de SynT e Sph1, respectivamente. Essas descobertas podem servir como base para futuros estudos sobre o espalhamento da *α-sinucleína*, assim como sua possível utilização como marcador.

A importante função dos exossomos na comunicação celular permite que eles ajam como notáveis contribuintes tanto em condições saudáveis tanto quanto em doentes. Além disso, os exossomos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica assim, eles podem alcançar o sangue periférico mesmo sendo oriundos do SNC, fornecendo proteínas marcadores desse sistema. Ghidoni e colaboradores (2008) propõe que tais vesículas atuariam como “Cavalos de Troia” na neurodegeneração: um mecanismo que leva a morte celular por carrear agentes tóxicos célula-a-células através dos exossomos.

De fato muitas pesquisas acreditam que os exossomos atuem como potenciais carreadores de patógenos para o ambiente intracelular e levem a perda da função neuronal (SIMONS; RAPOSO, 2009; BELLINGHAM *et al.*, 2012; COLEMAN; HILL, 2015; DANZER *et al.*, 2012). *α-sinucleína* exossomal não atua apenas como um biomarcador para DP, mas é o potencial ator na propagação de suas formas neurotóxicas no cérebro. Em um estudo publicado em 2011, Alvarez e colaboradores demonstraram que exossomos provenientes de células SH-SY5Y superexpressando *α-sinucleína* eficientemente a transfere para células normais do mesmo tipo. Além disso, quando a liberação de *α-sinucleína* em exossomos aumenta, a sua transmissão para células receptoras aumenta de maneira correspondente.

Alguns anos depois, estudos mostraram que exossomos provenientes de líquido de pacientes com DP continham agregados da *α-sinucleína* e que, esses exossomos podiam iniciar a oligomerização da forma solúvel da proteína em células-alvo de maneira dose-dependente e levar ao quadro patológico (KUNADT *et al.*, 2015; STUENDL *et al.*, 2016). Esses estudos apoiam a ideia de que os exossomos auxiliam na propagação da doença.

Em um estudo realizando o ensaio de atividade da luciferase evidenciou que oligômeros de α -sinucleína livres não podem ser internalizados de maneira eficiente por células receptoras, mas apenas quando associados com a superfície externa da membrana plasmática (DELENCLOS, *et al.*, 2017). Essas observações mostram que, apesar de formas oligoméricas da α -sinucleína estarem presentes na porção extracelular de forma livre (não associada aos exossomos), a fração liberada dentro das vesículas é internalizada nas células receptoras mais prontamente, conferindo neurotoxicidade para células vizinhas (EMMANOUILIDOU *et al.*, 2010; DANZER *et al.*, 2012). Além disso, exossomos isolados de líquido de pacientes com DP, foram capazes de induzir a agregação da α -sinucleína em células *naïve* (STUENDL *et al.*, 2016).

O processo de internalização dos exossomos ainda não está completamente esclarecido e pode ocorrer através de fusão direta da membrana plasmática ou por endocitose mediada por receptor. Dependendo da célula receptora, a internalização pode ocorrer por diversos mecanismos, tais como: endocitose mediada por clatrina, em células neuronais (FRÜHBEIS *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2014), endocitose independente de clatrina mas dependente de colesterol e *lipid raft*, no endotélio e em algumas células tumorais (SVENSSON *et al.*, 2013) ou endocitose dependente de caveolina em células epiteliais (NANBO *et al.*, 2013). São verdadeiras maquinarias de entrega capazes de transitar entre as células e despejar seu conteúdo através da membrana plasmática mediando uma transferência intercelular do seu conteúdo.

Nossos resultados mostram que a quantidade de α -sinucleína exossomal é maior nos pacientes com DP, para os diferentes grupos de estadiamento, apesar de ser igual quando livre no plasma. Além disso, ainda que preliminares, estudos de oligomerização sugerem o aumento da formação de dímeros/oligômeros na presença de exossomos de pacientes com DP, quando comparados com doadores saudáveis. Adicionalmente, estudos de agregação sugerem que o número de células com 10 ou mais inclusões aumenta para todos os grupos de estadiamento da doença em relação ao controle, para os dois volumes de exossomos adicionados (1 μ L e 10 μ L).

Essas análises reforçam a importância do estudo dos exossomos para fins de diagnóstico e prognóstico da DP. Mas estudando apenas a α -sinucleína será que não estamos perdendo informações no processo?

5.2 ANÁLISE METABOLÔMICA DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLAMAS DE PACIENTES COM DP

5.2.1 **Características clínicas da coorte**

Para a realização da análise metabolômica, foram incluídos 101 pacientes com DP seguindo a mesma classificação (leve, n=46; moderado n=42 e avançado, n=13), além de 36 doadores saudáveis, que apresentavam idade semelhante e coabitavam com os pacientes, como controle. Nenhuma diferença estatística foi observada envolvendo idade de início, escolaridade, consumo de café, tabaco, álcool, água de poço ou no histórico familiar (Tabela 8). Como esperado, devido aos critérios de inclusão e estratificação da coorte, a escala H&Y e a escala SE foram estatisticamente diferentes entre os grupos de estadiamento da doença e os controles ($p < 0,0001$). Também houve diferença estatística entre os grupos na idade do exame ($p=0,0492$), tempo de doença ($p < 0,0001$), gênero ($p < 0,0001$), MEEM ($p=0,0003$) e na dose equivalente da levodopa ($p=0,0010$).

Tabela 8 Característica clínica das coorte. N.A.: Não avaliado

	Controle (n=36)	DP (n=101)	Leve (n=46)	Moderado (n=42)	Avançado (n=13)	p Valor
Idade do exame (anos)	60,74±10,80	64,40±12,13	63,02±10,16	65,29±9,26	71,38±12,05	0,0492
Idade de início (anos)	N.A.	55,33±11,75	56,22±11,06	54,70±11,30	54,15±15,80	0,9179
Tempo de doença (anos)	N.A.	9,71±6,66	6,80±4,58	10,58±5,68	17,23±9,14	< 0,0001
Gênero (% maculino)	19,44	61,39	67,39	64,29	30,77	< 0,0001
Escolaridade (anos)	N.A.	8,85±3,98	8,78±4,24	9,04±3,69	8,46±4,20	0,9710
Consumo de cafeína (% não)	N.A.	11,88	15,22	7,14	15,38	0,6774
Tabagista (% não)	N.A.	53,47	47,83	54,76	69,23	0,5954
Etilista (% não)	N.A.	41,58	39,13	40,48	53,85	0,8192
Consumo de água de poço (% não)	N.A.	32,67	34,78	28,57	38,46	0,9161
Histórico familiar (% sim)	N.A.	35,64	47,83	28,57	15,38	0,1020
Escala Hoehn & Yahr modificada	N.A.	2,59±0,79	1,93±0,17	2,81±0,25	4,23±0,44	< 0,0001
Escala Schwab & England	N.A.	73,07±22,34	83,70±13,01	73,33±15,25	34,62±26,34	< 0,0001
Mini exame do estado mental	N.A.	24,45±6,89	26,14±5,43	25,63±4,44	16,75±10,07	0,0003
Dose equivalente de levodopa (mg)	N.A.	188,95±104,15	137,02±74,03	213,81±102,20	314,80±104,01	0,0010

5.2.2 Metabolômica

5.2.2.1 otimização

5.2.2.1.1 preparo da solução de analitos

Foram selecionadas 3 classes de substâncias presentes no sangue (catecolaminas endógenas, corticosteroides endógenos e anabólicos esteroidais) e seus respectivos representantes (adrenalina, noradrenalina, dopamina, cortisol, cortisona e testosterona). A partir daí foram selecionadas as moléculas exógenas que apresentassem estrutura química semelhante a elas.

Assim, foram incluídas as fenilpropanolonas (foledrina e metilefedrina), os corticosteroides (prednisona e prednisolona) e moléculas esteroidais com atividade anabólica (metiltrienolona, oxandrolona e trembolona; Tabela 9)

Optou-se por trabalhar com quantidades bem inferiores dos analitos no ensaio em relação às moléculas endógenas análogas no sangue. Dessa forma, poderíamos garantir que se o método estivesse recuperando todas essas substâncias de maneira satisfatória, os resultados dos ensaios metabolômicos seriam também satisfatórios e confiáveis. A solução de analitos foi preparada em metanol.

Tabela 9 Classes e substâncias endógenas e analitos análogos utilizados no procedimento de otimização. As classes e substâncias endógenas utilizadas foram as catecolaminas endógenas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), corticosteroides endógenos (cortisol e cortisona) e anabólicos esteroidais (testostona). Os analitos análogos utilizados foram as fenilpropanolonas (foledrina e metilefedrina), corticosteroides (prednisona e prednisolona) e moléculas esteroidais com atividade anabólicas (metiltrienolona, oxandrolona e trembolona). Os valores de referências das substâncias endógenas foram utilizados para se estabelecer a quantidade dos analitos análogos utilizados no procedimento (Fonte: Fleury).

Classe/Substância	Valores de Referência (ng)	Analitos análogos	Quantidade (ng)
<u>Catecolaminas endógenas</u>		<u>Fenilpropanolaminas</u>	
Adrenalina	0,09	Foledrina	0,015
Noradrenalina	0,46	Metilefedrina	
Dopamina	0,03		
<u>Corticosteroides endógenos</u>		<u>Corticosteroides</u>	
Cortisol - pela manhã	50 a 250	Prednisona	0,02
Cortisona		Prednisolona	
<u>Anabólicos esteroidais</u>		<u>Moléculas esteroidais com atividade anabólica</u>	0,03
Testosterona total	3 a 9 (para homens)	Metiltrienolona	
		Oxandrolona	
		Trembolona	

5.2.2.1.2 ensaio de otimização

A otimização do procedimento de extração foi realizada aplicando-se a metodologia de superfície de resposta baseada na matriz de Doehlert para 3 variáveis (volume de solvente orgânico, em mL; porcentagem de TBME, em acetato de etila, e; tempo de orbital no agitador rotatório, em minutos). Todo o procedimento foi realizado separadamente para cada analito em pH ácido, alcalino e neutro.

A otimização foi, então, estabelecida como a melhor condição de extração avaliada através da recuperação, ou seja, eficiência da extração, como mostra a tabela 10. Nesse momento foram setados os valores das variáveis para buscar o maior valor de recuperação para cada analito, gerando-se os gráficos de superfície de resposta onde foram avaliadas as condições críticas para cada um deles. A figura 24 apresenta os gráficos de superfície de resposta, agrupados 2 a 2, para a foledrina, prednisolona e trembolona, em pH ácido. Os gráficos dos outros analitos e para os 3 pHs se encontram no apêndice.

Após a análise de todos os gráficos de superfície de resposta, pode-se avaliar as condições ótimas para o experimento. A tabela 11 dispõe as condições críticas do analitos. Pode-se observar que para os 3 pHs estudados a melhor condição envolveu 9 mL de solvente orgânico, sendo 100% acetato de etila (0% de TBME). Além disso, para o pH ácido o tempo de orbital ótimo foi de 10 minutos enquanto para os pHs alcalino e neutro foi de 30 minutos.

Tabela 10 Valores de recuperação (%) dos analitos em relação aos 13 experimentos envolvidos no processo de otimização. Foram avaliados os analitos foledrina, metilefedrina, prednisona, prednisolona, metiltrienolona, oxandrolona e trembolona nos pHs ácido, alcalino e neutro.

	Analitos	Experimento												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ÁCIDA	Foledrina	0,33	0,24	0,73	0,82	2,81	0,79	1,91	2,99	2,85	3,54	3,69	4,33	5,73
	Metilefedrina	0,98	0,93	2,54	2,02	10,30	2,04	6,53	9,93	7,68	11,97	10,18	11,78	17,40
	Prednisona	117,03	70,01	114,94	91,28	145,67	55,35	83,77	93,85	95,36	94,61	85,78	93,95	92,30
	Prednisolona	93,23	64,14	102,70	93,26	139,86	55,51	88,54	112,77	98,27	93,63	87,44	92,35	81,78
	Metiltrienolona	104,00	74,70	96,23	90,13	139,38	63,22	80,00	101,85	93,84	107,75	93,99	96,07	98,17
	Oxandrolona	99,79	66,22	92,99	87,18	155,58	72,83	86,95	101,50	85,12	89,96	98,04	87,31	89,73
	Trembolona	150,79	88,77	85,55	96,13	140,57	64,53	89,27	109,67	102,18	114,07	108,29	92,60	107,55
ALCALINA	Foledrina	14,77	25,61	24,48	14,69	26,73	4,42	21,41	53,52	21,12	46,17	41,27	16,06	44,60
	Metilefedrina	54,88	890,76	85,00	43,98	94,71	41,81	57,83	85,41	68,97	60,78	101,74	50,53	74,92
	Prednisona	78,23	83,18	79,98	79,34	87,62	59,12	65,00	82,10	76,37	89,60	77,80	54,58	84,34
	Prednisolona	75,84	85,19	76,38	87,09	83,06	59,30	59,81	82,54	74,79	90,65	80,97	54,98	91,64
	Metiltrienolona	76,79	82,71	73,53	91,78	85,76	64,60	69,53	89,09	76,40	95,39	81,21	61,87	85,66
	Oxandrolona	70,83	74,75	64,95	83,85	84,57	54,50	62,23	78,17	69,95	89,74	78,57	54,80	87,69
	Trembolona	79,76	80,65	68,59	90,65	82,35	58,24	72,56	85,71	83,92	85,62	85,35	63,33	85,53
NEUTRA	Foledrina	0,08	0,25	0,18	0,23	0,64	0,13	0,80	1,76	1,25	2,43	2,56	1,60	2,28
	Metilefedrina	2,06	5,47	3,07	3,46	7,04	1,24	9,02	12,95	8,33	19,12	15,52	10,94	12,09
	Prednisona	79,83	85,35	63,68	102,96	90,32	85,27	81,09	92,21	135,87	108,49	101,83	111,07	60,50
	Prednisolona	72,05	76,22	65,31	100,83	92,07	78,02	75,09	85,77	124,08	109,87	104,13	98,05	63,01
	Metiltrienolona	73,78	93,80	76,21	111,49	105,43	88,69	90,10	99,45	127,22	106,59	99,02	93,22	64,73
	Oxandrolona	76,54	80,77	67,50	96,27	100,00	87,08	79,89	86,98	138,26	123,35	102,29	94,54	59,23
	Trembolona	84,73	97,46	80,88	95,58	97,89	79,70	81,82	93,91	144,00	133,62	136,02	94,20	70,66

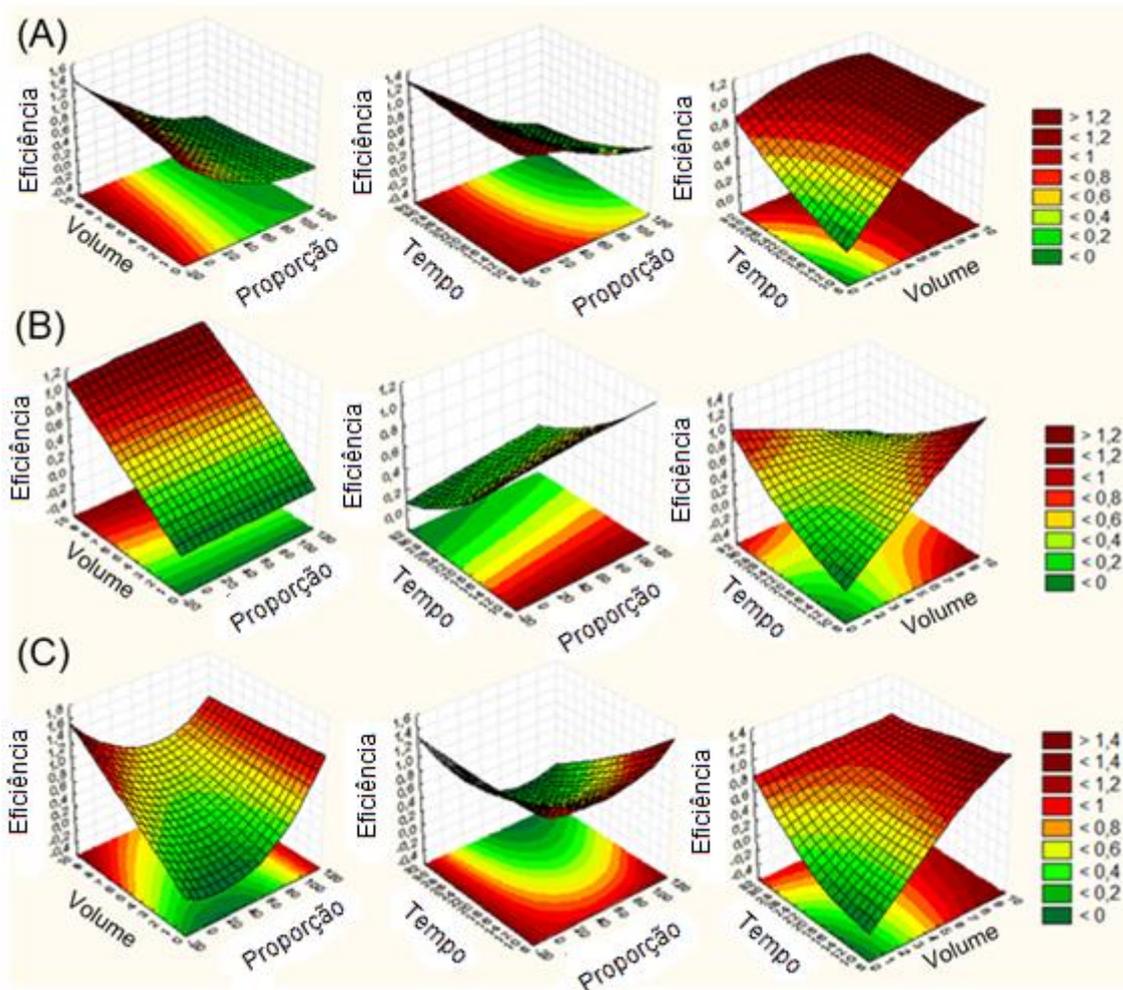


Figura 24 Gráfico de superfície de resposta do efeito de diferentes condições de extração para a (A) foledrina, (B) prednisolona e (C) trembolona em pH ácido. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três grupos, duas a duas. O eixo y corresponde a eficiência de recuperação. Os gráficos mostram proporção e volume (esquerda), proporção e tempo (meio) e, volume e tempo (direita). A escala de cores representa os valores de eficiência de recuperação variando de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).

Tabela 11 Condições críticas de extração para cada analito em pH ácido, alcalino e neutro e suas respectivas conclusões. As variáveis analisadas foram volume total de solvente, em mL (1), porcentagem de TBME em acetato de etila (2) e tempo de orbital no agitador rotatório, em minutos (3). As conclusões foram: pH ácido (1) 9mL, (2) 100% de acetato de etila e (3) 10 minutos; pH alcalino (1) 9mL, (2) 100% de acetato de etila e (3) 30 minutos; e, neutro (1) 9mL, (2) 100% de acetato de etila e (3) 30 minutos.

ÁCIDA

Moléculas	Volume total de solvente (mL)	% TBME em (Acet. Et.)	Tempo de orbital (min.)
Foledrina	7 a 9	0	10 a 30
Metilefedrina	9	0	10 a 30
Prednisona	9	50 a 100	10
Prednisolona	9	0 a 100	10
Metiltrienolona	9	0 a 75	10
Oxandrolona	9	0 a 100	10
Trembolona	9	0	10 a 15
Conclusão	9	0	10

ALCALINA

Moléculas	Volume total de solvente (mL)	% TBME em (Acet. Et.)	Tempo de orbital (min.)
Foledrina	9	0 a 25	10 a 30
Metilefedrina	9	100	10 a 30
Prednisona	9	0 a 25	25 a 30
Prednisolona	9	0 a 25	25 a 30
Metiltrienolona	9	0 a 100	10 a 15 e/ou 25 a 30
Oxandrolona	9	0 a 25	10 ou 30
Trembolona	9	0	10 a 15 e/ou 30
Conclusão	9	0	30

NEUTRA

Moléculas	Volume total de solvente (mL)	% TBME em (Acet. Et.)	Tempo de orbital (min.)
Foledrina	9	0 a 25	30
Metilefedrina	9	0 a 25	20 a 30
Prednisona	5	50	15 a 20
Prednisolona	1 a 9	50	15 a 20
Metiltrienolona	9	100	10
Oxandrolona	1 a 9	0	30
Trembolona	1 a 9	0	30
Conclusão	9	0	30

5.2.2.2 validação

Para garantir que o novo método analítico gerasse informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele sofreu uma avaliação denominada validação. O ensaio de validação avaliou: seletividade/especificidade, interferência da matriz, repetitividade, arraste e limite de detecção. A tabela 12 ilustra alguns pontos avaliados no ensaio de validação. Descreve os analitos utilizados, sua fórmula química

protonada, a relação massa/carga (m/z), os tempos de retenção, concentração de trabalho, limite de detecção (L.O.D.) e o desvio padrão relativo (RSD).

Tabela 12 Fórmula química protonada (M+H), íon (m/z), tempo de retenção (minutos), concentração de trabalho (ng/mL), limite de detecção (ng/mL) e desvio padrão relativo (%) dos analitos envolvidos no procedimento de validação.

Analito	Fórmula química (M+H)	Íon (m/z)	t _R (min)	Conc. (ng/mL)	LOD (ng/mL)	RSD (%)
Foledrina	C ₁₀ H ₁₅ NO	166,12264	0,92	15	1,5	15,17
Metilefedrina	C ₁₁ H ₁₇ NO	180,13829	1,87	15	1,5	0,08
Prednisona	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	359,18530	6,28	20	2	11,35
Prednisolona	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	361,20095	6,52	20	2	11,75
Metiltrienolona	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	285,18491	7,74	30	3	11,51
Oxandrolona	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	307,22677	7,53	30	3	11,81
Trembolona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	271,16926	7.43	30	3	10,20

A seletividade/especificidade é definida como a habilidade do ensaio detectar apenas a substância de interesse e pode ser entendidas como a habilidade do método em discriminar o analito de interesse entre outras substâncias com estruturas similares. A figura 25 mostra a especificidade do método uma vez que, após a injeção de 10 matrizes de origens distintas, sem a presença dos analitos, não houve a identificação de nenhuma outra substância no tempo de retenção da metilefedrina.

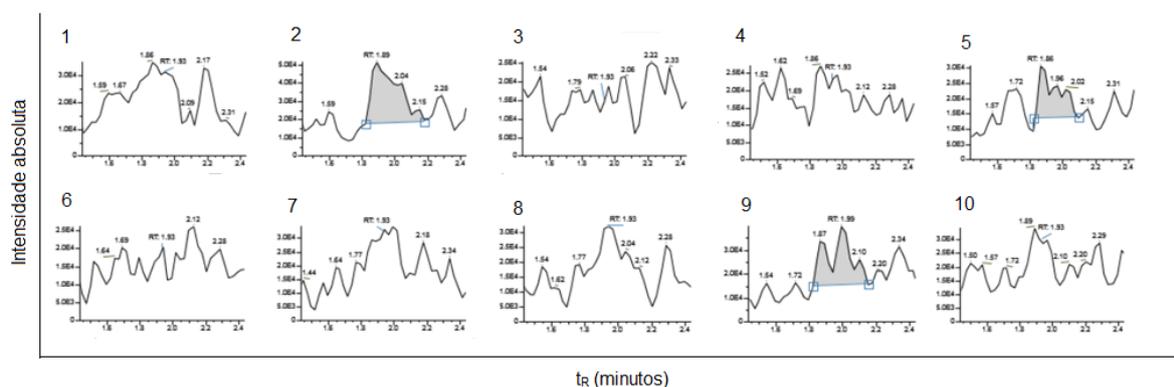


Figura 25 Cromatogramas para avaliação de seletividade/especificidade no tempo de retenção da metilefedrina. Dez plasmas de origem diferentes foram analisados para seletividade/especificidade. Ausência de pico no tempo de retenção da metilefedrina. Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.

Para o limite de detecção, o método foi capaz de detectar 10% da concentração de trabalho. O resultado analítico para repetitividade está relacionado ao RDS. Todos os valores encontrados estavam abaixo de 20% que é o limite de aceitação do método (Tabela 12).

Para o ensaio de arraste podemos observar pela análise da figura 26 que não houve detecção de pico cromatográfico na região do tempo de retenção da metilefedrina mesmo após a injeção de uma amostra com o dobro da concentração de analitos.

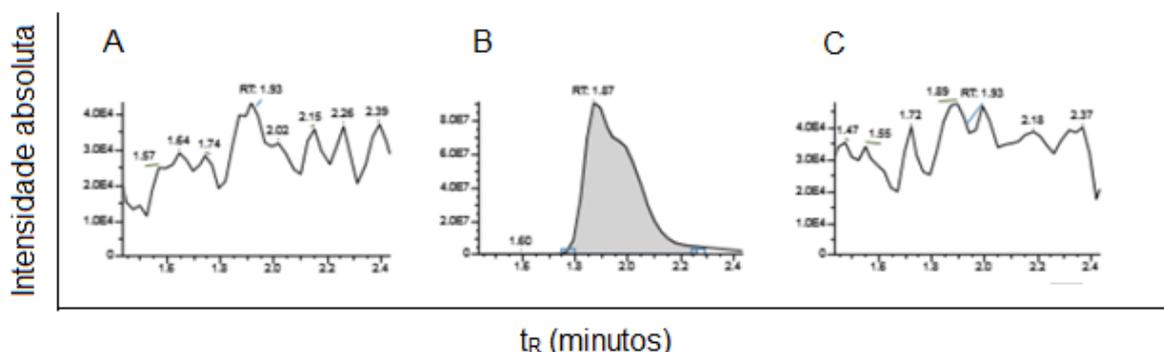


Figura 26 Cromatogramas para análise de arraste no tempo de retenção da metilefedrina. Foram injetados 3 amostras de plasma sanguíneos consecutivamente: um sem adição de nenhuma substância (A), um com o dobro das substâncias a serem validadas (B) e o último sem adição de substância (C). Análise do tempo de retenção da metilefedrina. Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.

Além disso, a interferência da matriz é definida como a possibilidade de interferência no tempo de retenção do analito por um componente endógeno da matriz. Nenhuma interferência foi observada na detecção dos analitos estudados (Tabela 12).

De maneira geral, análises de substâncias de matrizes biológicas (tais como plasma, soro e urina) necessitam de um pré-tratamento. E são diversas as razões para essa necessidade: complexidade biológica das matrizes, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e substâncias a serem analisadas com concentrações a níveis traço (HUBERT *et al.*, 1999, BUJAK *et al.*, 2015). Uma técnica de extração adequada permite que a análise dos componentes de interesse se torne possível. O objetivo final é obter uma fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, a fim de obter uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ *et al.*, 2001). A escolha adequada do solvente orgânico é necessária para garantir uma boa recuperação do analito. A seleção de solvente é um passo fundamental para garantir que nenhuma parte relevante do metaboloma seja perdida no processo. Quanto maior a afinidade do analito pelo solvente orgânico, maior é a recuperação (QUEIROZ *et al.*, 2001). O solvente orgânico acetato de etila tem polaridade média: é mais polar que TBME, mas menos polar que água. Assim, o acetato de etila pode ter uma interação limitada com a água, assegurando a passagem

das moléculas da solução aquosa para a fase de extração orgânica. As substâncias nos valores de pH alcalino e neutro requerem um maior tempo de interação entre estas duas fases (isto é, o tempo no agitador rotativo) para que a extração seja mais eficiente.

O processo de otimização define a melhor maneira de realizar a extração líquido-líquido, a fim de obter o maior número de moléculas capazes de refletir o estado metabólico da amostra. Uma otimização multivariada foi realizada, uma vez que é considerada mais eficiente do que a de processos univariados e pode avaliar a influência de vários parâmetros do procedimento experimental simultaneamente, com um menor número de experimentos (FERREIRA *et al.*, 2004).

Após todos os processos de otimização, uma validação completa foi realizada para garantir que este novo método analítico gerasse informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI *et al.*, 2004). A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda aos requisitos das aplicações analíticas e garanta a confiabilidade dos resultados (ISO/IEC 17025, 2017).

Nossos resultados mostram de maneira satisfatória a otimização do método de extração líquido-líquido e a validação da metodologia de análise de substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Isso torna o método confiável para o estabelecimento de análises metabolômicas seguintes.

5.2.2.3 análise metabolômica de plasma total de pacientes com doença de parkinson

Após otimizar a metodologia de extração líquido-líquido e validar o método de análise qualitativa por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, foram feitas as análises metabolômicas em plasma total e a partir de exossomos enriquecidos de plasma dos pacientes com DP e doadores saudáveis.

As análises de plasma total foram feitas em *pool* com os grupos de estadiamento H&Y e comparadas ao *pool* dos doadores saudáveis. As figuras 27, 28 e 29 mostram o perfil cromatográfico comparativo do grupo com DP do estadiamento leve, moderado e avançado, respectivamente, com o controle. É possível distinguir os cromatogramas do grupo doente (linha vermelha) com o do controle (linha azul). Esse é o indicativo inicial de diferenças nas moléculas para os estágios.



Figura 27 Cromatogramas do *pool* do grupo leve de pacientes com Doença de Parkinson. Perfil cromatográfico comparativo do grupo leve (linha vermelhas) e grupo controle (linhas azuis). Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.



Figura 28 Cromatogramas do *pool* do grupo moderado de pacientes com Doença de Parkinson. Perfil cromatográfico comparativo do grupo moderado (linha vermelhas) e grupo controle (linhas azuis). Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.



Figura 29 Cromatogramas do *pool* do grupo avançado de pacientes com Doença de Parkinson. Perfil cromatográfico comparativo do grupo avançado (linha vermelhas) e grupo controle (linhas azuis). Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.

A etapa seguinte incluiu a análise das 1000 moléculas mais intensas nos grupos. As figuras 30, 31 e 32 mostram perfil após a subtração das intensidades das moléculas dos estadiamento leve ($-59,24 \pm 1223,39$), moderado ($-69,93 \pm 1196,29$) e avançado ($64,87 \pm 1349,66$), para o grupo estudado. O cálculo foi realizado com os valores do grupo de pacientes subtraído pelo grupo dos controles. Assim, as

moléculas à direita são exclusivas e/ou mais intensas nos grupos de pacientes e à esquerda do controle, para todas as análises.

Classificou-se como estatisticamente diferente aqueles metabólitos que apresentaram o valor da intensidade de subtração maior (se a direita do gráfico) ou menor (se a esquerda do gráfico) que o valor de desvio padrão.

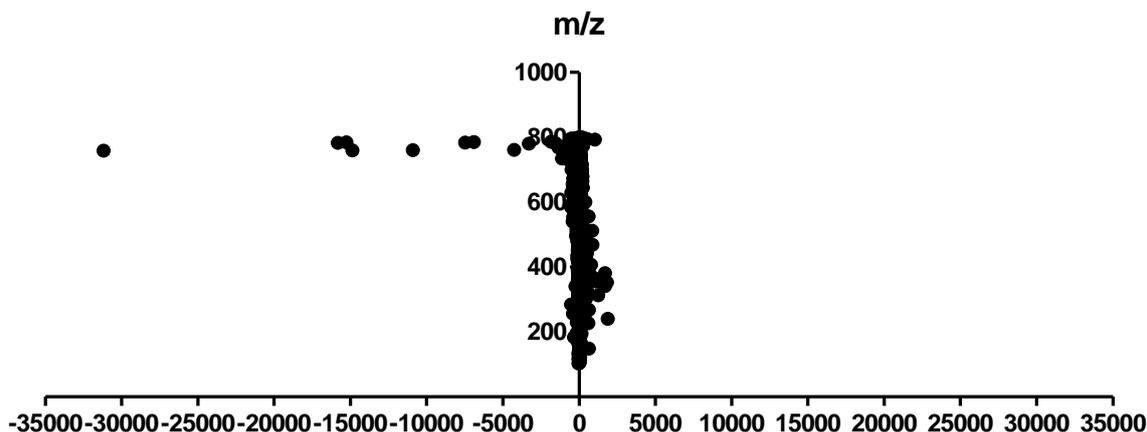


Figura 30 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo leve com doença de Parkinson pelo controle. Cada *spot* representa uma molécula ($-59,24 \pm 1223,39$). O lado direito representa as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo doente e o lado esquerdo, as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo controle.

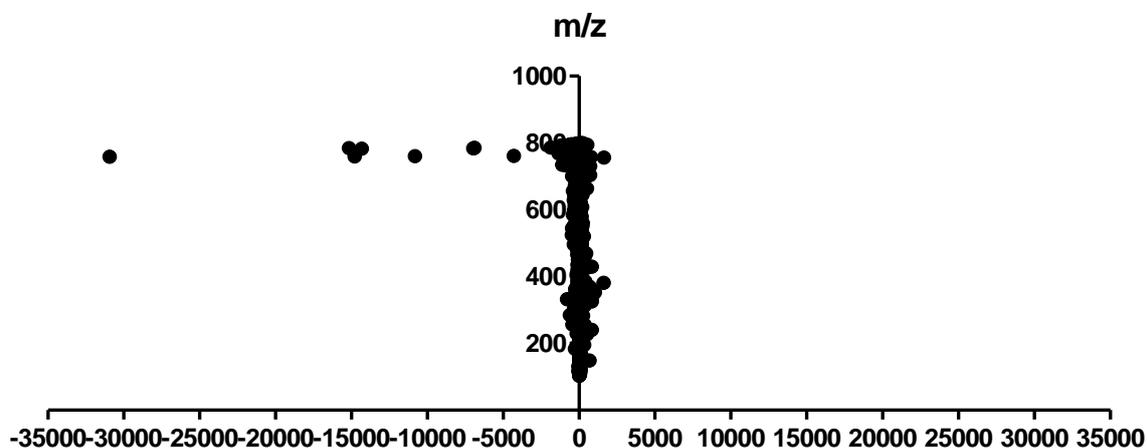


Figura 31 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo moderado com doença de Parkinson pelo controle. Cada *spot* representa uma molécula ($-69,93 \pm 1196,29$). O lado direito representa as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo doente e o lado esquerdo, as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo controle.

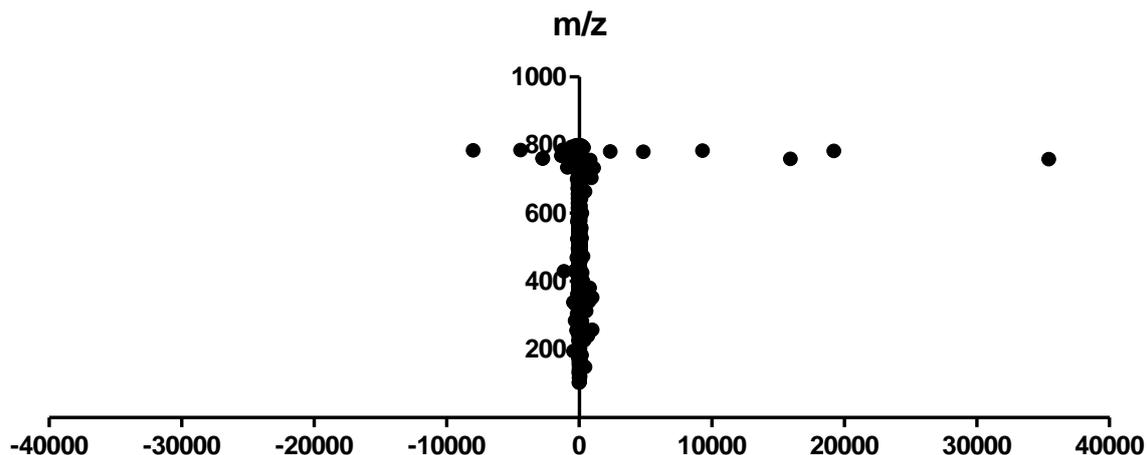


Figura 32 Perfil de subtração das intensidades das moléculas do grupo avançado com doença de Parkinson pelo controle. Cada *spot* representa uma molécula ($64,87 \pm 1349,66$). O lado direito representa as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo doente e o lado esquerdo, as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo controle.

Para verificar os processos biológicos relacionados aos metabólitos exclusivos e estatisticamente diferentes encontrados na análise metabolômica dos grupos clínicos, foi realizada uma análise *in silico* no MetaboAnalyst 3.0 pela análise de *Pathways*. Assim, foi identificada a via metabólica exclusiva alterada para cada grupo, dando destaque somente a ela.

Alterações na via do metabolismo de glicerofosfolipídeos (Figura 33), biossíntese de hormônios esteroidais (Figura 35) e, do metabolismo ácido araquidônico (Figura 40) estão fortemente relacionadas com os grupos leve, moderado e avançado da DP, como pode ser observado através das figuras 34, 36 e 37 que ilustram vias alteradas, respectivamente.

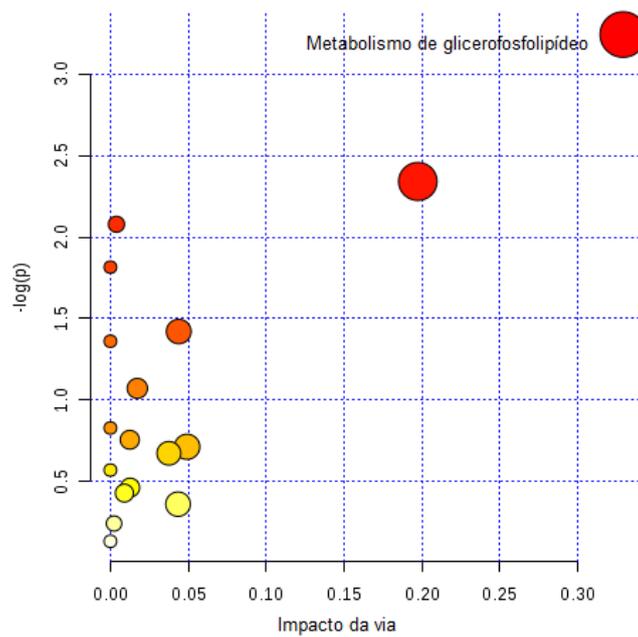


Figura 33 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo leve com DP. A análise das vias foi conduzida entre os metabólitos mais intensos e exclusivos para a coorte. As vias com cores mais escuras e círculos maiores representam maior relevância para a DP. Ou seja, mais metabólitos envolvidos na via em questão estão com a expressão aumentada no grupo de estadiamento leve da DP. A via de metabolismo de glicerofosfolípídeo possui mais metabólitos alterados e por isso foi destacada.

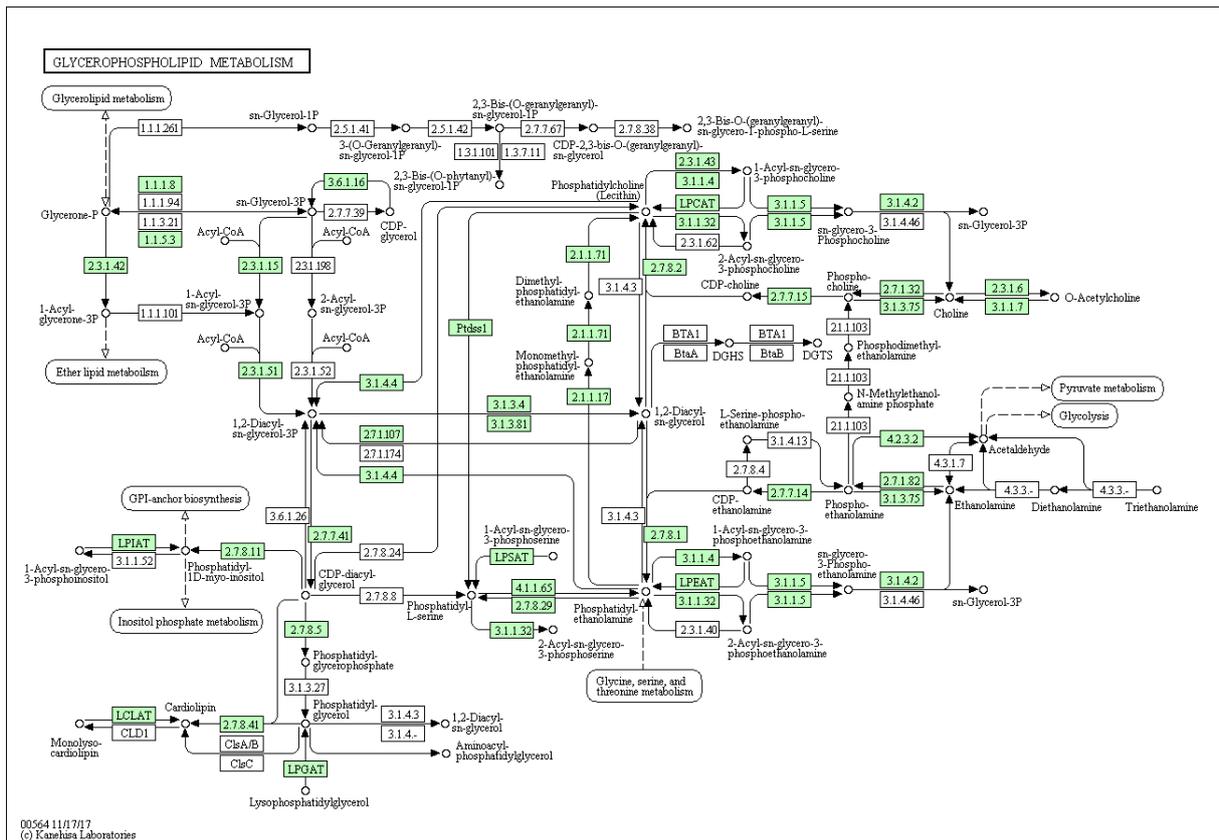


Figura 34 A rede metabólica do metabolismo de glicerofosfolípideo. A rede mostra a via de maneira global, as setas representam relações subordinadas. As caixas verdes correspondem a enzimas com função e estrutura descrita detalhadamente no banco de dados. Fonte: KEGG.

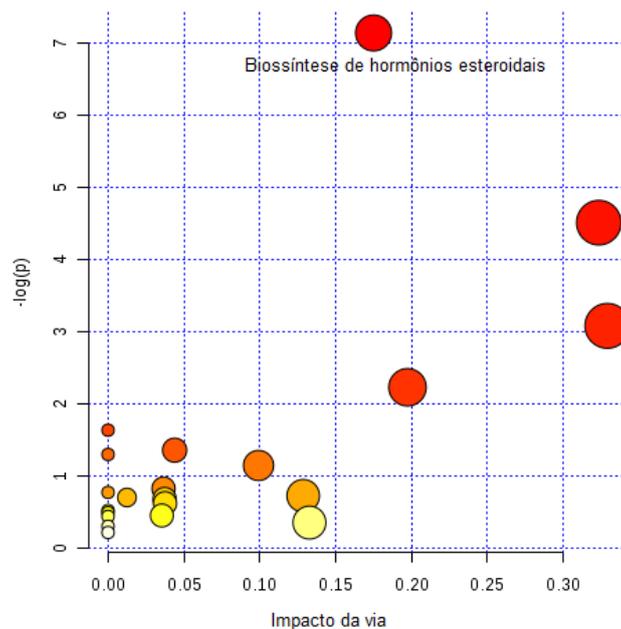


Figura 35 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo moderado com DP. A análise das vias foi conduzida entre os metabólitos mais intensos e exclusivos para a coorte. As vias com cores mais escuras e círculos maiores representam

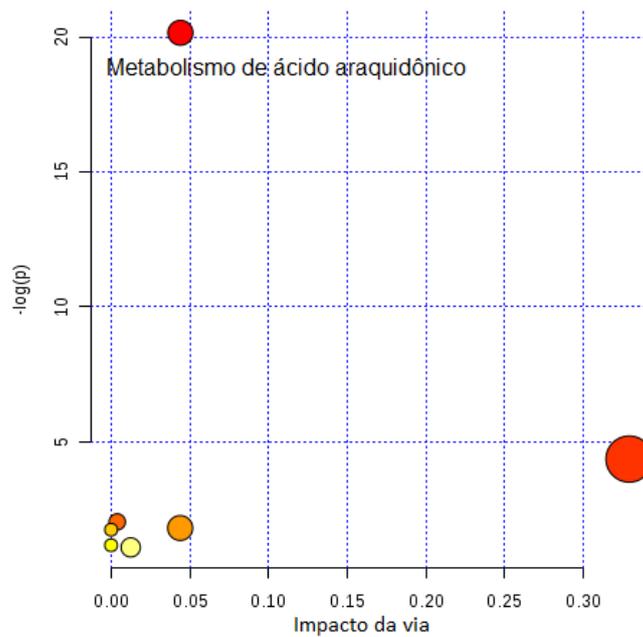


Figura 37 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no plasma de pacientes do grupo avançado com DP. A análise das vias foi conduzida entre os metabólitos mais intensos e exclusivos para a coorte. As vias com cores mais escuras e círculos maiores representam maior relevância para a DP. Ou seja, mais metabólitos envolvidos na via em questão estão com a expressão aumentada no grupo de estadiamento avançado da DP. A via de metabolismo do ácido araquidônico possui mais metabólitos alterados e por isso foi destacada.

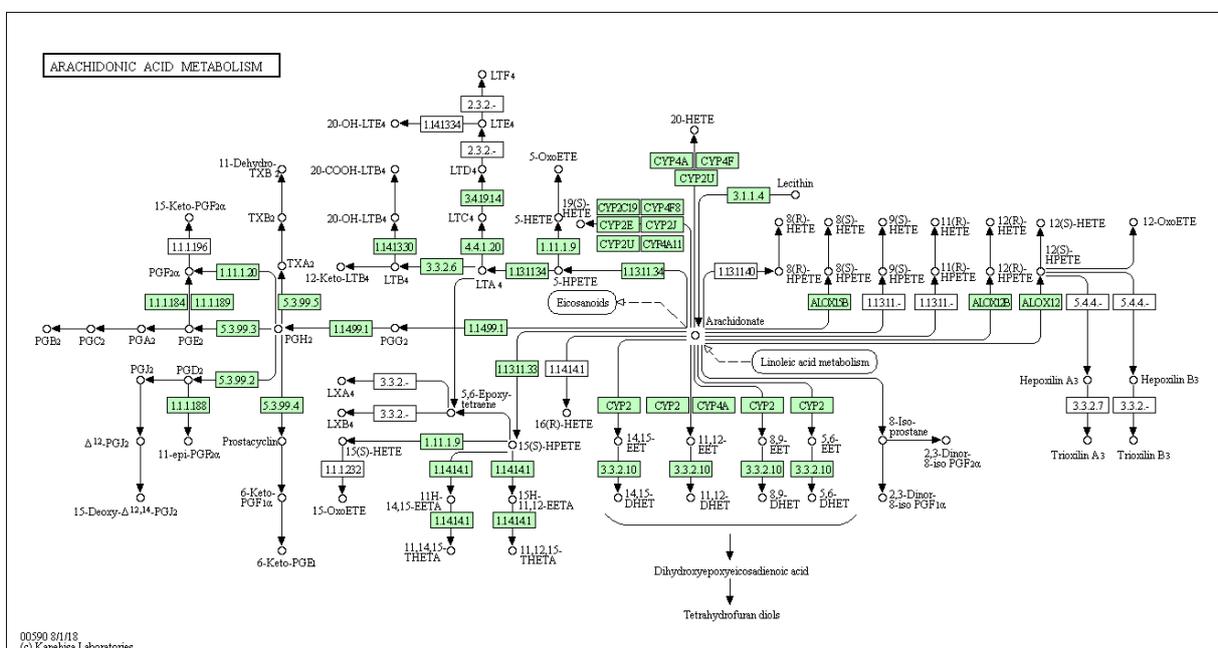


Figura 38 A rede metabólica do metabolismo do ácido araquidônico. A rede mostra a via de maneira global, as setas representam relações subordinadas. As caixas verdes correspondem a enzimas com função e estrutura descrita detalhadamente no banco de dados. Fonte: KEGG.

Com auxílio do *Metaboloanlyst* também possível estabelecer quais são os metabólitos alterados nas vias destacadas. A tabela 13 abaixo descreve os

metabólitos, discriminando no grupo e na via na qual estão alterados. Todas as análises foram realizadas com o grupo de DP em relação aos doadores saudáveis (controle).

Tabela 13 Metabólitos alterados, suas respectivas vias o qual fazem parte e grupo de estadiamento que se originaram. Os metabólitos alterados foram identificados a partir da análise do *Metaboloanalyst* de acordo com a via alterada e o grupo de estadiamento de origem. Todas as análises foram realizadas *in silico* além de sempre confrontadas com o grupo controle (doadores saudáveis)

Leve	Moderado	Avançado
Metabolismo do glicerofosfolípídeo	Biossíntese de hormônios esteroidais	Metabolismo do ácido araquidônico
Metabólitos	Metabólitos	Metabólitos
Fosfatidiletanolamina	Deoxcorticosterona	Ácido 5,6-Epoxi-8,11,14-eicosatrienoico
Fosfatidilcolina	11a-Hidroxiprogesterona	Ácido 8,9-Epoxieicosatrienoico
PA(16:0/16:0)	17-Hidroxiprogesterona	Ácido 11,12-Epoxieicosatrienoico
	11b-Hidroxiprogesterona	16(R)-HETE
	Aldosterona	Ácido 20-Hydroxieicosatetraenoico
	Cortisona	19(S)-HETE
	Estradiol	Fosfatidylcholina
	17a-Estradiol	15(S)-HETE
		5-HETE

5.2.2.4 análise metabolômica de exossomos de plasma de pacientes com doença de parkinson

A etapa seguinte incluiu a análise metabolômica do conteúdo dos exossomos de plasma de pacientes com DP. Toda a análise seguiu o mesmo racional realizado para as amostras de plasma total. Assim, podemos observar os cromatogramas comparativos entre os grupo e o controle (Figura 39) e os gráficos após a subtração das intensidades das moléculas ($48,26 \pm 1123,63$; Figura 40).



Figura 39 Cromatogramas do pool de exossomos de pacientes com Doença de Parkinson. Perfil cromatográfico comparativo do grupo doente (linha vermelhas) e grupo controle (linhas azuis). Os cromatogramas foram analisados em LC-HRMS.

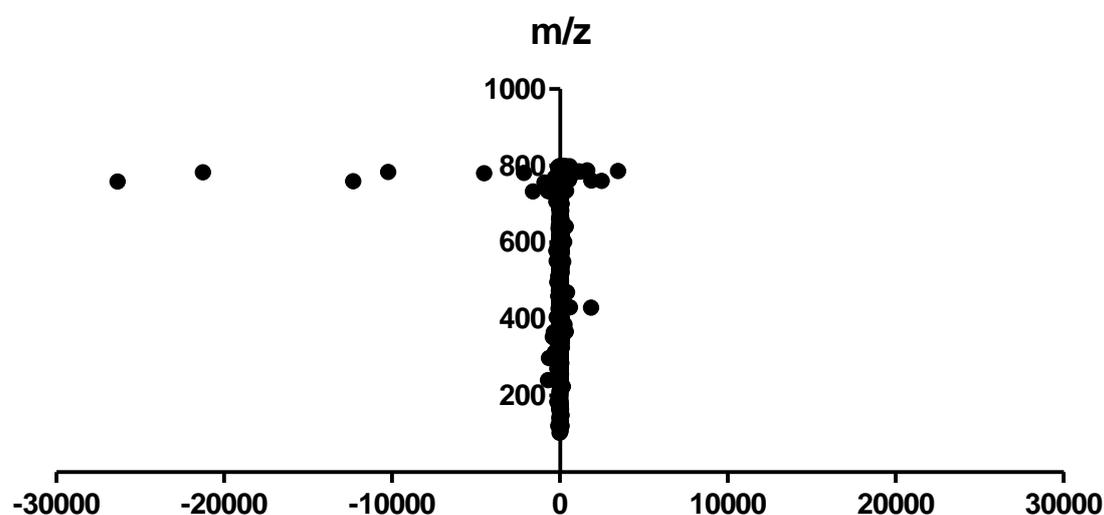


Figura 40 Perfil de subtração das intensidades das moléculas dos exossomos do grupo com doença de Parkinson pelo controle. Cada spot representa uma molécula ($-48,26 \pm 1123,63$). O lado direito representa as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo doente e o lado esquerdo, as moléculas exclusivas e/ou mais intensas para o grupo controle.

As moléculas exclusivas e estatisticamente diferentes foram utilizadas para se fazer a análise *in silico* no MetaboAnalyst 3.0. Assim, a via metabólica que se mostrou alterada foi a do metabolismo de glicerofofolípídeo (Figura 34), como pode ser observado através da figura 41, que ilustram vias alteradas.

É interessante destacar que alterações na via do metabolismo de glicerofofolípídeo está fortemente relacionada tanto com o conteúdo de exossomos na DP, quanto com o grupo de estadiamento leve da doença quando livre no plasma, ressaltando a importância dessa via no estudo da doença.

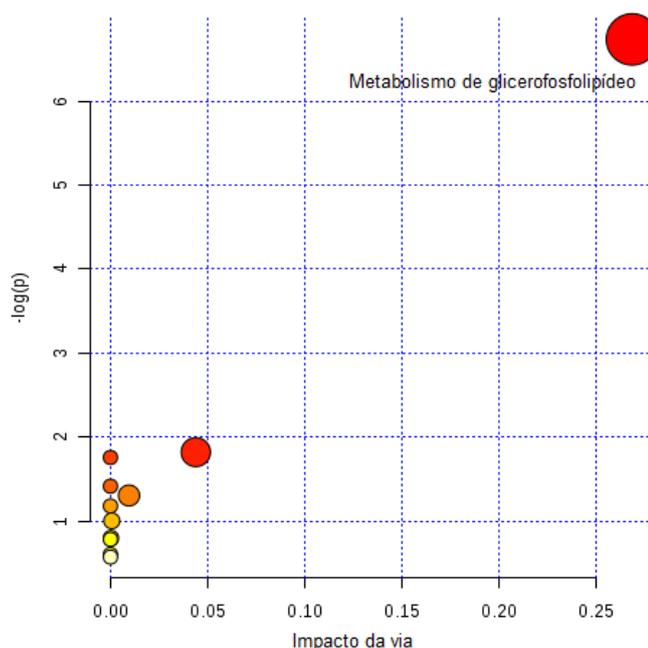


Figura 41 Mecanismo metabólico entre os metabólitos exclusivos e mais intensos no exossomos de plasma de pacientes com DP. A análise das vias foi conduzida entre os metabólitos mais intensos e exclusivos para a coorte. As vias com cores mais escuras e círculos maiores representam maior relevância para a DP. Ou seja, mais metabólitos envolvidos na via em questão estão com a expressão aumentada no grupo de estadiamento avançado da DP. A via de metabolismo de glicerofosfolípideo possui mais metabólitos alterados e por isso foi destacada.

Também foram estabelecidos os metabólitos alterados nas via destacada, relativo ao conteúdo exossomal. A tabela 14 abaixo descreve esses metabólitos. Todas as análises foram realizadas com o grupo de DP em relação aos doadores saudáveis (controle).

Tabela 14 Metabólitos alterados, sua respectiva via o qual fazem parte no estudo metabolômico do conteúdo exossomal de plasma de pacientes com DP. Os metabólitos alterados foram identificados a partir da análise do *Metaboloanalyst* de acordo com a via alterada a de origem. Todas as análises foram realizadas *in silico* além de sempre confrontadas com o grupo controle (doadores saudáveis).

Conteúdo exossomal

Metabolismo do glicerofosfolípideo

Metbólitos

Fosfatidiletanolamina

Fosfatidilcolina

PS(16:0/16:0)

LysoPC(18:1(9Z))

É importante destacar que, mesmo que a essa a via tenha se destacado no estudo do plasma total para o grupo leve e para o estudo do conteúdo exossomal, algumas

moléculas se repetem nas duas análises (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e PS(16:0/16:0)), enquanto outra – LysoPC(18:1(9z)) – só foi vista alterada no estudo do conteúdo exossomal, como pode ser observado pela comparação das tabelas 13 e 14. Isso reforça para o fato de haver necessidade de confirmação não só para o via metabólica envolvida no desenvolvimento da doença, quanto para os metabólitos relacionados na busca de um potencial biomarcador.

Sabe-se que a metabolômica é a análise da coleção de pequenas moléculas encontradas em um sistema, como glicose, colesterol, neurotransmissores, lipídios e muitas outras classes de substâncias. (KRISTAL, 2005). A identidade e a concentração dos metabólitos representa o produto final da interação entre expressão gênica, transcrição e tradução de proteínas nas células. Além disso, a informação da metabolômica complementa os dados obtidos de outras metodologias (genômica, transcriptômica e proteômica), agregando informações cruciais para o entendimento da fisiopatologia da doença, identificação de biomarcadores e mecanismo de ação da droga (KADDURAH-DAOUK *et al.*, 2008; KRISTAL *et al.*, 2007; LINDON *et al.*, 2004; HOLMES *et al.*, 2008; WISHART 2008). Em contraste com as abordagens que se concentram em apenas um metabólito específico, a metabolômica envolve uma ampla coleção de metabólitos visando uma compreensão geral do metabolismo associado às condições de interesse (KADDURAH-DAOUK *et al.*, 2008; KRISTAL *et al.*, 2007; LINDON *et al.*, 2004; WISHART 2008).

Nosso estudo mostra de maneira inédita e exclusiva alteração na via do metabolismo da biossíntese de glicerofosfolípideo, ácido araquidônico estando relacionada com a DP quando estratificada de acordo com a escala de estadiamento H&Y. Além disso, nunca na literatura foi sequer avaliado o perfil metabólico de exossomo de pacientes com DP, estando o metabolismo de glicerofosfolípideo pela primeira vez descrito relacionado a esse tipo de amostra e patologia.

Para o metabolismo dos glicerofosfolípideos, existem duas vias, um para a outra em direção a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Os glicerofosfolípídios são geralmente metabolizados em várias etapas com diferentes intermediários. O primeiro passo neste metabolismo envolve a adição ou transferência das cadeias de ácidos graxos para o esqueleto de glicerol para formar o primeiro intermediário, o ácido lisofosfatídico. O ácido lisofosfatídico então é acilado para formar o ácido fosfatídico intermediário. A ácido fosfatídico intermediário pode ser desfosforilado levando à formação de diacilglicerol, que é essencial na síntese da fosfatidilcolina (ECKER e

LIEBISCH, 2014). A fosfatidilcolina é uma das muitas espécies de glicerofosfolípídeos. Em uma via chamada de Kennedy, as cabeças polares são adicionadas para completar a formação de toda a estrutura nas duas cadeias de ácidos graxos e no grupo fosfato ligado à estrutura do glicerol. Nessa via de Kennedy, a colina é convertida em CDP-colina, que impulsiona a transferência dos grupos de cabeças polares para completar a formação da fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina pode então ser convertida em outras espécies de glicerofosfolípídeos, como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (ECKER e LIEBISCH, 2014).

O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia de 20 carbonos com 4 ligações duplas, é um constituinte integral da membrana celular biológica, conferindo-lhe fluidez e flexibilidade. As quatro ligações duplas do ácido araquidônico predisõem à sua oxigenação que leva a formação de metabólitos de considerável importância para o funcionamento adequado do sistema imunológico, promoção de alergias e inflamação, resolução de inflamação, humor e apetite (HANNA; HAFEZ, 2018).

Nas células em repouso, o ácido araquidônico está presente nos fosfolípidos (especialmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina) das membranas das células do corpo e é particularmente abundante no cérebro. Tipicamente, um evento dependente do receptor, requerendo uma proteína G transdutora, inicia a hidrólise dos fosfolípidos e liberta o ácido graxo no meio intracelular. Três enzimas medeiam essa reação de desacilação, incluindo fosfolipase A2, fosfolipase C e fosfolipase D. Uma vez liberado, o araquidonato livre possui três possíveis destinos: reincorporação aos fosfolípidos, difusão fora da célula e metabolismo. O metabolismo do araquidonato é realizado por três classes distintas de enzimas: ciclooxigenases, lipoxigenases e citocromo p450. Especificamente, as enzimas ciclooxigenase e peroxidase levam à síntese da prostaglandina H₂, que por sua vez é usada para produzir as prostaglandinas, a prostaciclina e os tromboxanos. A enzima 5-lipoxigenase leva a 5-HPETE, que por sua vez é usado para produzir os leucotrienos, ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETEs) e lipoxinas. Parte do ácido araquidônico é convertido em HETEs de cadeia média, HETEs de cadeia ômega, ácidos diidroieicosatrienóico (DHETs) e ácidos epoxieicosatrienóico (EETs) pela atividade da hidroxilase da citocromo P450 epoxigenase. Diversos produtos dessas vias atuam dentro dos neurônios para modular as atividades de canais iônicos, proteínas quinases, bombas de íons e sistemas de captação de neurotransmissores, afetando processos como proliferação

celular, inflamação e hemostasia. Os eicosanóides recém-formados também podem sair da célula de origem e se ligar aos receptores acoplados à proteína G presentes nos neurônios próximos ou nas células da glia (LEHNINGER, 2005; VANCE; VANCE, 2002; SALWAY, 2004; KROETZ; ZELDIN, 2002; ZELDIN, 2001; ONDREY, 1998; SIGAL, 1991).

Diferentes perfis metabólicos já foram detectados entre controles e pacientes com DP. Empregando a metabolômica, foram encontradas alterações em vias de metabolismo de purina (JOHANSEN *et al.*, 2009; LEWITT *et al.*, 2017), homeostase de estresse oxidativo (LEWITT *et al.*, 2013; BOGDANOV *et al.*, 2008, HATANO *et al.*, 2016), metabolismo energético (glicólise e ciclo do ácido cítrico; TRUPP *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2009; WUOLIKAINEN *et al.*, 2016), metabolismo de ácidos graxos (TRUPP *et al.*, 2014; BURTE *et al.*, 2017; LUAN *et al.*, 2015a; LEWITT *et al.*, 2017), aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina; TRUPP *et al.*, 2014; WUOLIKAINEN *et al.*, 2016), metabolismo de fenilalanina e tirosina (HATANO *et al.*, 2016, LUAN *et al.*, 2015a, LUAN *et al.*, 2015b; LEWITT *et al.*, 2017), metabolismo de triptofano (LEWITT *et al.*, 2013; TRUPP *et al.*, 2014; HATANO *et al.*, 2016, LUAN *et al.*, 2015a, LUAN *et al.*, 2015b), derivação de glicina e esteroidogênese (LUAN *et al.*, 2015a, LUAN *et al.*, 2015b) – corroborando com os nossos resultados. Correlações com a progressão da DP foi relacionada a alterações em metabolismo de fenilalanina, purinas e ácidos graxos, serina (LEWITT *et al.*, 2017), poliaminas (ROEDE *et al.*, 2013) e metabolismo de triptofano via das quinureninas na urina (LUAN *et al.*, 2015a, LUAN *et al.*, 2015b), em plasma e líquido (HAVELUND *et al.*, 2017).

Recentemente, amostras de soro foram coletadas de 35 indivíduos com DP idiopática, sem demência, e 15 controles saudáveis, pareados por idade com DP. Esta análise utilizou uma combinação de três plataformas independentes: cromatografia líquida de ultra-alta performance/espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS) otimizada para espécies básicas, UPLC-MS/MS otimizada para espécies ácidas e GC-MS. Os perfis metabolômicos da DP eram claramente diferentes daqueles dos controles normais: os perfis de DP apresentavam níveis significativamente mais baixos de triptofano, cafeína e seus metabólitos, bilirrubina e ergotioneína, e níveis significativamente mais altos de metabólitos e biliverdina de levodopa do que os dos controles normais (HATANO, *et al.*, 2016).

Em outro estudo conduzido na China, 28 pacientes com DP e 18 indivíduos saudáveis tiveram seu plasma coletado para usar uma abordagem metabolômica

baseada em LC-MS. Dezesete metabólitos com níveis significativamente alterados foram encontrados e a análise da rede metabólica foi realizada. As vias metabólicas envolvidas foram associadas à biossíntese de tirosina, metabolismo de fosfolípidos de glicerol, metabolismo de carnitina e biossíntese de ácidos biliares. Essas alterações metabólicas anormais no plasma de pacientes com DP estavam relacionadas principalmente ao metabolismo lipídico e à função mitocondrial (ZHAO *et al.*, 2018).

A presença desses resultados heterogêneos em relação aos grupos de pesquisa reforçam a importância de novos estudos metabolômicos em pacientes com DP para que as vias metabólicas possam ser validadas e os biomarcadores definidos.

5.3 ANÁLISE DE RNA LNC DE EXOSSOMOS ENRIQUECIDOS DE PLASMA DE PACIENTES COM DP

Dando continuidade ao processo de caracterização do conteúdo molecular de exossomal de pacientes com DP e com o objetivo de identificar os RNA lnc presentes em exossomos desses pacientes, foram utilizados ensaios de RT-qPCR com primers desenvolvidos para RNA lnc anteriormente descritos. As análises foram realizadas em *pool* para o grupo controle e doente. No total, 8 RNA lnc amplificaram de 90 do kit, como pode ser observado pela análise da tabela 15.

Tabela 15 RNA's longos não codificantes de exossomos de sangue periférico de pacientes com DP diferencialmente expressos em relação ao controle. Os círculos verdes representam amplificação e os círculos vermelhos ausência de amplificação e, portanto ausência de diferença de expressão em relação ao controle.

RNAs longos não codificantes	Controle n=36	Pacientes n=101
Alpha250	● 32,125	●
Anti-NOS2A	● 38,145	● 36,253
AntiPeg11	● 38,924	● 37,853
E2F4antisense	● 33,125	●
HOTAIR	● 36,952	● 35,216
lincRNA-RoR	●	● 39,741
lincRNA-SFMBT2	●	● 35,324
lincRNA-VLDLR	● 32,202	● 31,927

Foram encontrados 2 RNA lnc exclusivos para o grupo doente (lincRNA-RoR e lincRNA-SFMBT2), 2 exclusivos para o grupo controle (Alpha250 e E2F4antisense) e 4 RNA lnc que amplificaram em ambos os grupos estudados (Anti-NOS2A, AntiPeg11, HOTAIR, lincRNA-VLDLR), como pode ser observado pela análise do diagrama de Venn (Figura 43).

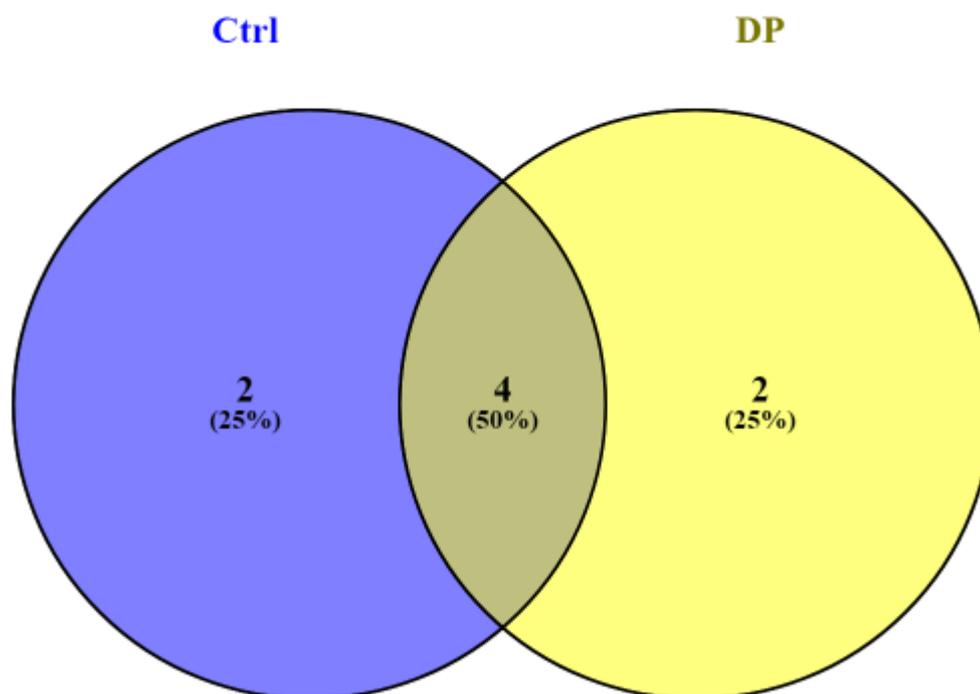


Figura 42 Diagrama de Venn comparando RNAi nc expressos para o grupo com DP e controle. Ctrl: grupo controle. DP: Grupo com Doença de Parkinson. Todas as análises foram realizadas com um *pool* de amostra.

Após análise *in silico* pode ser observado que três dos RNAi nc amplificados em pelo menos um dos grupos (HOTAIR, lincRNA-RoR e SAF) possui análise de interação descrita para a espécie humana. HOTAIR interage com fatores de transcrição (REST, RCOR1 e HIF1A), proteínas (EZH2, H3F3A, EED, SUZ12, KDM1A, BRD4, CTNNB1, CREBBP, EP300, KMT2A, KMT2D, KMT2C, E7), DNA (WIF1) ou outras moléculas de RNA (MIR193A, MIR33A, MIR326) por ligação ou por regulação (fatores de transcrição: STAT3; proteínas: VIM, PCPB1 e RBM38; outras moléculas de RNA: MIR218-1, MIR218-2 e BMI1), como pode ser observado na figura 44.

Também a molécula de RNAi nc lincRNA-RoR interage com fatores de transcrição (NFE2L2, POU5F1, SOX2 e NANOG), proteínas (SCPEP1, MS2, PTBP1 e EZH2) e outras moléculas de RNA (MIR145 e MIR205) tanto por ligação quanto por regulação (fatores de transcrição: POU5F1 e SOX2 e; proteínas: NANOGP8), como pode ser observado pela análise da figura 45.

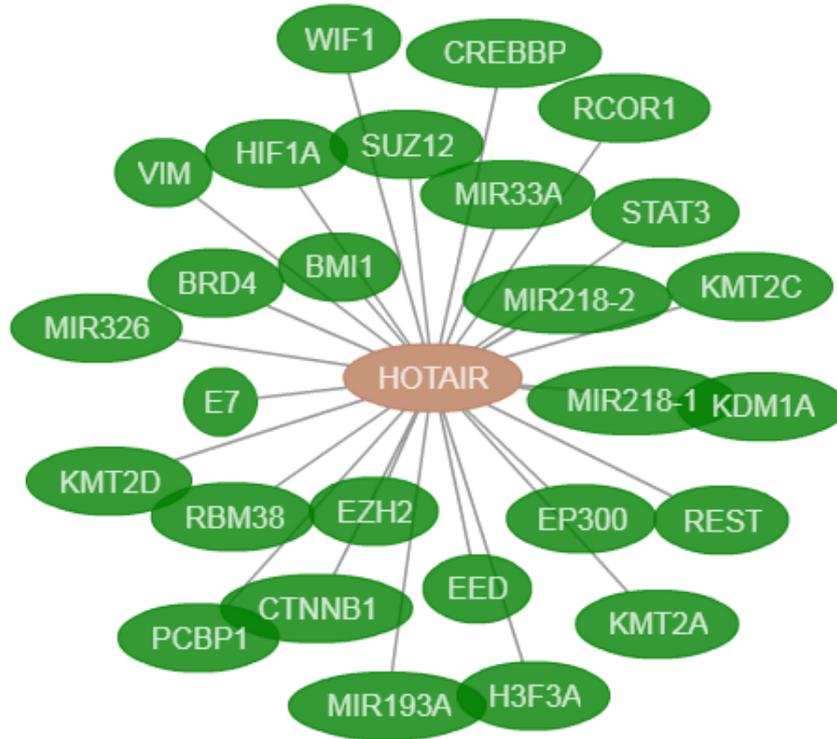


Figura 43 Redes de correlação entre o RNAinc HOTAIR com proteínas, fatores de transcrição e outras moléculas de RNA. O círculo vermelho central representa o RNAinc e os círculos verdes as moléculas de interação (proteínas, fatores de transcrição e/ou outras moléculas de RNA). As linhas azuis representam subordinação.

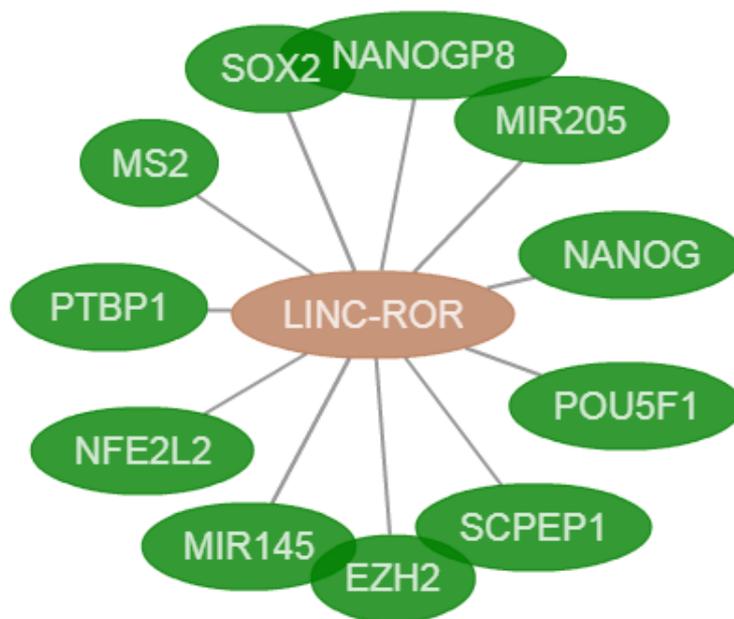


Figura 44 Redes de correlação entre o RNAinc LINC-ROR com proteínas, fatores de transcrição e outras moléculas de RNA. O círculo vermelho central representa o RNAinc e os círculos verdes as moléculas de interação (proteínas, fatores de transcrição e/ou outras moléculas de RNA). As linhas azuis representam subordinação.

Foram identificados 8 moléculas de RNAInc em exossomos de plasma de sangue periférico estando relacionados com a DP. Sendo que HOTAIR já foi descrito na literatura estando superexpressos em amostras de DP, e; Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, lincRNA-RoR, lincRNA-SFMBT2 e lincRNA-VLDLR estão tendo a relação com a doença descrita de maneira inédita e exclusiva.

Os RNAInc já foram relacionados a numerosos processos biológicos, incluindo regulação epigenética, controle do ciclo celular e regulação transcricional da expressão gênica. Expressão diferencial de RNAInc e interrupção dos processos regulatórios são reconhecidos como etapas críticas no desenvolvimento do câncer e de doenças neurodegenerativas (SUSLUER et al., 2018; LIU et al., 2016).

Em 2014, Soreq e colaboradores utilizaram técnicas de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) para determinar todas os transcritos em leucócitos em pacientes com DP e no grupo controle. Eles observaram uma diminuição na expressão de RNAInc e indução seletiva de alternância em 13 de mais de 6000 RNAInc leucocitários detectados. Esses pesquisadores também encontraram cinco RNAInc elevados na doença. Os RNAInc candidatos inclui o componente de spliceosome U1, que suporta o ideia de que as modulações de splicing estão envolvidas em doenças.

Numerosos RNAInc foram encontrados em exossomos. Em 2014, Gezer e colaboradores identificaram RNAInc incluindo MALAT1, HOTAIR, lincRNAp21, GAS5, TUG1 e ncRNA-CCND1 em exossomos derivados de carcinomas cervicais e mamários humanos (células HeLa e MCF-7, respectivamente) por RT-qPCR. Cada RNAInc teve diferentes padrões de expressão em exossomos em comparação com as células: lincRNAp21, HOTAIR e ncRNA-CCND1 foram altamente enriquecidos exossomos, mesmo que a sua expressão fosse muito baixa nas células, enquanto a expressão de MALAT1 era muito alta em ambos.

O RNAInc Alpha250 compõe uma família caracterizada por dois RNAs antisense sobrepostos do intron 1 do gene da proteína ribossômica humana 14 (Rps14) e foram identificados pelo ensaio de proteção de RNase. Essa análise foi realizada utilizando extratos celulares e indicou o tamanho de 250 nucleotídeos, que valeu o nome da molécula. Os transcritos terminam no mesmo nucleotídeo, portanto o alfa-250 sobrepõe o alfa-280, o outro componente da família, ao longo de todo o seu comprimento. Foram encontrados sendo ubiquitariamente expressos em tecidos humano e células estudadas, estando quase exclusivamente presente no citoplasma celular (TASHEVA; ROUFA, 1995).

Em relação a sua função, ele regula a transcrição de Rps14. Cada molécula de RNA interage com o locus gênico de Rps14 e estimula sua expressão. Cada RNAInc é transcrito através de um *enhancer* conhecido com capacidades putativas de ligação ao fator de transcrição, sugerindo que esse *enhancer* pode ser o RNA transcrito, o que poderia estar recrutando fatores de transcrição para o gene Rps14 (TASHEVA *et al.*, 1995).

Anti-NOS2A é um RNA com tamanho estimado em 1,9kb. O anti-NOS2A tem homologia com o gene codificador da proteína NOS2A (enzima óxido nítrico sintetase 2) e apenas uma pequena parte de aproximadamente 100 nucleotídeos é antisenso para NOS2A. Formado por duplicação parcial de NOS2A seguido de uma inversão de parte da sequência duplicada para formar um locus de 4kb em humanos. Já foi descrito expresso em células de glioblastoma e meningioma de um locus genômico que evoluiu por duplicação do gene NOS2A seguido por inversão interna de DNA (KORNEEV *et al.*, 2008).

AntiPeg11 tem sua expressão restrita, principalmente, a embriões e cérebro adulto. No cérebro, foi expresso em um nível mais alto do que Peg11 (HAGAN *et al.*, 2009). Sua transcrição completa e não processada estava em torno de 5kb, mas também aparece como espécies menores, provavelmente processadas (HAGAN, 2009). Em relação a sua função, o RNAInc antiPeg11 liga-se ao complexo de modificação da cromatina do complexo repressivo Polycomb 2 (ZHAO *et al.*, 2010).

O RNAInc E2F4antisense foi identificado através da técnica de análise serial da ocupação da cromatina em células de carcinoma colorretal. Foi proposto que a sinalização de Wnt/ β -catenina pode contribuir para a carcinogênese colorretal, reduzindo o nível de células com o repressor de ciclo E2F4 através de um mecanismo antisenso. A sinalização Wnt induz o acúmulo nuclear de β -catenina e transcrição de genes alvo específicos através da ligação de proteínas ao DNA. Embora todos os genes-alvo da β -catenina conhecidos codifiquem proteínas, os estudos de perfis de RNA genômicos indicam que muitas transcrições não têm essa capacidade. Foi observado que ambos β -catenina e proteínas de ligação ao DNA se ligam ao sítio E2F4 3-UTR *in vivo*, induzindo expressão de um transcrito antisenso de E2F4 (YOCHUM *et al.*, 2006).

HOTAIR já foi descrito expresso em fibroblastos posteriores e distais (RINN *et al.*, 2007). Seu nível de expressão no câncer é um preditor eficiente de metástase e sobrevida com altos níveis de expressão preditivos de resultados ruins (GUPTA *et al.*,

2010). Também em pacientes com câncer colorretal estágio IV, os níveis de expressão HOTAIR foram maiores em tecidos cancerosos do que em tecidos não cancerosos, com expressão fortemente correlacionada com a presença de metástase hepática e associada a mau prognóstico (KOGO *et al.*, 2011).

Algumas transcrições de HOTAIR se localizam no núcleo celular (KHALIL *et al.*, 2009). O transcrito revelou-se bastante instável com uma meia-vida de 4 horas em células Hela (TANI *et al.*, 2012). Originalmente identificado como silenciador do *locus* HoxD, e desde então foi descoberto que a expressão gênica leva a silenciamento epigenético em muitos locais do genoma pelo recrutamento de complexos modificadores da cromatina repressiva (RINN *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2010).

Como oncogene ele regula a progressão metastática (GUPTA *et al.*, 2010; SCHORDERET; DUBOULE, 2011) e está desregulado no câncer de mama com superexpressão frequente em metástases. Além disso, já foi descrito estando relacionado com a DP, atuando, principalmente, pela indução de MPTP através da regulação da expressão de LRRK2 (LIU *et al.*, 2016).

lincRNA-RoR está enriquecido em CEE (células estaminais embrionárias) e iPSCS (células estaminais pluripotentes induzidas) em comparação com os fibroblastos e células CD34 das quais as iPSC foram derivadas, estando mais altamente expresso em iPSCs do que as CEEs. Possui um local de ligação para os fatores de transcrição de pluripotência Oct4, Sox2 e Nanog. Sugere-se que a sua expressão é controlada por esses fatores de transcrição (LOEWER *et al.*, 2010).

Em relação à sua função, já foi descrito que ele pode promover a reprogramação de células diferenciadas para iPSCs. Seu *knockdown* diminuiu o número de colônias de CEEs formadas sem afetar o número de células. Enquanto sua superexpressão aumentou o número de colônias de iPSC formadas. Além disso, atua em funções na manutenção de CEEs e iPSCs, quando em *knockdown* leva a um modesto aumento na apoptose e ativação das vias do p53 (LOEWER *et al.*, 2010).

lincRNA-SFMBT2 já foi descrito com expressão aumentada em pacientes com hepatic B quando comparado com pessoas saudáveis (SUSLUER *et al.*, 2018). Além disso, este RNAInc foi encontrado enriquecido tanto em CEEs quanto em iPSCs, em comparação com as células fibroblastos e CD34, mas com um aumento no nível de iPSCs em comparação com as CEEs, o que sugere seu papel potencial na reprogramação. No entanto, o seu *knockdown* não afetou a geração de células iPSCs, sugerindo que não é essencial para este processo. Ele abriga o local de ligação para

os fatores de transcrição de pluripotência Oct4, Sox2 e Nanog. O *knockdown* de Oct4 ou a diferenciação de células-tronco causaram a regulação negativa da expressão de lincRNA-SFMBT2, sugerindo que a expressão é controlada por esses fatores de transcrição (LOEWER *et al.*, 2010).

lincRNA-VLDLR já foi observado estando enriquecido em CEEs e iPSCs em comparação com os fibroblastos e células CD34 das quais as iPSC foram derivadas. Também mais altamente expresso em iPSCs do que as CEEs. Possui um local de ligação para os fatores de transcrição de pluripotência como Oct4, Sox2 e Nanog. O *knockdown* de Oct4 ou a diferenciação de células estaminais causou uma modesta regulação negativa na sua expressão. Assim, sugere-se que a sua expressão seja controlada por esses fatores de transcrição (LOWER *et. al.*, 2010).

6. PERSPECTIVAS

- Quantificar a α -sinucleína de exossomos de plasma de pacientes com DP e doadores saudáveis individualmente;
- Avaliar a correlação da α -sinucleína exossomal com as escalas de estadiamento H&Y, SE e com o MEEM;
- Avaliar a performance da α -sinucleína exossomal como potencial biomarcador diagnóstico pela análise da curva ROC;
- Avaliar o efeito de oligomerização e agregação da α -sinucleína pelos ensaios de BiFC e pelo modelo baseado na co-expressão de SynT e Sph1, respectivamente, induzido pelos exossomos de pacientes com quantidades maiores de vesículas (100ul, 500ul e 1ml);
- Marcar os exossomos para que, além dos efeitos de oligomerização e agregação da α -sinucleína, possamos garantir a internalização das vesículas através do *z-stack*.
- Realizar o ensaio de agregação da α -sinucleína *in vitro* para os grupos de estadiamento de DP e controle saudáveis.
- Realizar a fragmentação das moléculas estatisticamente diferente nos grupos de DP em plasma sanguíneo e assim confirmar a via metabólica relacionada na análise *in silico* (metabolismo do glicerofosfolípídeo, biossíntese de valina, leucina e isoleucina e metabolismo do ácido araquidônico);
- Realizar a fragmentação das moléculas estatisticamente diferentes para a DP em relação ao controle em exossomos de plasma sanguíneo e assim confirmar a via metabólica relacionada na análise *in silico* (metabolismo de retinol).
- Avaliar as amostras de pacientes com DP e doadores saudáveis individualmente para que se possa avaliar o papel dessas moléculas como biomarcadores;
- Realizar estudos de interação de proteínas com os RNAInc relacionados com a DP encontrados por nós, para auxiliar na determinação do papel deles na doença.

7. CONCLUSÃO

- A quantidade de α -sinucleína é maior em exossomos de plasma sanguíneo de pacientes com DP quando comparados com doadores saudáveis; porém é estatisticamente igual livre no plasma sanguíneo entre pacientes com DP e doadores saudáveis.
- Exossomos de plasma sanguíneo de pacientes com DP podem induzir a oligomerização e agregação da α -sinucleína através dos modelos BiFC e SynT-Sphn1, respectivamente;
- Após otimizar a metodologia de extração líquido-líquido e validar o método de análise qualitativa por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, observou-se que a via do metabolismo do glicerofosfolípídeo, a biossíntese de valina, leucina e isoleucina, e o metabolismo do ácido araquidônico pode estar diretamente relacionados os estadiamentos leve, moderado e avançado e, conseqüentemente ao desenvolvimento da DP;
- Além disso, o metabolismo de retinol apareceu alterado em amostra de exossomos de plasma de pacientes com DP quando comparados com amostras de doadores saudáveis;
- Os RNAInc Alpha250, Anti-NOS2A, AntiPeg11, E2F4antisense, HOTAIR, lincRNA-RoR, lincRNA-SFMBT2 e lincRNA-VLDLR, encontrados em exossomos de plasma de relacionados com DP, podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença.

8. REFERÊNCIAS

- AHMED, S. S.; SANTOSH, W.; KUMAR, S. and CHRISTLET, H. T. Metabolic profiling of Parkinson's disease: Evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. **J. Biomed. Sci.**, v. 16, jul. 2009.
- ALEGRE-ABARRATEGUI, J. and WADE-MARTINS, R. Parkinson disease, LRRK2 and the endocytic-autophagic pathway. **Autophagy**, v. 5, n. 8, p. 1208–1210, nov. 2009.
- AL-NIMER, M. S.; MSHATAT, S. F. and ABDULLA, H. I. Saliva alpha-Synuclein and A High Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of Parkinson's Disease. **N Am J Med Sci**, v. 6, n. 12, p. 633-637, dez. 2014.
- ALVAREZ-ERVITI, L.; SEOW, Y.; SCHAPIRA, A. H.; GARDINER, C.; SARGENT, I. L.; WOOD, M. J.; *et al.* Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 3, p. 360–367, jun. 2011.
- AMARAL, P. P. *et al.* LncRNAdb: A reference database for long noncoding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 146–151, jan. 2011.
- AMER, D. A.; IRVINE, G. B. and EL-AGNAF, O. M. Inhibitors of alpha-synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders. **Exp Brain Res**, v. 173, n. 2, p. 223-233, aug. 2006.
- ANGOT, E.; STEINER, J. A.; HANSEN, C.; LI, J. Y. and BRUNDIN, P. Are synucleinopathies prion-like disorders? **Lancet Neurol**, v. 9, n. 11, p. 1128-1138, nov. 2010.
- ANTONY, P. M. A.; DIEDERICH, N. J.; KRUGER, R. and BALLING, R. The hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 280, n. 23, p. 5981–5993, dez. 2013.
- ASTASHKINA, A.; MANN, B. and GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacol Ther**, v. 134, n. 1, p. 82-106, abr. 2012.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C.; GUERRA, H. L.; LIMA-COSTA, M. F.; CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800-8, jun. 2006.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, jan. 2004.
- BELLINGHAM, S. A.; GUO, B. B.; COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? **Front Physiol**, v. 3, maio 2012.
- BOBRIE, A.; COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, v. 12, n. 12, p. 1659–1668, dez. 2011.
- BOGDANOV, M.; MATSON, W. R.; WANG, L.; MATSON, T.; SAUNDERS-PULLMAN, R.; BRESSMAN, S.S. and FLINT BEAL, M. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, n. Pt2, p. 389–396, fev. 2008.

- BRAAK, H.; DE VOS, R. A.; BOHL, J.; and DEL TREDICI, K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. **Neurosci Lett**, v. 396, n. 1, p. 67-72, mar. 2006.
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E. N. and BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, mar-apr. 2003.
- BUJAK, R.; STRUCK-LEWICKA, W.; MARKUSZEWSKI, M. J.; KALISZAN, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 108–120, set. 2015.
- BUJAK, R.; STRUCK-LEWICKA, W.; MARKUSZEWSKI, M. J.; KALISZAN, R.; Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 108–120, set. 2015.
- BURTE, F.; HOUGHTON, D.; LOWES, H.; PYLE, A.; NESBITT, S.; YARNALL, A.; YU-WAI-MAN, P.; BURN, D. J.; SANTIBANEZ-KOREF, M.; HUDSON, G. Metabolic Profiling of Parkinson's Disease and Mild Cognitive Impairment. **Movement Disorders**, v. 32, n. 6, p. 927-932, jun. 2017.
- CAUDLE, W. M.; BAMMLER, T. K.; LIN, Y.; PAN, S. and ZHANG, J. Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. **Expert Rev Neurother.**, v. 10, n. 6, p. 925-942, jun. 2010.
- CAUGHEY, B. and LANSBURY, P. T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 267-298, abr. 2003.
- CERRI, S.; GHEZZI, C.; SAMPIERI, M.; SIANI, F.; AVENALI, M.; DORNINI, G.; ZANGAGLIA, R.; MINAFRA, B. and BLANDINI, F. The Exosomal/Total α -Synuclein Ratio in Plasma Is Associated With Glucocerebrosidase Activity and Correlates With Measures of Disease Severity in PD Patients. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 12, maio 2018.
- CHEN, G. *et al.* LncRNADisease: A database for long-non-coding RNA-associated diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 983–986, jan. 2013.
- CHU, Y.; DODIYA, H.; AEBISCHER, P.; OLANOW, C. W. and KORDOWER, J. H. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. **Neurobiol Dis**, v.35, n. 3, p. 385-398, set. 2009.
- CHUNG, K. K.; ZHANG, Y.; LIM, K. L.; TANAKA, Y.; HUANG, H.; GAO, J.; ROSS, C. A.; DAWSON, V. L. and DAWSON, T. M. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1144–1150, out. 2001.
- COLEMAN, B. M.; and HILL, A. F. Extracellular vesicles—their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 40, p. 89–96, abr. 2015.
- DALLOSSO, A. R. *et al.* Alternately spliced WT1 antisense transcripts interact with WT1 sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer. **RNA**, v. 13, n. 12, p. 2287–99, dez. 2007.

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**, v. 7, n. 42, aug. 2012.

DE ANGELIS, E. C.; MOURÃO, L. F.; FERRAZ, H. B.; BEHLAU, M. S.; PONTES, P. A. L., ANDRADE, L. A. F. Effect of voice rehabilitation on oral communication of Parkinson's disease patients. **Acta Neurol Scand**, v. 96, n. 4, p. 199-205, out. 1997.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p.525-35, jun. 2006.

DELENCLOS, M.; TRENDAFILOVA, T.; MAHESH, D.; BAINE, A. M.; MOUSSAUD, S.; YAN, I. K.; PATEL, T. and MCLEAN, P. J. Investigation of Endocytic Pathways for the Internalization of Exosome-Associated Oligomeric Alpha-Synuclein. **Front. Neurosci.**, v. 11, mar. 2017.

DI MONTE, D. A.; LAVASANI, M. and Manning-Bog, A. B. Environmental factors in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 4-5, p. 487-502, out. 2002.

DIAS, D. A.; JONES, O. A.; BEALE, D. J.; BOUGHTON, B. A.; BENHEIM, D.; KOUREMENOS, K. A.; WOLFENDER, J. L.; WISHART, D. S. Current and future perspectives on the structural identification of small molecules in biological systems. **Metabolites**, v. 6, n. 4, 46, 2016.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 6, p. 329-339, maio 2012.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A. and STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 237-1244, ago. 1988.

*ECKER, J.; LIEBISCH, G. Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. **Progress in Lipid Research**, v. 54, p. 14–31, abr. 2014.*

EL-AGNAF, O. M.; SALEM, S. A.; PALEOLOGOU, K. E.; COOPER, L. J.; FULLWOOD, N. J.; GIBSON, M. J.; CURRAN, M. D.; COURT, J. A.; MANN, D. M.; IKEDA, S.; COOKSON, M. R.; HARDY, J. and ALLSOP, D. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. **FASEB J**, v. 17, n. 13, p. 1945-1947, ago. 2003.

EL-AGNAF, O. M.; SALEM, S. A.; PALEOLOGOU, K. E.; CURRAN, M. D.; GIBSON, M. J.; COURT, J. A.; SCHLOSSMACHER, M. G. and ALLSOP, D. Detection of oligomeric forms of alphasynuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. **FASEB J**, v. 20, n. 3, p. 419-425, mar. 2006.

EMMANOUILIDOU, E.; MELACHROINOI, K.; ROUMELIOTIS, T.; GARBIS, S. D.; NTZOUNI, M.; MARGARITIS, L. H.; STEFANIS, L.; VEKRELLIS, K. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. **J Neurosci**, v. 30, n. 20, p. 6838–6851, maio 2010.

ENGELENDER, S.; KAMINSKY, Z.; GUO, X.; SHARP, A. H.; AMARAVI, R. K.; KLEIDERLEIN, J. J.; MARGOLIS, R. L.; TRONCOSO, J. C.; LANAHAN, A. A.; WORLEY, P. F.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. and ROSS, C. A. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. **Nat Genet**, v. 22, n. 1, p. 110-114, maio 1999.

- ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nat Ver Genet** , v. 12, n. 12, p. 861–874, nov. 2011.
- FERRAZ, H. B. e BORGES, V. Doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 207-19, 2002.
- FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B.B.; BOSQUESENDRA, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061-7, jul. 2004.
- FEVRIER, B.; VILETTE, D.; LAUDE, H. and RAPOSO, G. Exosomes: a bubble ride for prions? **Traffic**, v. 6, p. 10–17, 2005.
- Fleury, medicina e saúde – Disponível em < <http://www.fleury.com.br/>>. Acesso em 10 de agosto de 2018.
- FORNO, L. S. Neuropathology of Parkinson's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 55, n. 3, p. 259-72, mar. 1996.
- FRÜHBEIS, C.; FROHLICH, D.; KUO, W. P.; AMPHORNRAT, J.; THILEMANN, S.; SAAB, A. S.; *et al.* Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. **PLoS Biol.**, v. 11, n. 7, e1001604, jul. 2013.
- GALLEGOS, S.; PACHECO, C.; PETERS, C.; OPAZO, C. M. and AGUAYO, L. G. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. **Front Neurosci**, v. 9, n. 59, mar. 2015.
- GEORGE, J. M.; JIN, H. WOODS, W. S. and CLAYTON, D. F. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. **Neuron**, v. 15, n. 2, p. 361-372, aug. 1995.
- GEZER, U.; ÖZGÜR, E.; CETINKAYA, M.; ISIN, M.; DALAY, N. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. **Cell Biol Int.**, v. 38, n. 9, p. 1076-1079, set. 2014.
- GHIDONI, R.; BENUSSI, L.; BINETTI, G. Exosomes: the Trojan horses of neurodegeneration. **Med Hypotheses**, v. 70, n. 6, p. 1226–1227, 2008.
- GOETZ, C. G.; POEWE, W.; RASCOL, O.; SAMPAIO, C.; STEBBINS, G. T.; COUNSELL, C.; GILADI, N.; HOLLOWAY, R. G.; MOORE, 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**, v. 19, n. 9, p. 1020-8, jun. 2004.
- GOLDWURM, S.; ZINI, M.; MARIANI, L.; TESEI, S.; MICELI, R.; SIRONI, F.; CLEMENTI, M.; BONIFATI, V. and PEZZOLI, G. Evaluation of LRRK2 G2019S penetrance: relevance for genetic counseling in Parkinson disease. **Neurology**, v. 68, n. 14, p. 1141-1143, abr. 2007.
- GORMAN, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, n. 6a, p. 2263–2280, dez. 2008.
- GUENTHER, M. G. *et al.* A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 77–88, jul. 2007.
- GUPTA, A. and PULLIAM, L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 68, abr. 2014.

- GUPTA, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071–1076, abr. 2010.
- GUPTA, R. A. *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071–1076, abr. 2010.
- GUTTMAN, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 223–227, mar. 2009.
- GUTTMAN, M. *et al.* Ab initio reconstruction of cell typespecific transcriptomes in mouse reveals the conserved multiexonic structure of lincRNAs. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 503–510, maio 2010.
- HAGAN, J. P.; O'NEILL, B. L.; STEWART, C. L.; KOZLOV, S. V.; CROCE, C. M. At least ten genes define the imprinted Dlk1-Dio3 cluster on mouse chromosome 12qF1. **PLoS One**, v. 4, n. 2, e4352, 2009.
- HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 23–32, 2018.
- HANNAFON, B. N. and DING, W. Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 7, p. 14240–14269, jul. 2013.
- HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M. and LANSBURY, P. T. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. **Chem Biol**, v. 4, n. 2, p. 119-125, fev. 1997.
- HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M. and LANSBURY Jr., P. T. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 38, n. 28, p. 8972-8980, 1999.
- HATANO, T.; SAIKI, S.; OKUZUMI, A.; MOHNEY, R.P.; HATTORI, N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 87, n. 3, p. 295–301, mar. 2016.
- HAVELUND, J. F.; ANDERSEN, A. D.; BINZER, M.; BLAABJERG, M.; HEEGAARD, N. H. H., STENAGER, E.; FAERGEMAN, N. J.; GRAMSBERGEN, J. B. Changes in Kynurenine Pathway Metabolism in Parkinson Patients with L-DOPA-Induced Dyskinesia. **J Neurochem.**, v. 142, n. 5, p. 756-766, set. 2017.
- HOLMES, E.; WILSON, I.D.; NICHOLSON, J.K. Metabolic phenotyping in health and disease. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 714-7, set. 2008.
- HUBERT, P.; CECCATO, A.; CHIAP, P.; TOUSSAINT, B.; CROMMEN, J.; **STP Pharma Prat.**, v. 9, 1999.
- HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; KILFORD, L.; LEES, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 55, p. 181-4, mar.1992.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE - Disponível em <censo2010.ibge.gov.br/> Acesso em 9 de agosto de 2018.
- International Standard Organization; General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 2017.

JAKES, R.; SPILLANTINI, M. G. and GOEDERT, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. **FEBS Lett**, v. 345, n. 1, p. 27-32, maio 1994.

JOHANSEN, K. K.; WANG, L.; AASLY, J. O.; WHITE, L. R.; MATSON, W. R.; HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M. F.; BOGDANOV, M. Metabolomic profiling in LRRK2-related parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, e7551, out. 2009.

JOST, W. H. and ECKARDT, V. F. Constipation in idiopathic Parkinson's disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 250, n. 38, p. 681–686, fev. 2003.

JOST, W. H. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 289, p. 69–73, fev. 2010.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S. and WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 653 – 683, 2008.

KAWAMATA, H.; MCLEAN, P. J.; SHARMA, N. and HYMAN, B. T. Interaction of alphasynuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 929-934, maio 2001.

KERPPOLA, T. K.; Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1278-1286, ago. 2006.

KHALIL, A. M.; GUTTMAN, M.; HUARTE, M.; GARBER, M.; RAJ, A.; RIVEA MORALES, D.; THOMAS, K.; PRESSER, A.; BERNSTEIN, B. E.; VAN OUDENAARDEN, A.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; RINN, J. L. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 106, n. 28, p. 11667-72, jul. 2009.

KIM, S.; JEON, B. S.; HEO, C.; IM, P. S.; AHN, T. B.; SEO, J. H.; *et al.* a-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. **FASEB J.**, v. 18, n. 13, p. 1615–1617, out. 2004.

KIM, T. D.; PAIK, S. R.; YANG, C. H. and KIM, J. Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. **Protein Sci**, v. 9, n. 12, p. 2489-2496, dez. 2000.

KIM, T. K. *et al.*, Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. **Nature.**, v. 465, n. 7295, p. 182-7, maio 2010.

KLEIN, C. and WESTENBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 1, p. 1-15, jan. 2012.

KOGO, R.; SHIMAMURA, T.; MIMORI, K.; KAWAHARA, K.; IMOTO, S.; SUDO, T.; TANAKA, F.; SHIBATA, K.; SUZUKI, A.; KOMUNE, S.; MIYANO, S.; MORI, M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. **Cancer Res.**, v. 71, n. 20, p. 6320-6, out. 2011.

KORDOWER, J. H.; CHU, Y.; HAUSER, R. A.; FREEMAN, T. B. and OLANOW, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. **Nat Med.**, v. 14, n. 5, p. 504-506, maio 2008.

- KORDOWER, J. H.; CHU, Y.; HAUSER, R. A.; OLANOW, C. W. and FREEMAN, T. B. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. **Mov Disord**, v. 23, n. 16, p. 2303-2306, dez. 2008.
- KORNEEV, S. A.; KORNEEVA, E. I.; LAGARKOVA, M. A.; KISELEV, S. L.; CRITCHLEY, G.; O'SHEA, M. Novel noncoding antisense RNA transcribed from human *anti-NOS2A* locus is differentially regulated during neuronal differentiation of embryonic stem cells. **RNA**, v. 14, n. 10, p. 2030-2037, out. 2008.
- KOROLCHUK, V.I.; MENZIES, F. M. and RUBINSZTEIN, D.C. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosome systems. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1393–1398, abr. 2010.
- KRISHNAN, S.; CHI, E. Y.; WOOD, S. J.; KENDRICK, B. S.; LI, C.; GARZON-RODRIGUEZ, W.; WYPYCH, J.; RANDOLPH, T. W.; NARHI, L. O.; BIERE, A. L.; CITRON, M. and CARPENTER, J. F. Oxidative dimer formation is the critical rate-limiting step for Parkinson's disease alpha-synuclein fibrillogenesis. **Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 829-837, jan. 2003.
- KRISTAL, B. S.; KADDURAH-DAOUK, R.; BEAL, M.F.; MATSON, W.R.; **Metabolomics: concept and potential neuroscience application**. 3. ed. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Brain Energetics. Integration of Molecular and Cellular Processes. Springer, New York, p. 889 – 912, 2007.
- KRISTAL, B. S.; SHURUBOR, Y.I. Metabolomics: opening another window into aging. **Sci. Aging Knowledge Environ.**, v. 19, n. 26, jun. 2005.
- KROETZ, D. L.; ZELDIN, D. C.; Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 13, n. 3, p. 273-83, Jun. 2002
- KUNADT, M.; ECKERMANN, K.; STUENDL, A.; GONG, J.; RUSSO, B.; STRAUSS, K.; *et al.* Extracellular vesicle sorting of alpha-Synuclein is regulated by sumoylation. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 5, p. 695–713, maio 2015.
- LEE, J.; GIORDANO, S. and ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **Biochem J**, v. 441, n. 2, p. 523–540, jan. 2012.
- LEE, Y.; EL ANDALOUSSI, S.; WOOD, M. J. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. R1, p. R125–R134, out. 2012.
- LEHNINGER, A.L. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H Freeman, 2005
- LEWITT, P. A.; LI, J.; LU, M.; BEACH, T. G.; ADLER, C.H. and GUO, L. The Arizona Parkinson's Disease Consortium. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis. **Mov. Disord.**, v. 28, n. 12, p. 1653–1660, out. 2013.
- LEWITT, P. A.; LI, J.; LU, M.; GUO, L.; AUINGER, P.; Parkinson Study Group, Datatop Investigators. Metabolomic biomarkers as strong correlates of Parkinson disease progression. **Neurology**, v. 88, n. 9, p. 862–869, fev. 2017.

LINDON, J. C.; HOLMES, E. and NICHOLSON, J. Metabolomics and its role in drug development and disease diagnosis. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 4, n. 2, p. 189-199, mar. 2004.

LIU, C.-J.; GAO, C.; MA, Z.; CONG, R.; ZHANG, Q.; GUO, A.-Y. IncRInter: A database of experimentally validated long non-coding RNA interaction. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 44, n. 5, p. 265-268, jan. 2017.

LIU, S.; CUI, B.; DAI, Z. X.; SHI, P. K.; WANG, Z. H.; GUO, Y. Y. Long Non-coding RNA HOTAIR Promotes Parkinson's Disease Induced by MPTP Through up-regulating the Expression of LRRK2. **Curr Neurovasc Res.**, v. 13, n. 2, p. 115-20, 2016.

LOEWER, S.; CABILI, M. N.; GUTTMAN, M.; LOH, Y. H.; THOMAS, K.; PARK, I. H.; GARBER, M.; CURRAN, M.; ONDER, T.; AGARWAL, S.; MANOS, P. D.; DATTA, S.; LANDER, E. S.; SCHLAEGER, T. M.; DALEY, G. Q.; RINN, J. L. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. **Nat Genet.**, v. 42, n. 12, p. 1113-7, dez. 2010.

LUAN, H.; LIU, L. F.; MENG, N.; TANG, Z.; CHUA, K. K.; CHEN, L. L.; SONG, J. X.; MOK, V. C.; XIE, L. X.; LI, M.; CAI, Z. LC-MS-based urinary metabolite signatures in idiopathic Parkinson's disease. **J. Proteome Res.**, v. 14, n. 1, p. 467-478, jan. 2015b.

LUAN, H.; LIU, L. F.; TANG, Z.; ZHANG, M.; CHUA, K. K.; SONG, J. X.; MOK, V. C.; LI, M.; CAI, Z. Comprehensive urinary metabolomic profiling and identification of potential noninvasive marker for idiopathic Parkinson's disease. **Sci. Rep.**, v. 5, set. 2015a.

LUK, K. C.; KEHM, V. M.; ZHANG, B.; O'BRIEN, P.; TROJANOWSKI, J. Q. and LEE, V. M. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. **J Exp Med**, v. 209, n. 5, p. 975-986, maio 2012.

LUKETIC, L.; DELANGHE, J.; SOBOL, P. T.; YANG, P.; FROTTEN, E.; MOSSMAN, K. L.; GAULDIE, J.; BRAMSON, J.; WAN, Y. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5024-5032, out. 2007.

MALEK, N.; SWALLOW, D.; GROSSET, K. A.; ANICHTCHIK, O.; SPILLANTINI, M.; and GROSSET, D. G. a-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease-a systematic review. **Acta Neurol. Scand.**, v. 130, n. 2, p. 59-72, ago. 2014.

MANAGADZE, D. *et al.* Negative correlation between expression level and evolutionary rate of long intergenic noncoding RNAs. **Genome Biol Evol**, v. 3, p.1390-1404, nov. 2011.

MARION, D. An introduction to biological NMR spectroscopy. **Mol. Cell Proteom.**, v. 12, n. 11, p. 3006-3025, nov. 2013.

MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J. T. and SCHELLER, R. H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. **J Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 2804-2815, aug. 1988.

MARTINEZ-VICENTE, M.; TALLOCY, Z.; KAUSHIK, S.; MASSEY, A. C.; MAZZULLI Jr, MOSHAROV, E. V.; HODARA, R.; FREDENBURG, R.; WU, D.-C.; FOLLENZI, A.

- et al.* Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperonemediated autophagy. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 777–788, fev. 2008.
- MATHIVANAN, S.; and Ji, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles importante in intercellular communication. **J Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, set. 2010.
- MATSUMOTO, J.; STEWART, T.; SHENG, L.; LI, N.; BULLOCK, K.; SONG, N.; *et al.* Transmission of a-synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? **Acta Neuropathol. Commun.**, v. 5, n. 1, set. 2017.
- MCLEAN, P. J.; KAWAMATA, H. and HYMAN, B. T. Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. **Neuroscience**, v. 104, n. 3, p. 901-912, 2001.
- MCLEAN, P. J.; KAWAMATA, H. and HYMAN, B. T. Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. **Neuroscience**, v. 104, n. 3, p. 901-912, 2001.
- MECKES Jr., D. G; RAAB-TRAUB, N. Microvesicles and Viral Infection. **J. Virol**, v. 85, n. 24, p. 12844-12854, dez. 2011.
- MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. and SHARMA, P. L. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, jan. 2013.
- MEHTA, S. H.; MORGAN, J. C. and SETHI, K. D. Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology and clinical scales of assessment. **CNS Spectr.**, v. 13, n. 3, p. 6–11, mar. 2008.
- MERCER, T. R. *et al.* Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 2, p. 716–721, jan. 2008.
- MERCER, T. R. *et al.* Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 2, p. 716–721, jan. 2008.
- MONDERER, R. and THORPY, M. Sleep disorders and daytime sleepiness in Parkinson's disease. **Curr. Neurol. Neurosci.**, v. 9, n. 2, p. 173–180, mar. 2009.
- MURRAY, I. J.; MEDFORD, M. A.; GUAN, H. P.; RUETER, S. M.; TROJANOWSKI, J. Q. and LEE, V. M. Synphilin in normal human brains and in synucleinopathies: studies with new antibodies. **Acta Neuropathol**, v. 105, n. 2, p. 177-184, 2003.
- NANBO, A.; KAWANISHI, E.; YOSHIDA, R. and YOSHIYAMA, H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveoladependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. **J. Virol.**, v. 87, n. 18, p. 10334–10347, set. 2013.
- NGOLAB, J.; TRINH, I.; ROCKENSTEIN, E.; MANTE, M.; FLORIO, J.; TREJO, M.; *et al.* Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate a-synuclein pathology. **Acta Neuropathol. Commun.**, v. 5, jun. 2017.
- Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nat. Med.**, v. 19, n. 8, p. 983–997, ago. 2013.

- NORDSTRÖM, A. and LEWENSOHN, R. Metabolomics: Moving to the Clinic. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 4–17, mar. 2010.
- OHNO, S.; ISHIKAWA, A.; KURODA, M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 3, p. 398–401, mar. 2013.
- OLANOW, C. W. and PRUSINER, S. B. Is Parkinson's disease a prion disorder? **PNAS**, v. 106, n. 31, p. 12571-12572, ago 2009.
- OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. **Neurology**, v. 72, n. 4, p.1-136, maio 2009.
- OLIVEROS, J.C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- ONDREY, F. G. Arachidonic acid metabolism: a primer for head and neck surgeons. **Head Neck**, v. 20, n. 4, p. 334-49, jul. 1998.
- OUTEIRO, T. F.; PUTCHA, P.; TETZLAFF, J. E.; SPOELGEN, R.; KOKER, M.; CARVALHO, F.; HYMAN, B. T. and MCLEAN, P. J. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. **PLoS One**, v. 3, n. 4, e1867, 2008.
- OZELIUS, L. J.; SENTHIL, G.; SAUNDERS-PULLMAN, R.; OHMANN, E.; DELIGTISCH, A.; TAGLIATI, M.; HUNT, A. L.; KLEIN, C.; HENICK, B.; HAILPERN, S.M.; *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. **N Engl J Med**, v. 354, n. 4, p. 424–425, jan. 2006.
- PAN-MONTOJO, F.; ANICHTCHIK, O.; DENING, Y.; KNELS, L.; PURSCHE, S.; JUNG, R.; JACKSON, S.; GILLE, G.; SPILLANTINI, M. G.; REICHMANN, H. and FUNK, R. H. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 1, e8762, jan. 2010.
- PARK, S. M.; JUNG, H. Y.; KIM, T. D.; PARK, J. H.; YANG, C. H. and KIM, J. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alphasynuclein, a molecular chaperone. **J Biol Chem**, v. 277, n. 32, p. 28512-28520, ago. 2002.
- PARKINSON, J. An assay on the shaking palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 2002.
- PAULI, A. *et al.* Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. **Genome Res**, v. 22, n. 3, p. 577–591, mar. 2012.
- PAULI, A.; RINN, J. L.; SCHIER, A. F. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 2, p. 136–149, fev. 2011.
- PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, n. 4542, p. 136-144, abr. 1982.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. and JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- QUEK, X. C. *et al.* lncRNADB v2.0: Expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D168–D173, jan. 2015.

QURESHI, I. A.; MATTICK, J. S.; MEHLER, M. F. Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. **Brain Res**, v. 1338, p. 20–35, jun. 2010.

RAMAKER, 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**, v. 17, n. 5, p. 867–876, set. 2002.

RAMIREZ, A.; HEIMBACH, A.; GRUNDEMANN, J.; STILLER, B.; HAMPSHIRE, D.; CID, L.P.; GOEBEL, I.; MUBAIDIN, A.F.; WRIEKAT, A.-L., ROEPER, J., *et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. **Nat Genet**, v. 38, n. 10, p. 1184–1191, set. 2006.

RAPOSO, G. and STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373–383, fev. 2013.

Relatório mundial de envelhecimento e saúde, OMS. 2015.

REY, N. L.; STEINER, J. A.; MAROOF, N.; LUK, K. C., MADAJ, Z.; TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. and BRUNDIN, P. Widespread transneuronal propagation of alpha-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. **J Exp Med**, v. 213, n. 9, p. 1759-1778, ago. 2016.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, n. 5, 2004.

RIBEIRO, C. S.; CARNEIRO, K.; ROSS, C. A.; MENEZES, J. R. and ENGELENDER, S. Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. **J Biol Chem**, v. 277, n. 26, p. 23927-23933, 2002.

RIEK, R.; HORNEMANN, S.; WIDER, G.; BILLETER, M.; GLOCKSHUBER, R. and WUTHRICH, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). **Nature**, v. 382, n. 6587, p. 180-182, jul. 1996.

RINN, J. L.; KERTESZ, M.; WANG, J. K.; SQUAZZO, S. L.; XU, X.; BRUGMANN, S. A.; GOODNOUGH, L. H.; HELMS, J. A.; FARNHAM, P. J.; SEGAL, E.; CHANG, H. Y. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1311-23, jun. 2007.

ROEDE, J. R.; UPPAL, K.; PARK, Y.; LEE, K.; TRAN, V.; WALKER, D.; STROBEL, F. H.; RHODES, S. L.; RITZ, B.; JONES, D. P. Serum metabolomics of slow vs. Rapid motor progression Parkinson's disease: A pilot study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, e77629, 2013.

ROOSTAEE, A.; BEAUDOIN, S.; STASKEVICIUS, A. and ROUCOU, X. Aggregation and neurotoxicity of recombinant alpha-synuclein aggregates initiated by dimerization. **Mol Neurodegener**, v. 8, n. 5, jan. 2013.

RUSSO, I.; BUBACCO, L.; GREGGIO, E. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. **Am J Neurodegener Dis**, v. 1, n. 3, p. 217–225, nov. 2012.

SALTA, E. and DE STROOPER, B. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 2, p. 189–200, fev. 2012.

- Salway, J.G. **Metabolism at a glance**. Alden, Mass.: Blackwell Pub, 2004.
- SARKAR, A.; MITRA, S.; MEHTA, S.; RAICES, R.; WEWERS, M. D. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. **PLoS One**, v. 4, n. 9, e7140, set. 2009.
- SCHORDERET, P.; DUBOULE, D. Structural and functional differences in the long noncoding RNA hotair in mouse and human. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, p. 1–10, maio 2011.
- SERPELL, L. C.; BERRIMAN, J.; JAKES, R.; GOEDERT, M. and CROWTHER, R. A. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 9, p. 4897-4902, abr. 2000.
- SHENG, Z.-H. and CAI, Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 2, p. 77–93, jan. 2012.
- SHI, M.; LIU, C.; COOK, T. J.; BULLOCK, K. M.; ZHAO, Y.; GINGHINA, C.; *et al.* Plasma exosomal a-synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol.**, v. 128, n. 5, p. 639–650, nov. 2014.
- Sieber, B. A. *et al.* Prioritized Research Recommendations from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke Parkinson's Disease 2014 Conference. **Ann Neurol.**, v. 76, n. 4, p. 469-72, out. 2014.
- SIGAL, E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. **Am J Physiol**, v. 260, n. 2 Pt 1, p. L13-28, fev. 1991.
- SIMONS, M. and RAPOSO, G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 4, p. 575–581, ago. 2009.
- SINGLETON, A. B.; FARRER, M. J. and BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. **Mov Disord**, v. 28, n. 1, p. 14–23, jan. 2013.
- SOREQ, L. *et al.* Long non-coding RNA and alternative splicing modulations in Parkinson's leukocytes identified by RNA sequencing. **PLoS Comput Biol**, v. 10, n. 3, e1003517, maio 2014.
- SOUZA, J. M.; GIASSON, B. I.; LEE, V. M. and ISCHIROPOULOS, H. Chaperone-like activity of synucleins. **FEBS Lett**, v. 474, n. 1, p. 116-119, maio 2000.
- STABILE, M.; ANGELINO, T.; CAIAZZO, F.; OLIVIERI, P.; DE MARCHI, N.; DE PETROCELLIS, L.; ORLANDO, P. Fertility in a i(Xq) Klinefelter patient: importance of XIST expression level determined by qRT-PCR in ruling out Klinefelter cryptic mosaicism as cause of oligozoospermia. **Mol Hum Reprod.**, v. 14, n. 11, p. 635-40, nov. 2008.
- STUENDL, A.; KUNADT, M.; KRUSE, N.; BARTELS, C.; MOEBIUS, W.; DANZER, K. M.; *et al.* Induction of a-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Brain**, v. 139, 481–494, 2016.
- SUSLUER, S. Y.; KAYABASI, C.; YELKEN, B. O.; ASIK, A.; CELIK, D.; OKCANOGLU, T. B.; SENGER, S. S.; AVCI, C. B.; KOSE, S. AND GUNDUZ, C. Analysis of long

non-coding RNA (lncRNA) expression in hepatitis B patients. **Bosn J Basic Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 150–161, maio 2018.

SVEINBJORNSDOTTIR, S., The clinical symptoms of Parkinson's disease **J. Neurochem.** v. 139, n. 1, p. 318-324, out. 2016.

SVENSSON, K. J.; CHRISTIANSON, H. C.; WITTRUP, A.; BOURSEAU-GUILMAIN, E.; LINDQVIST, E.; SVENSSON, L. M.; *et al.* Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 24, p. 17713–17724, jun. 2013.

SYKES, E. and EPSTEIN, E. Laboratory measurement of bilirubin. **Clin Perinatol**, v. 17, n. 2, p. 397-416, 1990.

TANI, H.; MIZUTANI, R.; SALAM, K. A.; TANO, K.; IJIRI, K.; WAKAMATSU, A.; ISOGAI, T.; SUZUKI, Y.; AKIMITSU, N. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. **Genome Res.**, v. 22, n. 5, p. 947-56, maio 2012.

Tasheva, E. S. and Roufa, D. J. Regulation of human *RPS14* transcription by intronic antisense RNAs and ribosomal protein S14. **Genes Dev.**, v. 9, n. 3, p. 304-16, fev. 1995.

THÉRY, C.; CLAYTON, A.; AMIGORENA, S. and RAPOSO, G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 3.22.1-3.22.29, abr. 2006.

THYSELL, E.; SUROWIEC, I.; HÖRNBERG, E.; CRNALIC, S.; WIDMARK, A.; JOHANSSON, A. I.; STATTIN, P.; BERGH, A.; MORITZ, T.; ANTTI, H. and WIKSTRÖM, P. Metabolomic Characterization of Human Prostate Cancer Bone Metastases Reveals Increased Levels of Cholesterol. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e14175, dez. 2010.

TIAN, T.; ZHU, Y. L.; ZHOU, Y. Y.; LIANG, G. F.; WANG, Y. Y.; HU, F. H.; *et al.* Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 32, p. 22258–22267, ago. 2014.

TOMLINSON, C. L.; STOWE, R.; PATEL, S.; RICK, C.; GRAY, R.; CLARKE, C. E. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 25, n. 15, p. 2649–53, nov. 2010.

TRAJKOVIC, K.; HSU, C.; CHIANTIA, S.; RAJENDRAN, L.; WENZEL, D.; WIELAND, F.; SCHWILLE, P.; BRUGGER, B.; SIMONS, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1244–1247, fev. 2008.

TRUPP, M.; JONSSON, P.; OHRFELT, A.; ZETTERBERG, H.; OBUDULU, O.; MALM, L.; WUOLIKAINEN, A.; LINDER, J.; MORITZ, T.; BLENNOW, K.; ANTTI, H.; FORSGREN, L. Metabolite and peptide levels in plasma and CSF differentiating healthy controls from patients with newly diagnosed Parkinson's disease. **J. Parkinsons Dis.**, v. 4, n. 3, p. 549–560, 2014.

TSAI, M. *et al.* Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. **Science**, v. 329, n. 5992, p. 689–693, ago. 2010.

- UTSUGI-KOBUKAI, S.; FUJIMAKI, H.; HOTTA, C.; NAKAZAWA, M.; MINAMI, M. MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. **Immunol Let**, v. 89, n. 2–3, p. 125–131, out. 2003.
- VAN DER GREEF, J.; VAN WIETMARSCHEN, H.; VAN OMMEN, B. and VERHEIJ, E. Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 32, p. 399–415, 2013.
- VANCE, D.E. and VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes**. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2002.
- VELLA, L. J.; HILL, A. F. and CHENG, L. Focus on extracellular vesicles: exosomes and their role in protein trafficking and biomarker potential in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, fev. 2016.
- VENDRUSCOLO, M.; KNOWLES, T. P. J. and DOBSON, C. M. Protein Solubility and Protein Homeostasis: A Generic View of Protein Misfolding Disorders **Perspect. Biol.**, v. 3, n. 12, pii: a010454, dez. 2011.
- VINCENT-SALOMON, A.; GANEM-ELBAZ, C.; MANIÉ, E.; RAYNAL, V.; SASTRE-GARAU, X.; STOPPA-LYONNET, D.; STERN, M. H.; HEARD, E. X inactive-specific transcript RNA coating and genetic instability of the X chromosome in BRCA1 breast tumors. **Cancer Res.**, v. 67, n. 11, p. 5134-40, jun.2007.
- VINCIGUERRA, P. and STUTZ, F. mRNA export: An assembly line from genes to nuclear pores. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 16, n. 3, p. 285–292, jun. 2004.
- VIVACQUA, G.; LATORRE, A.; SUPPA, A.; NARDI, M.; PIETRACUPA, S.; MANCINELLI, R.; *et al.* Abnormal salivary total and oligomeric a-synuclein in Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0151156, mar. 2016.
- WALES, P.; PINHO, R.; LAZARO, D. F. and OUTEIRO, T. F. Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n. 4, p. 415-459, 2013.
- WANG, K.C. and CHANG, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs **Mol Cell.**, v. 43, n. 6, p. 904–914, set. 2011.
- WANG, X. *et al.* The long arm of long noncoding RNAs: roles as sensors regulating gene transcriptional programs. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 1, a003756, jan. 2011.
- WANG, X.; YU, S.; LI, F. and FENG, T. Detection of a-synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.**, v. 599, p. 115–119, jul. 2015.
- WILLE, H.; BIAN, W.; MCDONALD, M.; KENDALL, A.; COLBY, D. W.; BLOCH, L.; OLLESCH, J.; BOROVINSKIY, A. L.; COHEN, F. E.; PRUSINER, S. B. and STUBBS, G. Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 40, p. 16990-16995, out. 2009.
- WILLIAMS-GRAY, C. H.; FOLTYNIE, T.; LEWIS, S. J. G. and BARKER, R.A. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease. **CNS Drugs**, v. 20, n. 6, p. 477-505, 2006.

WINNER, B.; JAPPELLI, R.; MAJI, S. K.; DESPLATS, P. A.; BOYER, L.; AIGNER, S.; HETZER, C.; LOHER, T.; VILAR, M.; CAMPIONI, S.; TZITZILONIS, C.; SORAGNI, A.; JESSBERGER, S.; MIRA, H.; CONSIGLIO, A.; PHAM, E.; MASLIAH, E.; GAGE, F. H. and RIEK, R. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 10, p. 4194-4199, mar. 2011.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H. O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. suppl1, p. S1-58, jun. 2011.

WISHART, D. Applications of metabolomics in drug discovery and development. **Drugs RD**, v. 9, n. 5, p. 307-322, 2008.

WISHART, D. S.; JEWISON, T.; GUO, A. C.; WILSON, M.; KNOX, C.; LIU, Y.; DJOUMBOU, Y.; MANDAL, R.; AZIAT, F.; DONG, E.; BOUATRA, S.; SINELNIKOV, I.; ARNDT, D.; XIA, J.; LIU, P.; YALLOU, F.; BJORNDAHL, T.; PEREZ-PINEIRO, R.; EISNER, R.; ALLEN, F.; NEVEU, V.; GREINER, R. and SCALBERT, A. HMDB 3.0 - The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D801-807, jan. 2013.

WISHART, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 15, n. 7, p. 473–484, jul. 2016.

WU, X.; ZHENG, T.; and ZHANG, B. Exosomes in Parkinson's disease. **Neurosci. Bull.**, v. 33, n. 3, p. 331–338, jun. 2017.

WUOLIKAINEN, A.; JONSSON, P.; AHNLUND, M.; ANTTI, H.; MARKLUND, S.L.; MORITZ, T.; FORSGREN, L.; ANDERSEN, P.M.; TRUPP, M. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. **Mol. Biosyst.**, v. 12, n. 4, p. 1287–1298, abr. 2016.

Xia, J. and Wishart, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 55, n. 1, p. 14.10.1-14.10.91, set. 2016.

XIONG, Y.; COOMBES, C. E.; KILARU, A.; LI, X.; GITLER, A. D.; BOWERS, W. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; MOORE, D. J. GTPase activity plays a key role in the pathobiology of LRRK2. **PLoS Genet**, v. 6, n. 4, e1000902, abr. 2010.

YOCHUM, G. S.; CLELAND, R.; MCWEENEY, S. and GOODMAN, R. H. An Antisense Transcript Induced by Wnt/ β -Catenin Signaling Decreases E2F4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 871-878, jan. 2007.

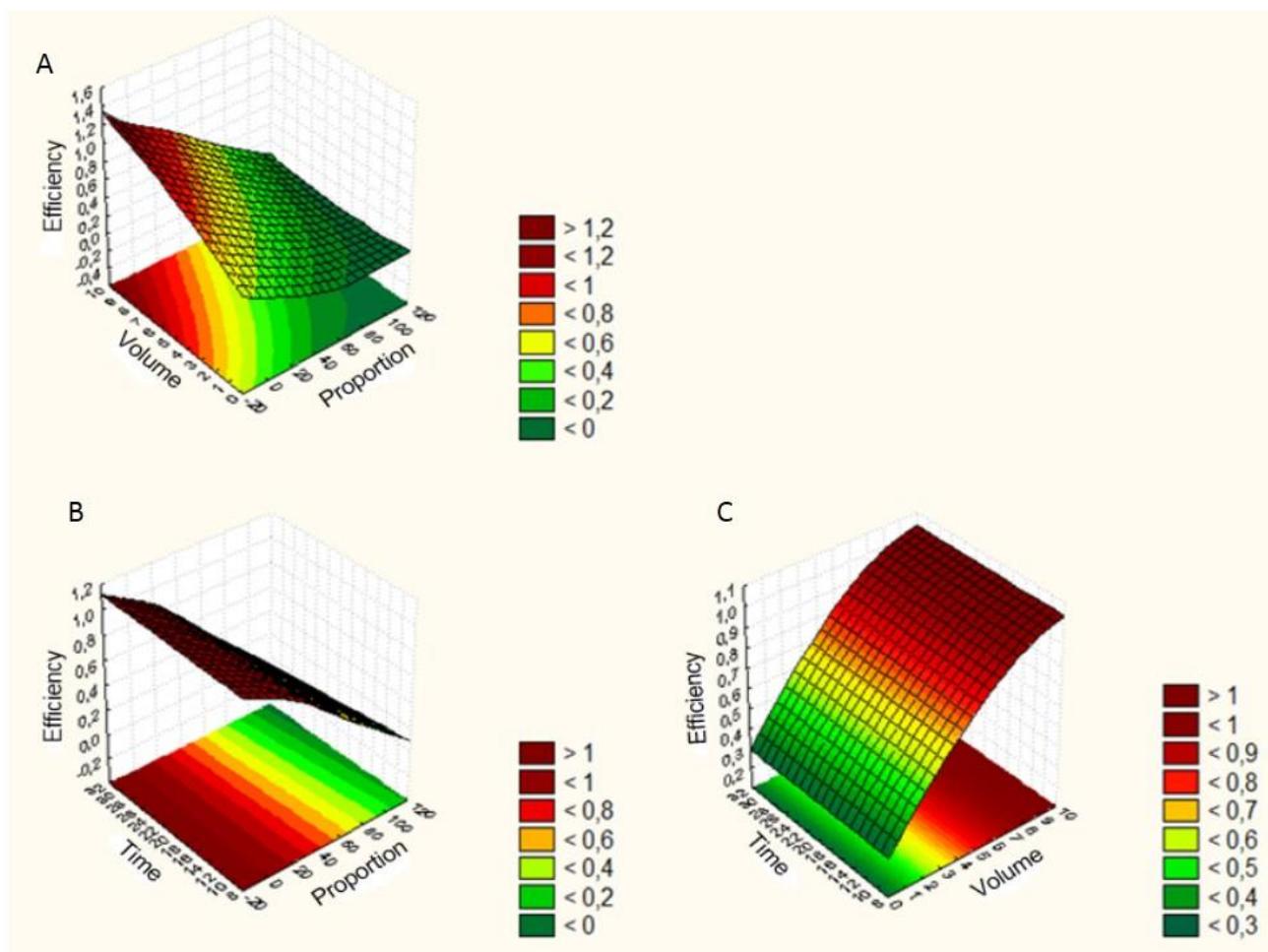
ZELDIN, D. C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 39, p. 36059-62, set. 2001.

ZHAO, H.; WANG, C.; ZHAO, N.; LI, W.; YANG, Z. ; LIU, X.; LE, W.; ZHANG, X. Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling. **Journal of Chromatography**, v. B 1081–1082, p. 101–108, abr. 2018.

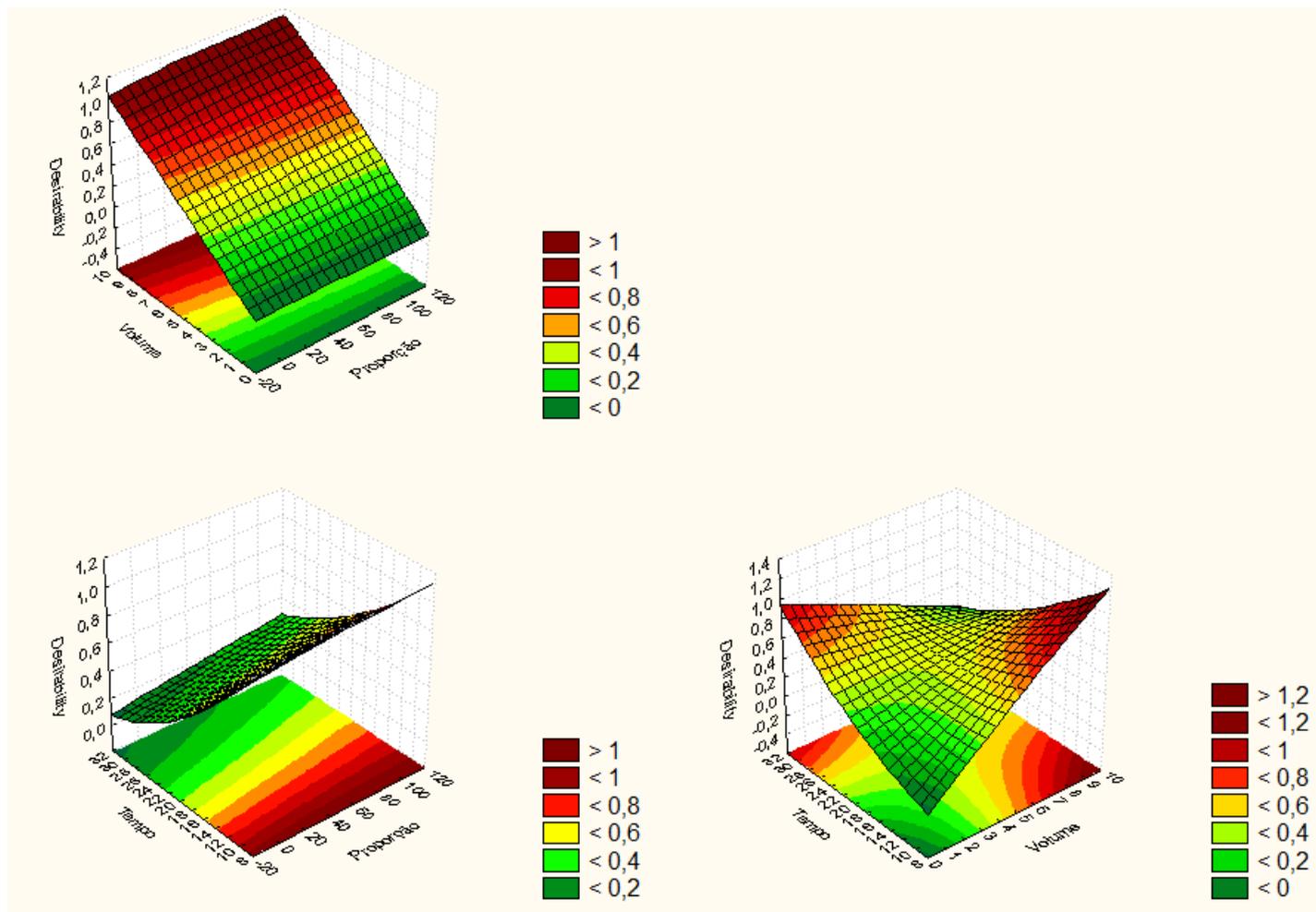
ZHAO, J.; OHSUMI, T. K.; KUNG, J. T.; OGAWA, Y.; GRAU, D. J.; SARMA, K.; SONG, J. J.; KINGSTON, R. E.; BOROWSKY, M.; LEE, J.T. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. **Mol Cell.**, v. 40, n. 6, p. 939-53, dez. 2010.

ZITVOGEL, L.; REGNAULT, A.; LOZIER, A.; WOLFERS, J.; FLAMENT, C.; TENZA, D.; *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nat. Med.**, v. 4, p. 594–600, maio 1998.

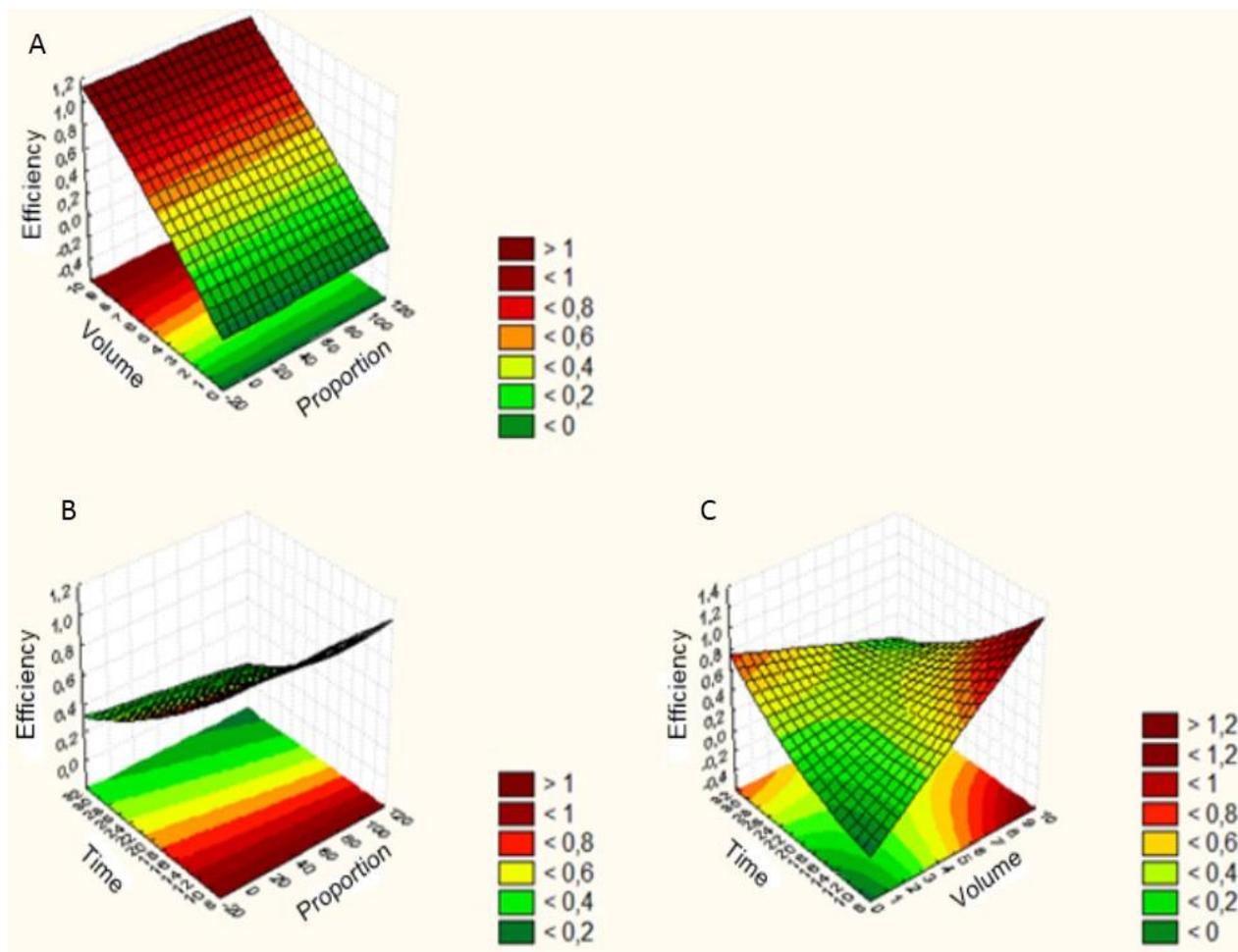
9. APÊNDICES



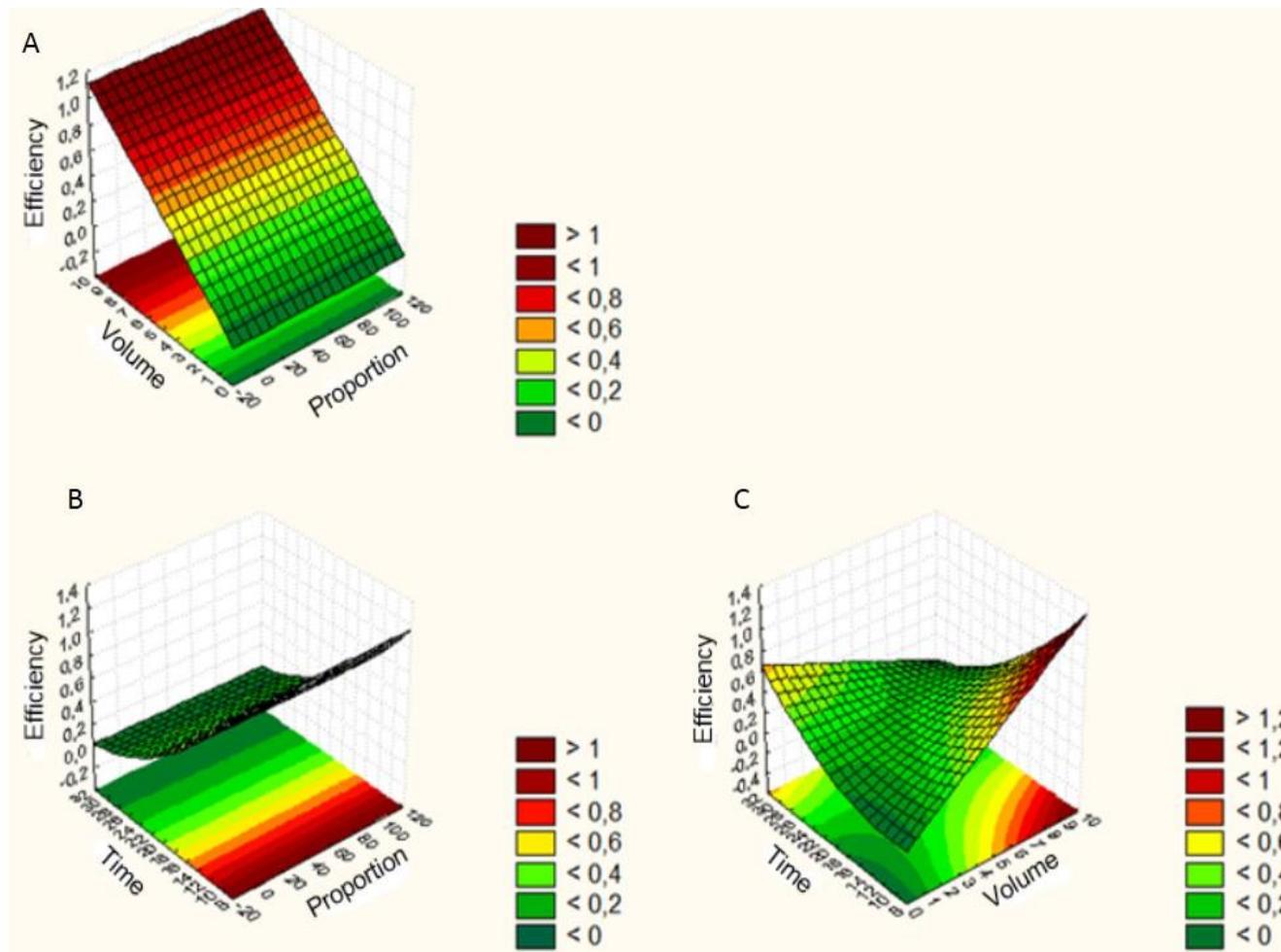
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metilefedrina em pH ácido. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



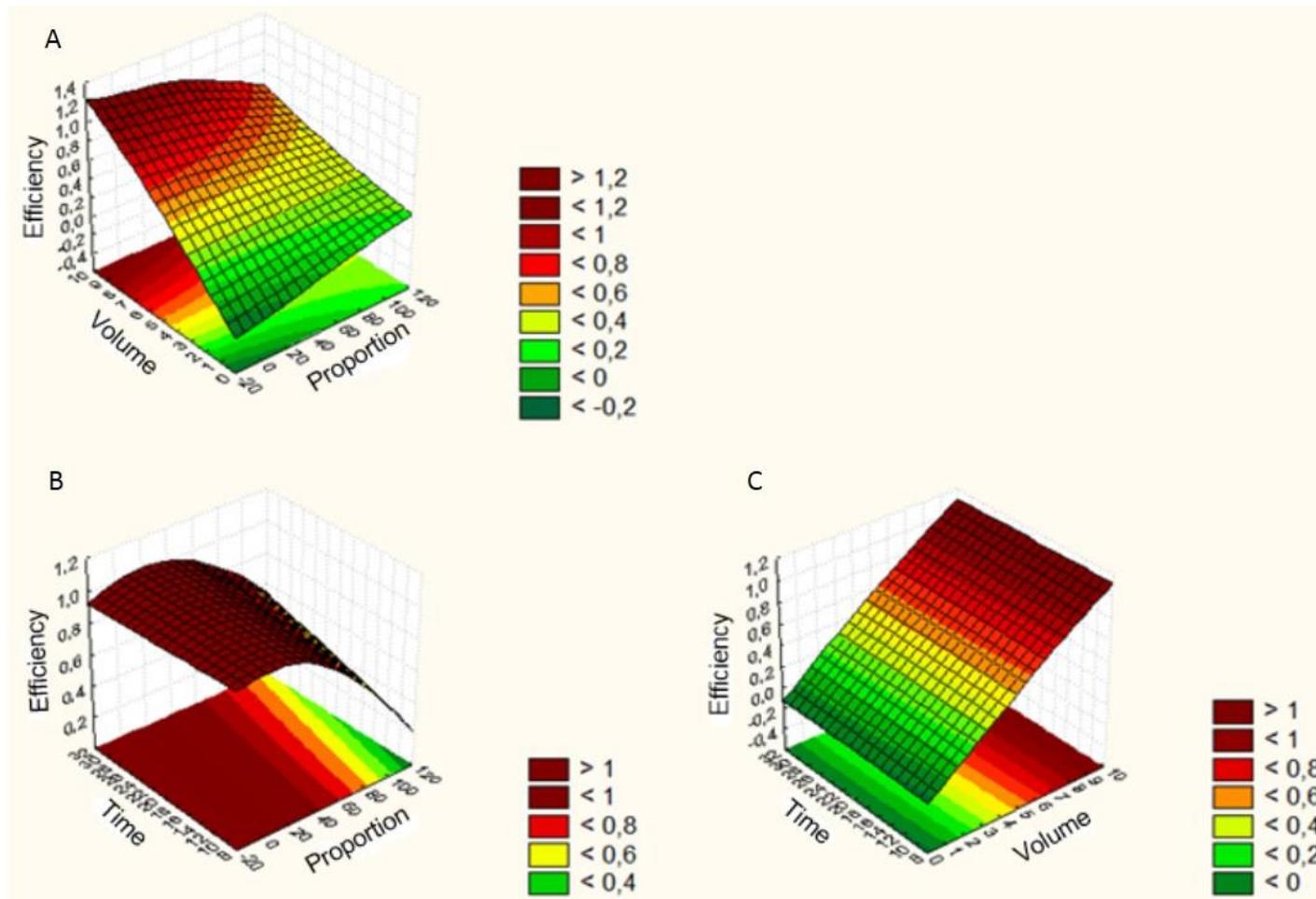
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito das diferentes condições na extração da prednisona em pH ácido. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



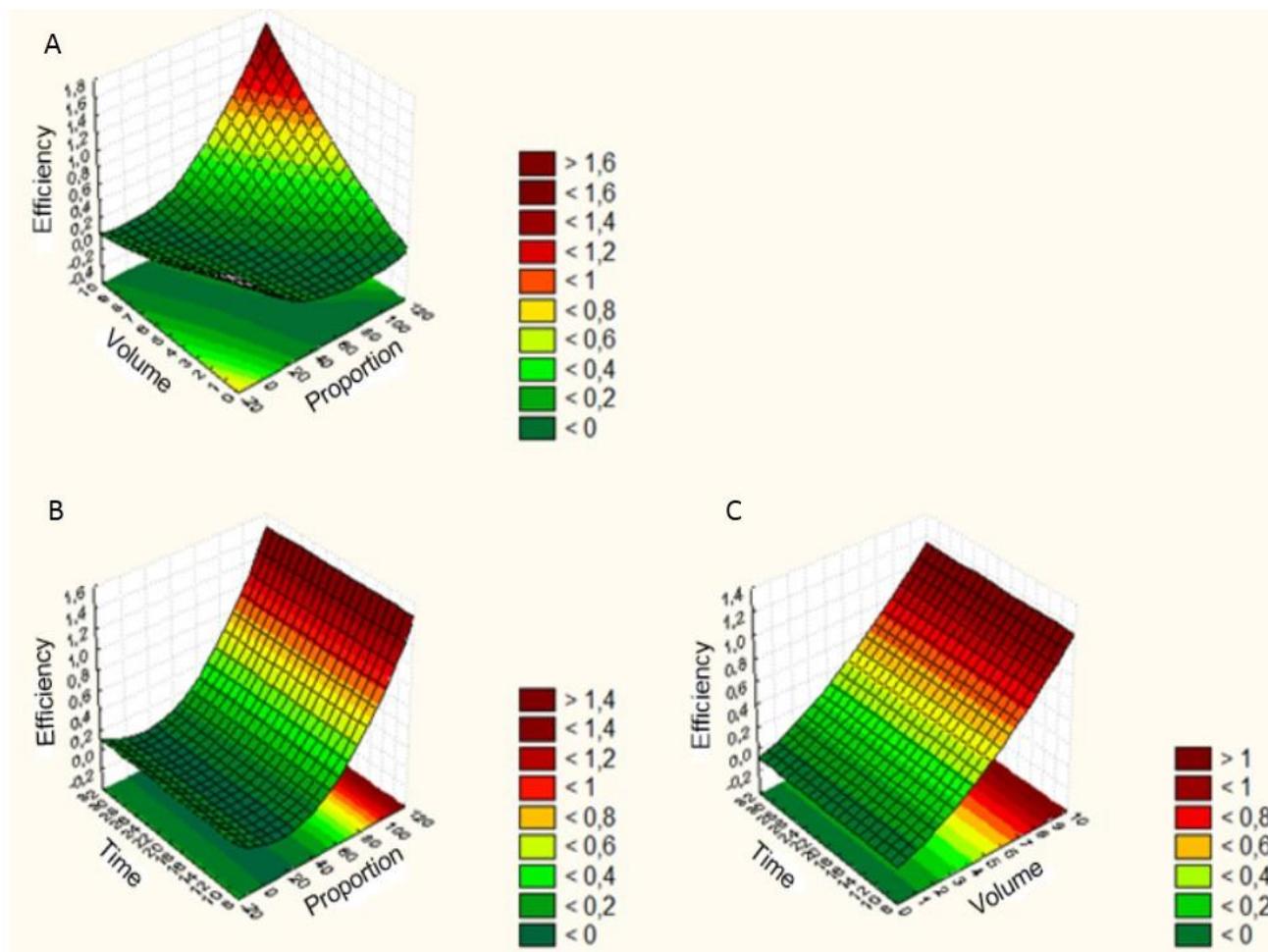
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metiltrienolona em pH ácido. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



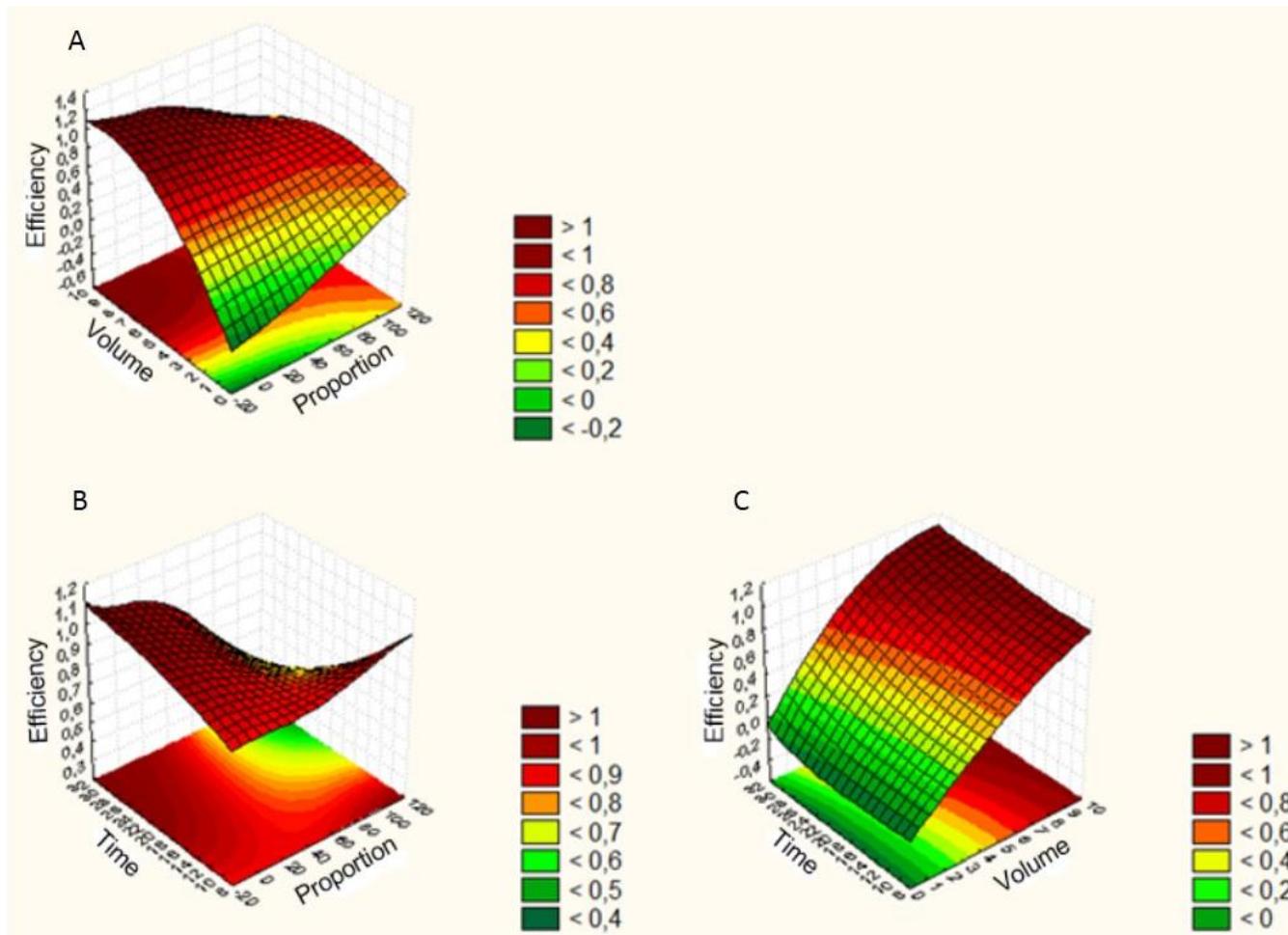
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da oxandrolona em pH ácido. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



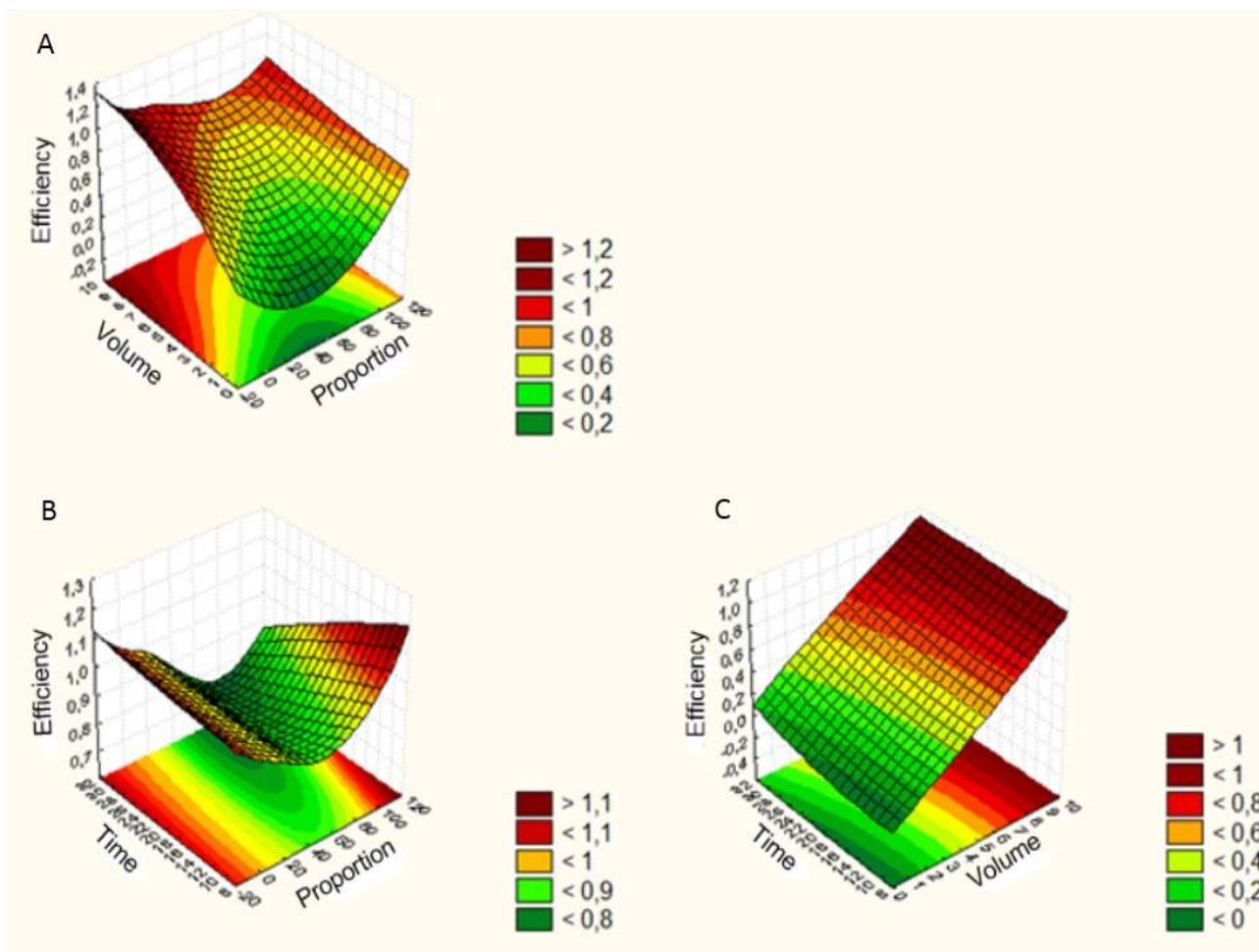
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da foledrina em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



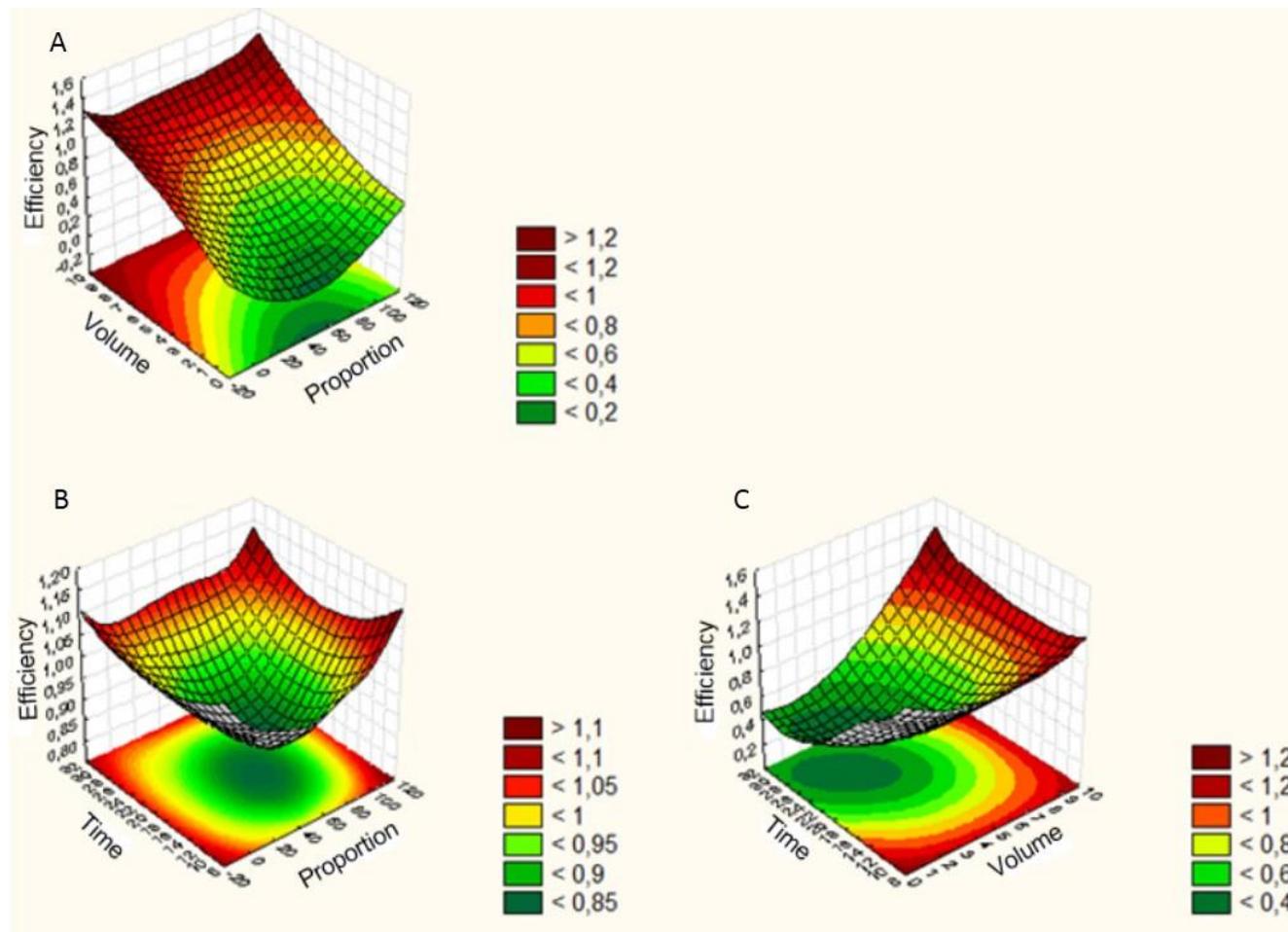
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metilefedrina em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



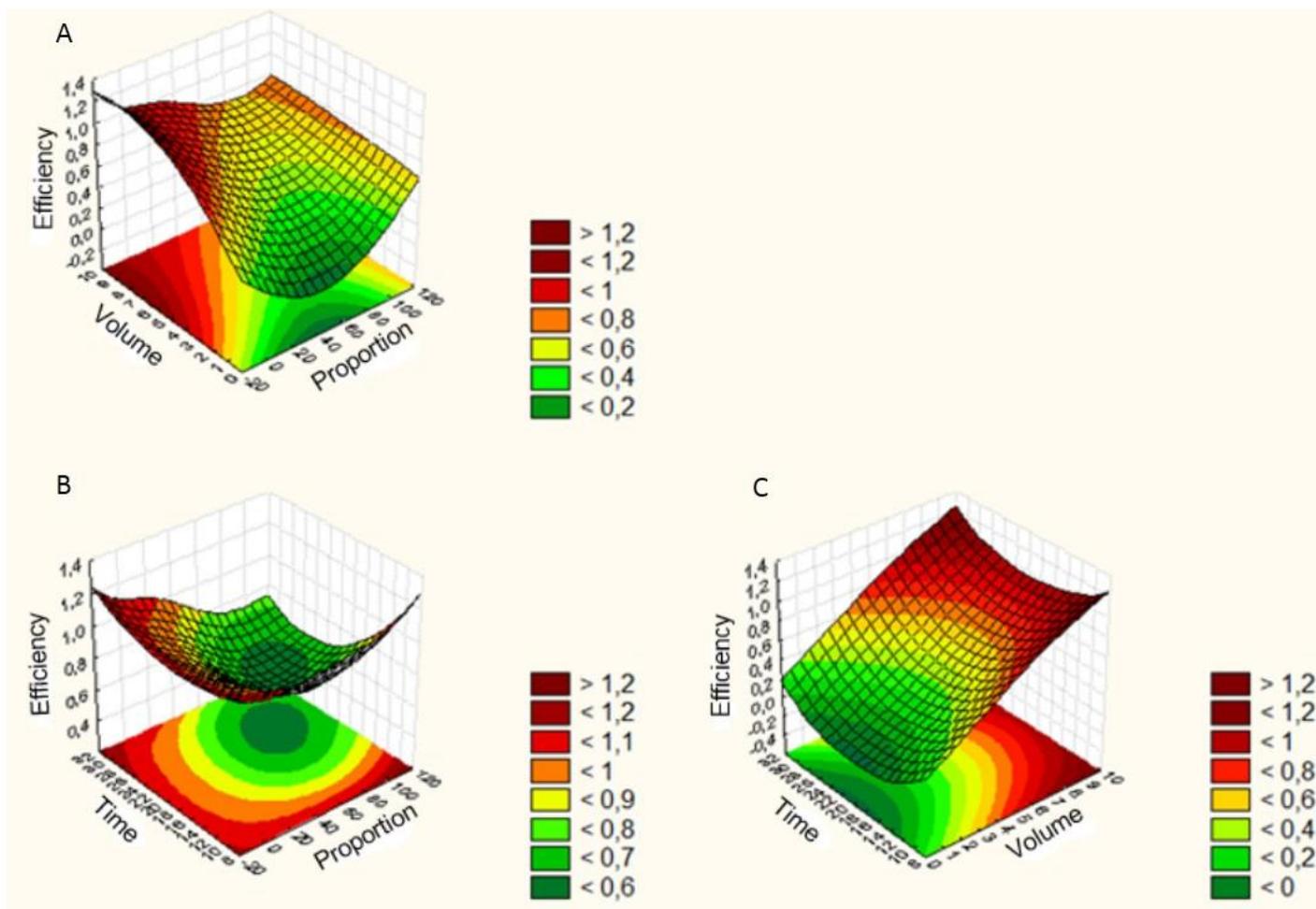
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da prednisona em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



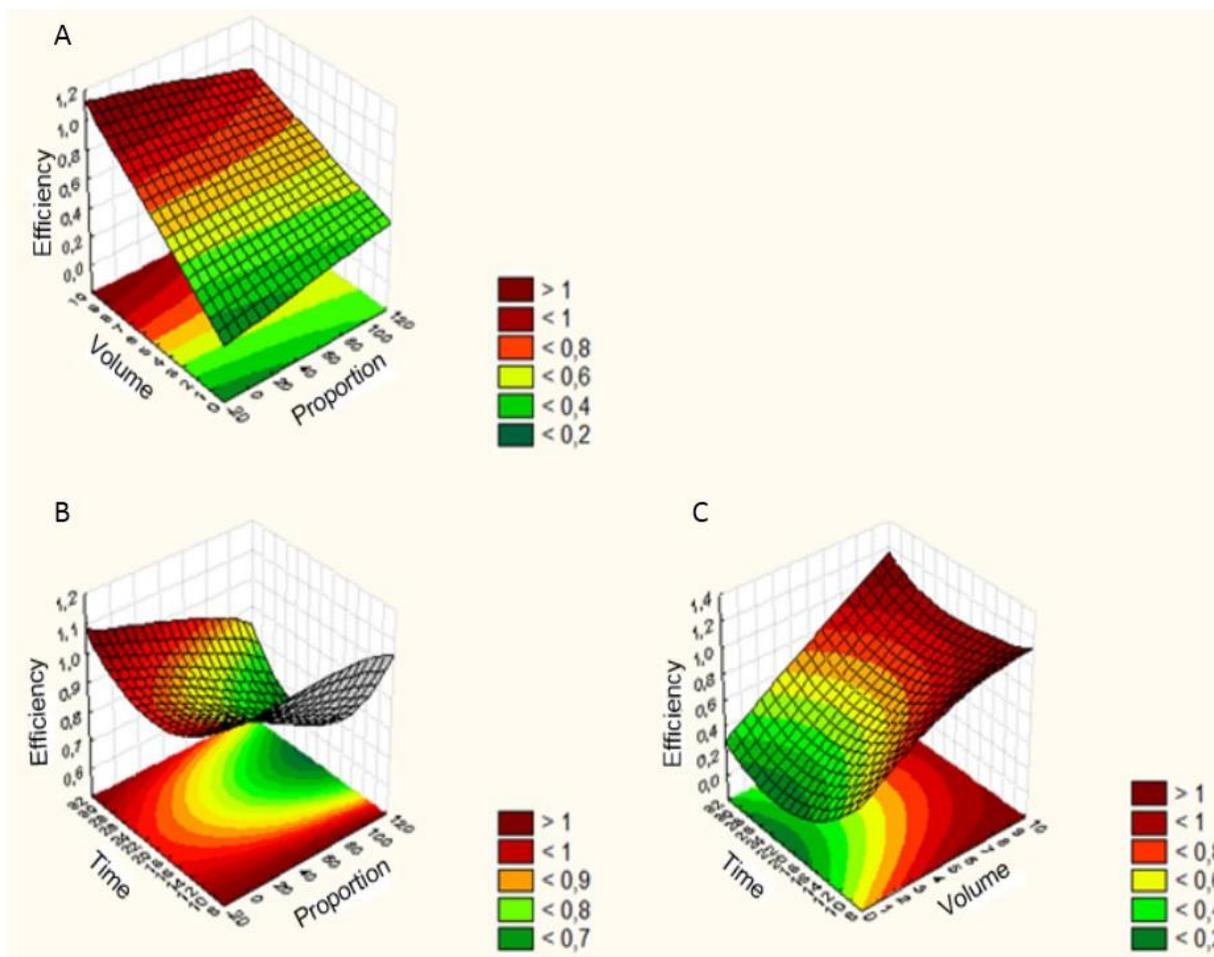
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da prednisolona em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



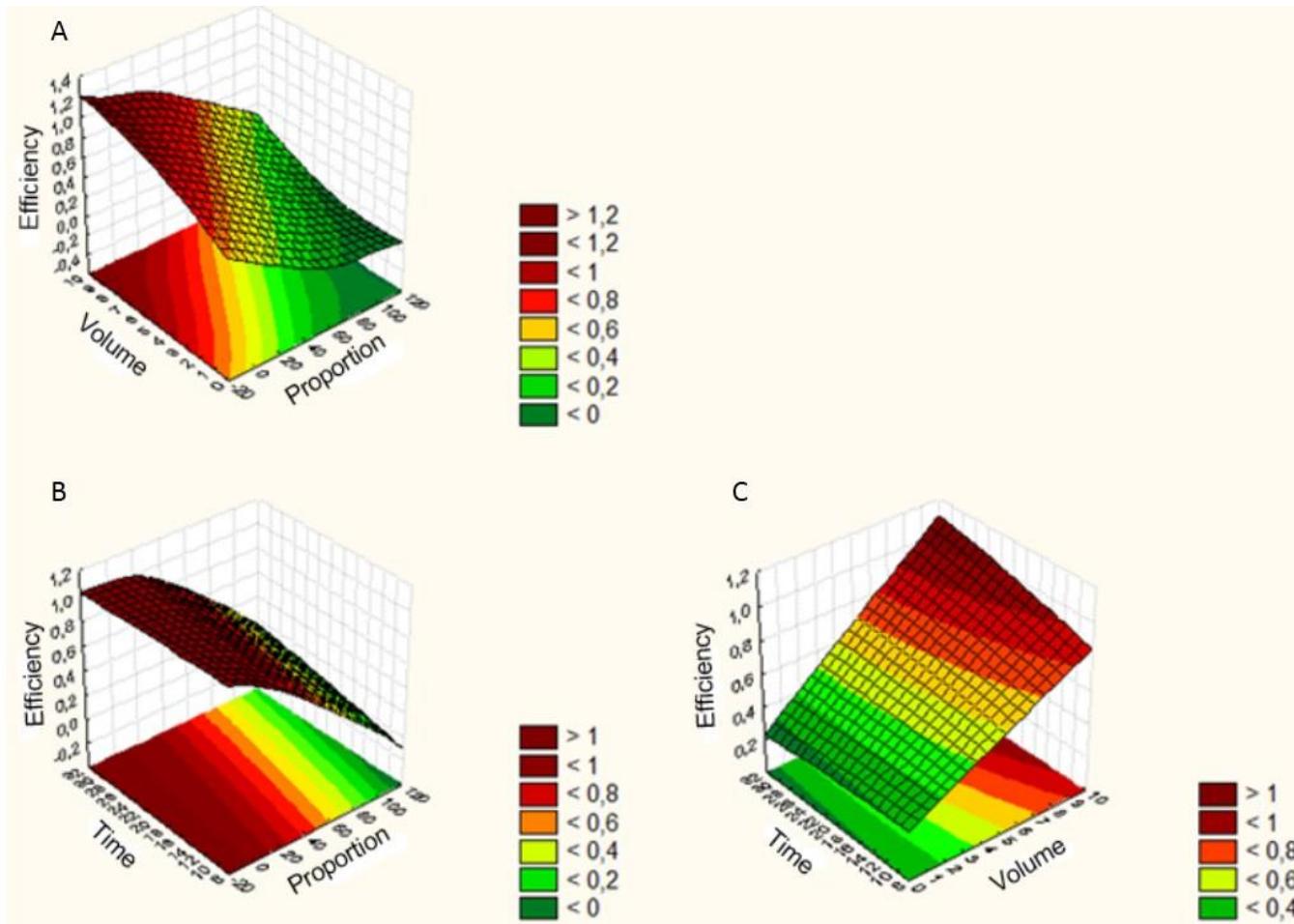
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metiltrienolona em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



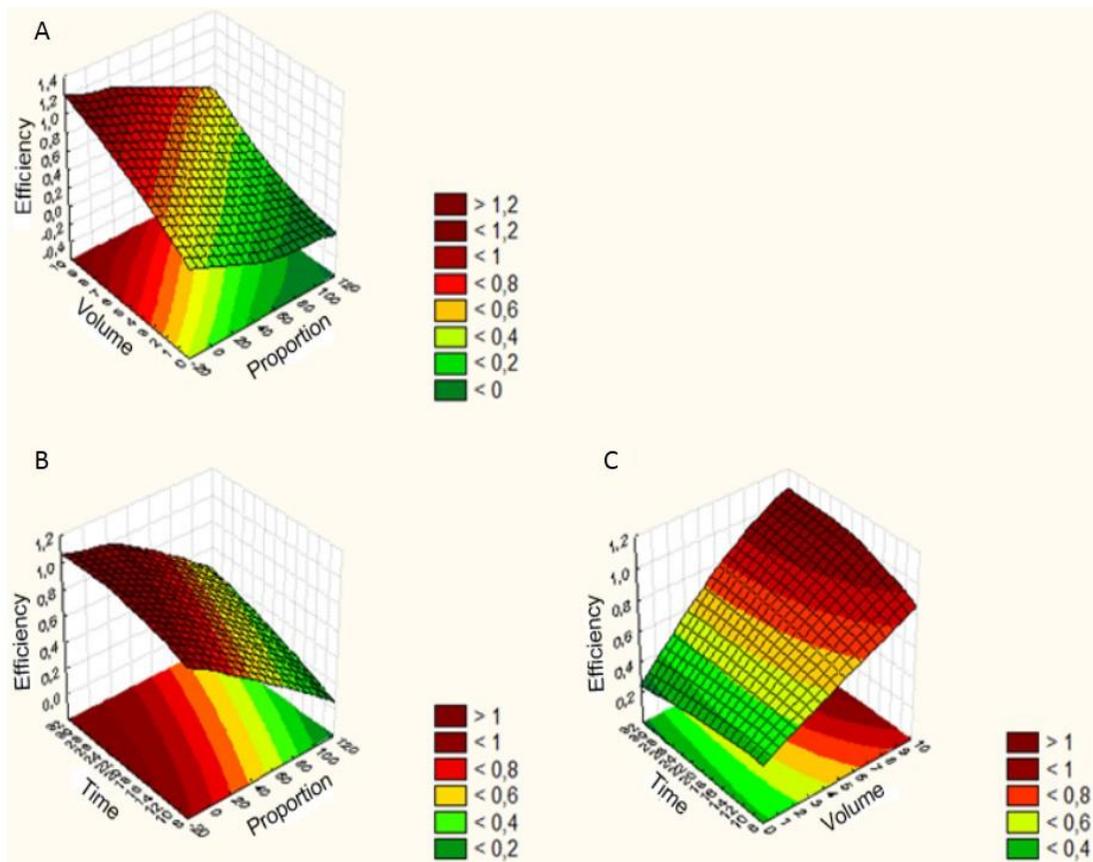
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da oxandrolona em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



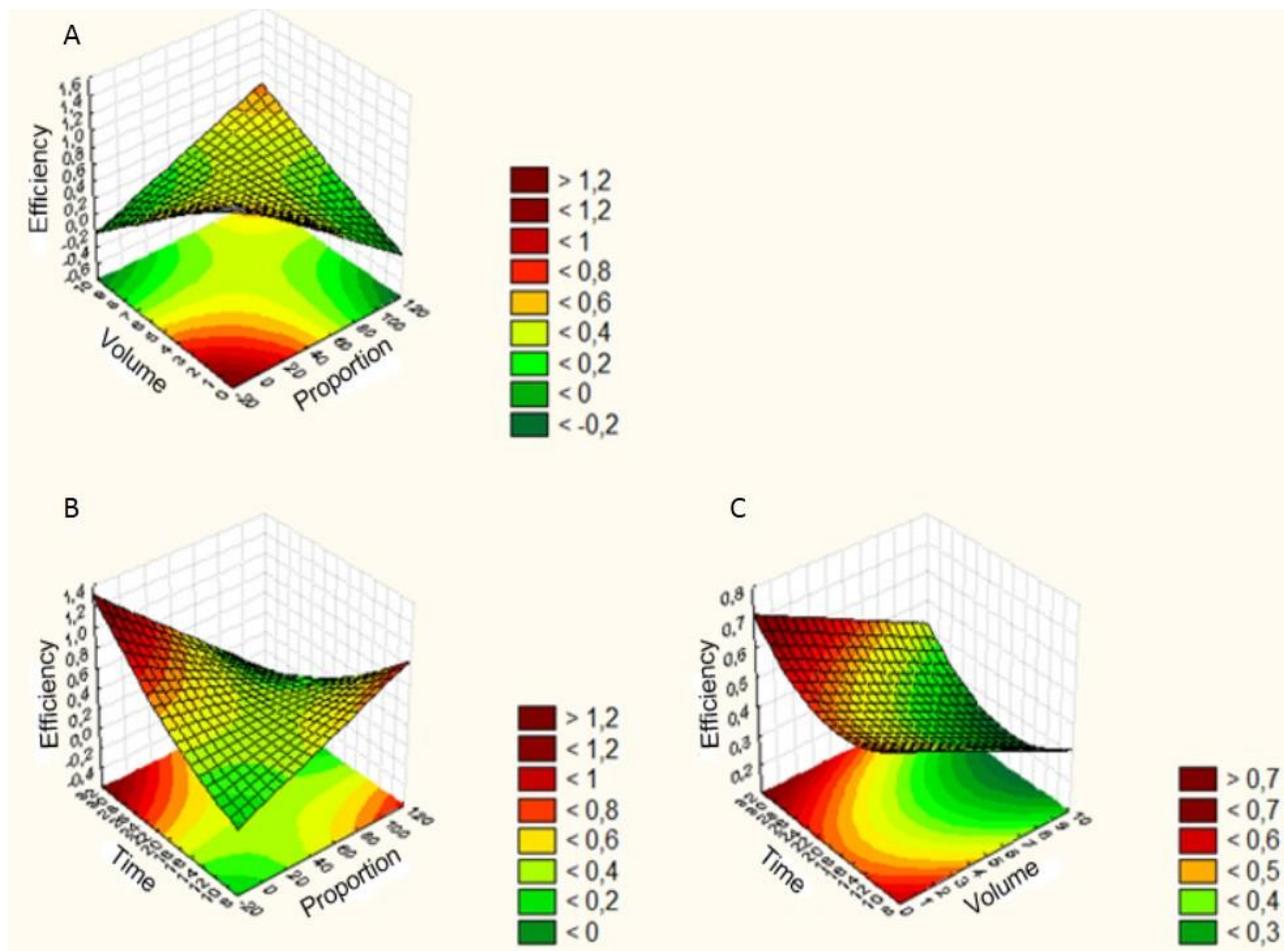
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da trembolona em pH alcalino. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



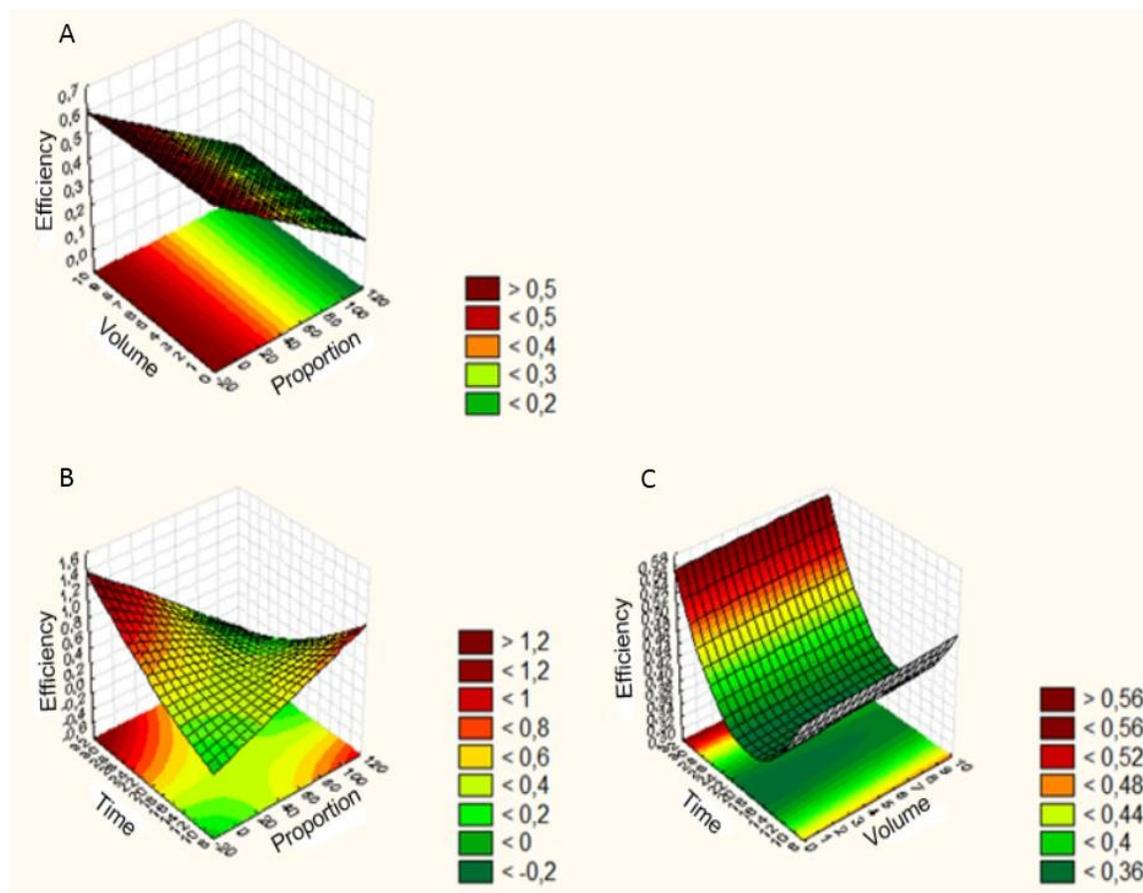
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da foledrina em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



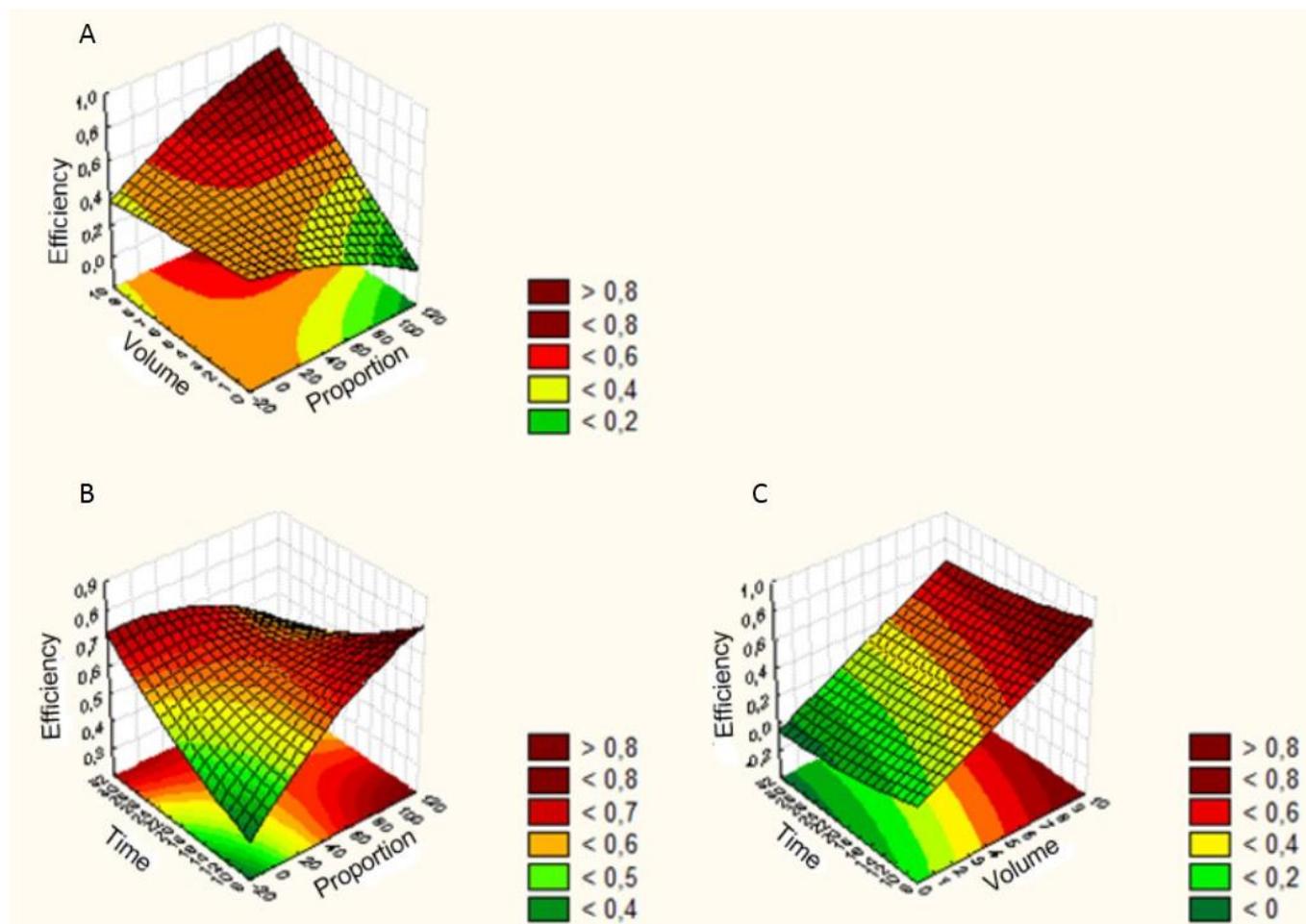
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metilfedrina em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



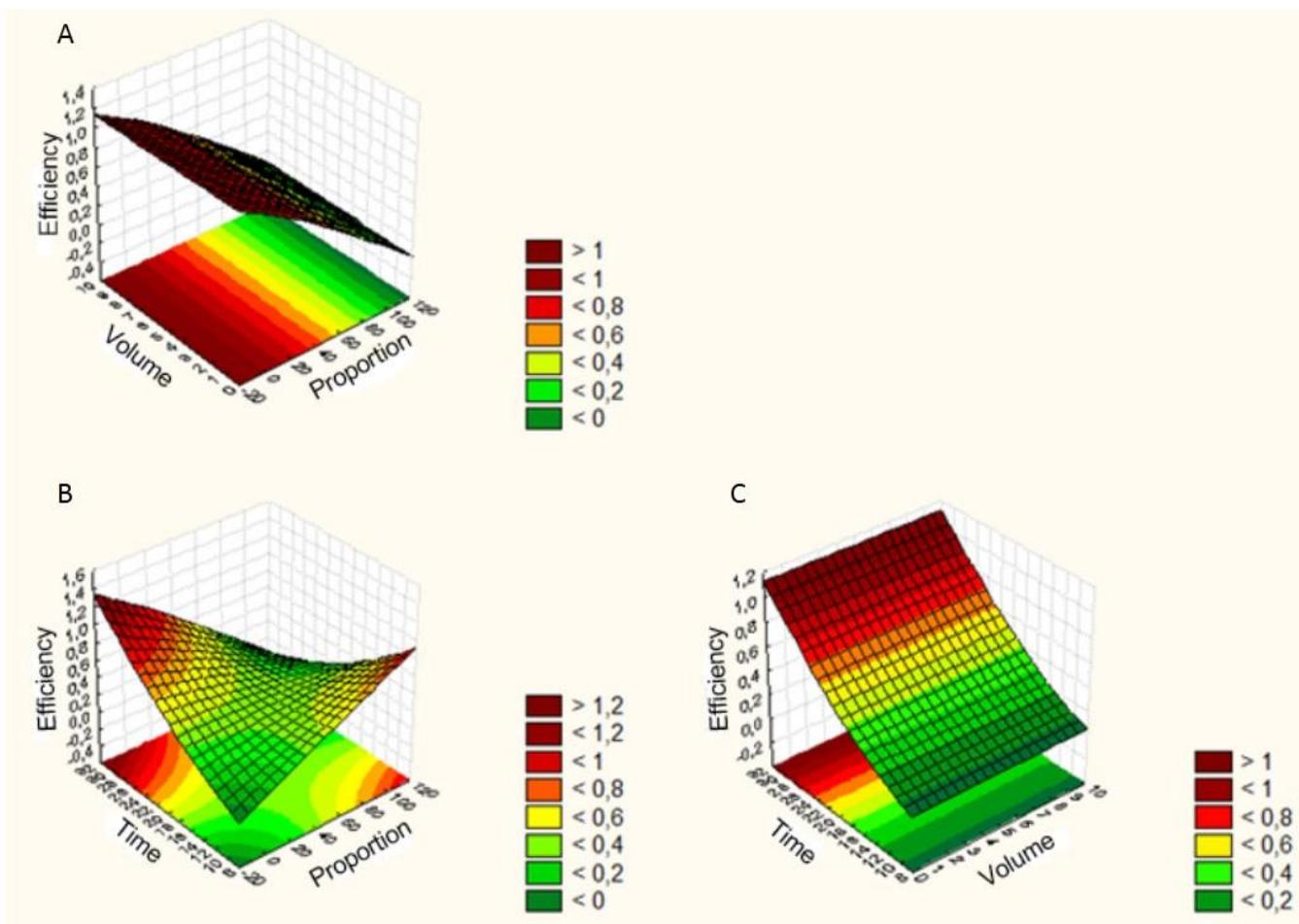
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da prednisona em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



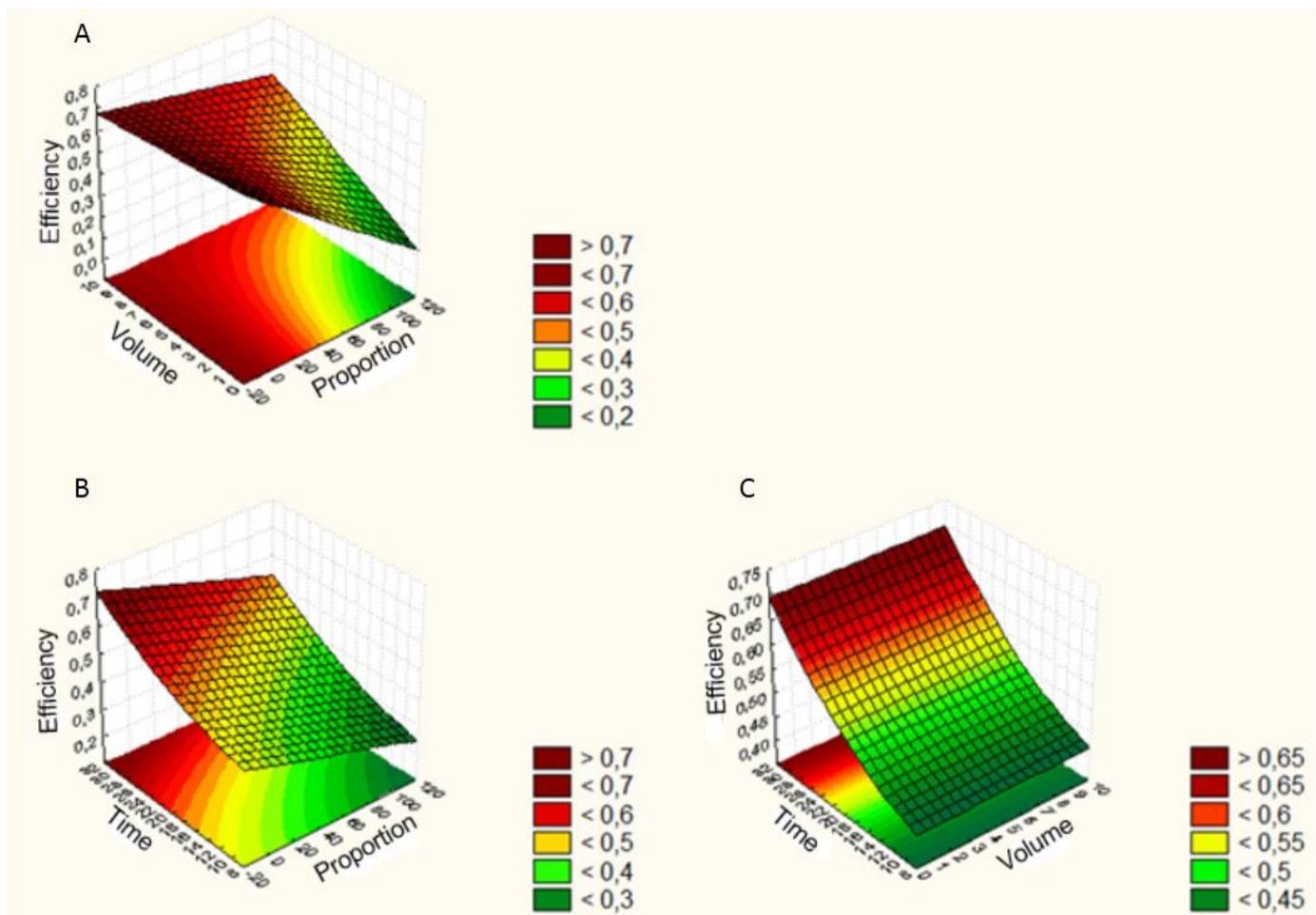
Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da prednisolona em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da metiltrienolona em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da oxandrolona em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).



Gráficos de superfície de resposta com o resultado do efeito de diferentes condições na extração da trembolona em pH neutro. As três variáveis estudadas no processo de otimização foram agrupadas em três gráficos, duas a duas. O eixo y corresponde à eficiência de recuperação do analito. Os gráficos mostram a proporção e volume (A), proporção e tempo (B) e, volume e tempo (C). A escala de cor também representa valores de recuperação de 0% (verde escuro) a 120% (vermelho escuro).

10. ANEXOS

Anexo 1 - DOENÇA DE PARKINSON - ENTREVISTA COM O PACIENTE

Data da coleta do sangue: / /

Nome:		Telefone:
Hospital/Unidade de saúde:		Prontuário:
Data de 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: <input type="checkbox"/> 1.Feminino <input type="checkbox"/> 2.Masculino	Cor: <input type="checkbox"/> 1.Branca <input type="checkbox"/> 2.Negra <input type="checkbox"/> 3.Parda <input type="checkbox"/> 4.Amarela <input type="checkbox"/> 5.Outra	

História familiar 1. Não 2. Sim
Quem? _____ Idade de início: _____

<input type="checkbox"/> Tabagismo: _____ cig/dia	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> Etilismo Dose: _____	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> Cafeína Dose: _____	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> Água de poço	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> Contato com agrotóxicos	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> Contato com petroquímicos	Data de início: _____	Obs: _____
<input type="checkbox"/> TTO Gástrico	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: _____

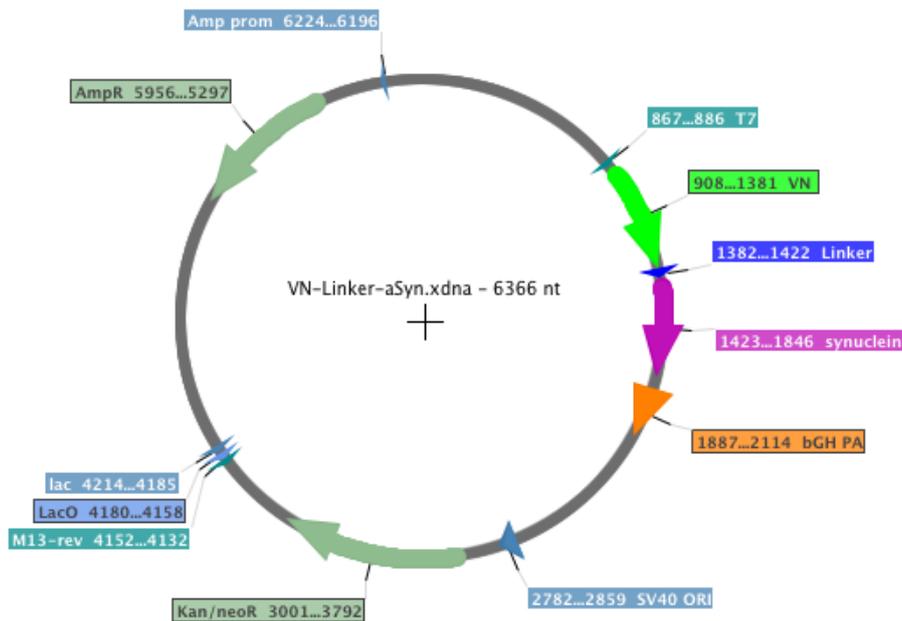
Exames complementares: TC de crânio RM de crânio Outros _____

Realiza fisioterapia ? Não Sim
Quantas vezes por semana? Diariamente Três vezes Duas vezes Uma vez
Tem acompanhamento fonoaudiológico? 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 <i>coeundi</i>		
	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		

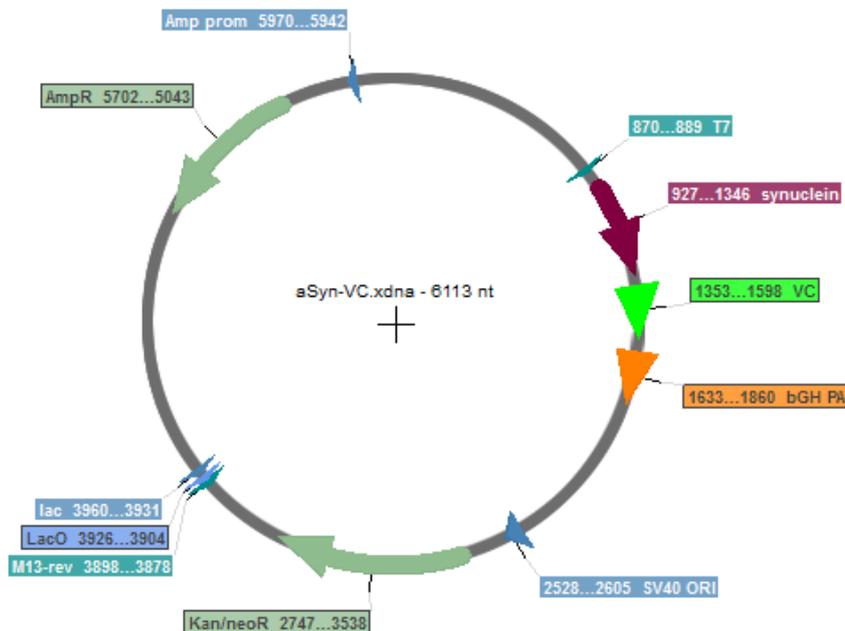
Escala de Hoehn&Yahr: _____
Escala de atividades diárias de Schwab e England: _____
Mini exame do estado mental: _____

Anexo 2 – Mapa do plasmídeo utilizado para expressão de VN- α -sinucleína



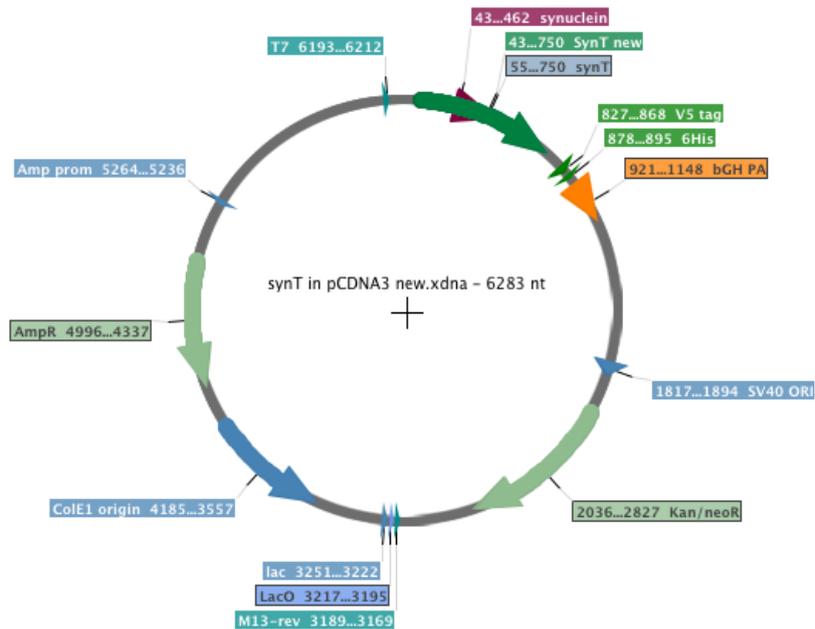
Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína VN- α -sinucleína. Plasmídeo de 6366 nucleotídeos. A figura ilustra a região promotora e o sítio de transcrição para o antibiótico de seleção (ampicilina), o operon lac, sítio de clivagem para enzima de restrição (Kan/NeoR), sítio de origem de replicação (SV40 ORI) e região onde se encontra o gene de interesse.

Anexo 3 – Mapa do plasmídeo utilizado para expressão de α -sinucleína-VC



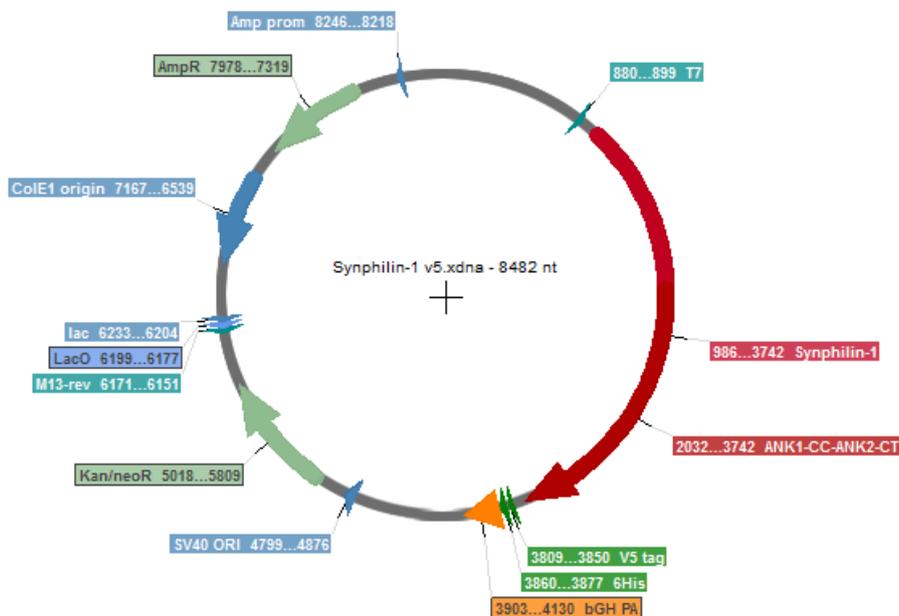
Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína α -sinucleína-VC. Plasmídeo de 6113 nucleotídeos. A figura ilustra a região promotora e o sítio de transcrição para o antibiótico de seleção (ampicilina), o operon lac, sítio de clivagem para enzima de restrição (Kan/NeoR), sítio de origem de replicação (SV40 ORI) e região onde se encontra o gene de interesse.

Anexo 4 – Mapa do plasmídeo utilizado para expressão de SynT



Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína SynT. Plasmídeo de 6283 nucleotídeos. A figura ilustra a região promotora e o sítio de transcrição para o antibiótico de seleção (ampicilina), o operon lac, sítio de clivagem para enzima de restrição (Kan/NeoR), sítio de origem de replicação (SV40 ORI) e região onde se encontra o gene de interesse.

Anexo 5 - Mapa do plasmídeo utilizado para expressão de Sph1



Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína Sph1. Plasmídeo de 8482 nucleotídeos. A figura ilustra a região promotora e o sítio de transcrição para o antibiótico de seleção (ampicilina), o operon lac, sítio de clivagem para enzima de restrição (Kan/NeoR), sítio de origem de replicação (SV40 ORI) e região onde se encontra o gene de interesse.

Anexo 6

Manuscript Details

Manuscript number	JPBA_2018_1277
Title	High-resolution metabolomic analysis of Parkinson's disease: opening the Pandora's box in the blood
Article type	Full length article

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the most common debilitating neurodegenerative motor disorder, affecting millions of people worldwide. The diagnosis is not well established yet and the knowledge of clinical symptoms and their variations are the most important requirements to define it. Despite many efforts that have been made to unravel the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of PD, much still needs to be uncovered. A tool to reach this goal could be metabolomics. The metabolomics is a concept that addresses the identification and quantification of metabolites, which provides the metabolic signature of the analyzed sample. However, because of the large diversity of small molecules in the samples, there is no perfect preparation method that maximizes the detection of all metabolites in all biological fluids. The aim of this study is to describe a comprehensive approach for metabolomics evaluation regarding PD in a peripheral blood plasma. A new methodology was developed LC-HRMS-based to be fast and simple. In total, 36 samples were analysed where eighteen came from patients and eighteen from healthy donors. For the patients, the majority of whom were male (88.89%) and the median age of onset of the disease was 57 years old, muscle rigidity (83.33%) and bradykinesia (83.33%) were the most frequent symptoms among the individuals studied. Afterwards, metabolomics analysis were made. Thus, altered processes were identified in the disease and were compared to those of the control. Metabolic network analysis was performed to place the metabolites linked to different pathways. The metabolic pathways involved were associated with steroid biosynthesis as potential biomarkers are first time reported.

Keywords	Parkinson Disease Metabolomics Long non coding RNA Biomarker discovery Exosomes Alpha- sinuclein High-resolution mass spectrometry LC-HRMS, Steroids
Taxonomy	Biochemistry Applications, Molecular Biology
Manuscript category	Bioanalytical Applications
Corresponding Author	Luciana Pizzatti
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Order of Authors	Leticia Giacomini, Vinícius Sardela, Tamara Barra, Ana Lucia Rosso, Igor R. Costa, Deise Maria Furtado de Mendonça, Henrique M.G.Pereira, Francisco Radler de Aquino Neto, Luciana Pizzatti